

UNAM  
POSGRADO

UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
INSTITUTO DE  
FÍSICA  
POSGRADO EN  
CIENCIA  
E INGENIERÍA  
DE MATERIALES

**t e s i s**

que para obtener  
el grado de  
doctor en  
ciencia e  
ingeniería de  
materiales  
p r e s e n t a

M. en C. EDGAR  
CASANOVA  
GONZÁLEZ  
Dr. JOSÉ LUIS  
RUVALCABA SIL  
director de tesis

ciudad de méxico  
2 0 1 2

ESPECTROSCOPIAS  
**Raman** y **SERS**  
en el estudio del patrimonio cultural mexicano



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A los Casanova González Fonticiella Díaz Rodríguez Castellanos Reinoso de Águila. Es decir: mamá, papá, hermano, tíos, abuelos, primos, el perro y yo.

A tantos amigos que hubieran disfrutado seguir este camino.

## AGRADECIMIENTOS

A Lupe, por lo que nos espera.

A mis primas Corina y Zoila, que me ayudaron a empezar esta historia.

A los Jiménez Serratos, entre muchas otras cosas, por los tacos.

Al montón de amigos que han hecho de México mi otro país y que me han hecho sentir como en casa, literalmente: Keila, Isaac, Eu, Semi, Brenda, Vicky, Inge, Geysler, el blanco, Germán, David y el burro, Vlado, Caro, Lissett, Cristina, Arzola, Gabriel el puro, Jhovani el... mejor no, Vivian, Carla y César. Vaya, a toda la Legión Extranjera y un montón más.

A los minions: Mayra, Angie, Malinalli y Valentina.

A México, que me ha acogido y prestado varios de sus tesoros para manosearlos... y estudiarlos.

A mis tutores, José Luis Ruvalcaba Sil, Luis Rodríguez Fernández y José Álvaro Chávez Carvayar.

A Laura, la primera tutora que todavía me está enseñando.

A la señora y al negrito, que tienen mucha culpa de este doctorado. A Alep y Enrique, por lo mismo.

A Elsa Arroyo, Sandra Zetina, Tatiana Falcón y Eumelia Hernández, por ser la parte artística de todo esto.

A los técnicos del IF-UNAM: Karim López, Francisco Jaimes, Juan Gabriel Morales, Jacqueline Cañetas, Mauricio Escobar, Roberto Hernández y Diego Quiterio.

A los doctores Roberto Sato, del CCADET (UNAM) y Concepción Domingo y Santiago Sánchez (IEM; CSIC, Madrid) por su apoyo y el de sus instituciones.

Al CONACyT y al Posgrado de Ciencia e Ingeniería de Materiales de la UNAM.

A los proyectos CONACyT 131944 MOVIL II y PAPIIT UNAM IN403210. Además, el estudio de pintura mural colonial se realizó en colaboración con el proyecto PAPIIT IN401710-2.

## RESUMEN

México cuenta con gran patrimonio cultural, conformado por las herencias prehispánica y novohispana, así como la gran aportación de los artistas mexicanos del último siglo. El estudio de este patrimonio es importante para su datación, conservación y restauración.

Estos estudios deben realizarse mediante métodos no destructivos, específicos y rápidos, en particular en el caso de los colorantes orgánicos que carecen de una estructura cristalina y están presentes en los objetos de estudio a muy bajas concentraciones debido a su alto poder colorante. Lo anterior, unido a las limitaciones o prohibiciones de tomar muestras de los bienes culturales, hace impracticable la aplicación de métodos clásicos invasivos de identificación de moléculas orgánicas, como cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas o resonancia magnética nuclear.

La espectroscopía Raman ha emergido como una técnica específica y no destructiva (o micro destructiva) que podría aplicarse como una alternativa a los métodos invasivos usuales, pero que a su vez presenta otras limitaciones como la baja sensibilidad y la interferencia, en muchos casos, de la fluorescencia de los colorantes orgánicos. Una solución es el acoplamiento de nanopartículas metálicas con la espectroscopía Raman, lo que permite amplificar grandemente la señal ( $10^4$  a  $10^6$  veces), a la vez que se logra disminuir significativamente la fluorescencia.

El objetivo del presente trabajo es establecer un método basado en la Espectroscopía Raman Amplificada en Superficies (SERS) utilizando nanopartículas de plata para identificar pigmentos y colorantes de uso común en México. En esta investigación se estudiaron extractos de colorantes orgánicos y fibras de lana teñidas, así como pinturas murales de varios templos y ex-conventos agustinos del estado de Hidalgo.

Además, para minimizar el daño inducido por el láser en materiales proclives a la degradación, se desarrolló una técnica de enfriamiento con un flujo de helio de las superficies estudiadas con el espectrómetro Raman. Este método se probó con éxito en el análisis de “El martirio de San Ponciano”, una pintura novohispana realizada en 1605 por Baltasar de Echave Orio y conservada en el Museo Nacional de Arte de la Ciudad de México.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	PROBLEMA CIENTÍFICO	6
1.2	HIPÓTESIS	6
1.3	OBJETIVO GENERAL	6
1.4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
<b>2</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>7</b>
2.1	EFFECTO RAMAN	7
2.1.1	APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS Y COLORANTES	9
2.1.2	SSRS	10
2.2	SERS	10
2.2.1	APLICACIÓN DE SERS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS Y COLORANTES	14
2.3	PREPARACIÓN DE SUSTRATOS DE ORO Y PLATA PARA SERS	16
2.3.1	MÉTODOS DE REDUCCIÓN	16
2.3.1.1	REDUCCIÓN CON CITRATO DE SODIO	16
2.3.1.2	REDUCCIÓN CON HIDROXILAMINA	17
2.3.1.3	REDUCCIÓN CON BOROHIDRURO DE SODIO	18
2.3.1.4	NANOBARRAS DE ORO	18
2.3.1.5	REDUCCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS	18
2.3.1.6	ESPEJO DE TOLLENS	19
2.3.1.7	ELECTRODÉPOSITOS SOBRE SUSTRATOS DE ALÚMINA POROSA	19
2.3.1.8	EVAPORACIÓN AL VACÍO	19
2.3.1.9	DÉPOSITOS AL VACÍO MEDIANTE LÁSER PULSADO	20
2.3.1.10	FOTORREDUCCIÓN	20

2.3.2	TERS	20
2.3.3	SHINERS	22
<b>2.4</b>	<b>SERS EN FIBRAS TEXTILES</b>	<b>22</b>
2.4.1	EXTRACCIÓN E HIDRÓLISIS	23
2.4.2	FOTORREDUCCIÓN IN SITU	24
2.4.3	APLICACIÓN DIRECTA DE NANOPARTÍCULAS	25
<b>2.5</b>	<b>EFFECTOS DEL LÁSER EN LOS SUBSTRATOS ESTUDIADOS</b>	<b>25</b>
2.5.1	ESPECTRÓMETROS RAMAN PORTÁTILES	27
2.5.2	NUEVAS ALTERNATIVAS: HELIO PARA ENFRIAR	28
<b>2.6</b>	<b>COLORANTES ORGÁNICOS MEXICANOS</b>	<b>28</b>
<b>2.7</b>	<b>EL ARTE NOVOHISPANO</b>	<b>34</b>
2.7.1	BALTASAR DE ECHAVE ORIO	34
2.7.2	LA PINTURA MURAL EN LOS CONVENTOS AGUSTINOS	35
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>REACTIVOS</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS COLOIDALES</b>	<b>41</b>
3.2.1	MÉXICO	42
3.2.1.1	REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON CITRATO DE SODIO	42
3.2.1.2	REDUCCIÓN DE ÁCIDO CLOROÁURICO CON CITRATO DE SODIO	42
3.2.1.3	REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON HIDROXILAMINA HIDROCLÓRICA	42
3.2.1.4	REDUCCIÓN DE ÁCIDO CLOROÁURICO CON HIDROXILAMINA HIDROCLÓRICA	43
3.2.2	ESPAÑA	43
3.2.2.1	REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON CITRATO DE SODIO	43
3.2.2.2	REDUCCIÓN DE ÁCIDO CLOROÁURICO CON CITRATO DE SODIO	44
3.2.2.3	REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON HIDROXILAMINA HIDROCLÓRICA	44
<b>3.3</b>	<b>PREPARACIÓN DE MUESTRAS</b>	<b>44</b>

3.3.1	EXTRACCIÓN	44
3.3.2	TEÑIDO DE FIBRAS DE LANA	44
3.3.3	PINTURA SOBRE TABLA	45
3.3.4	PINTURAS MODERNAS	45
3.4	ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE	46
3.5	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	46
3.6	MICROSCOPIA ÓPTICA	47
3.7	RAMAN y SERS	47
3.7.1	RAMAN Y SERS DE COLORANTES	48
3.7.1.1	RAMAN DE COLORANTES	48
3.7.1.2	SERS DE PIRIDINA	49
3.7.1.3	SERS DE ÁCIDO CARMÍNICO	49
3.7.1.4	SERS DE EXTRACTOS	49
3.7.1.5	FOTORREDUCCIÓN IN SITU SOBRE FIBRAS TEÑIDAS	49
3.7.1.6	SERS DE FIBRAS TEÑIDAS	50
3.7.2	RAMAN ENFRIADO CON HELIO	50
3.7.3	RAMAN DE PINTURA MURAL	51
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1	ESPECTROSCOPIA RAMAN DE COLORANTES	53
4.2	SERS DE COLORANTES	59
4.2.1	COLOIDES DE PLATA Y ORO	59
4.2.2	SERS DE EXTRACTOS DE COLORANTES	72
4.2.3	SERS DE FIBRAS TEÑIDAS	84
4.2.3.1	FOTORREDUCCIÓN IN SITU	84
4.2.3.2	APLICACIÓN DIRECTA DE NANOPARTÍCULAS	85
4.3	RAMAN ENFRIADO CON HELIO	89

4.3.1	MUESTRAS DE PINTURA	89
4.3.2	EL MARTIRIO DE SAN PONCIANO	92
4.4	RAMAN DE PINTURA MURAL	96
4.4.1	SERS EN PINTURAS MURALES	101
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	105
6	ANEXOS	108
7	REFERENCIAS	114

# 1 INTRODUCCIÓN

---

Desde mucho antes de la conquista de México por la corona española, a inicios del siglo XVI, el territorio mexicano estaba habitado por diversos grupos humanos que habían llegado a formar sociedades organizadas. Estas culturas conocían y explotaban recursos minerales y biológicos, de los cuales algunos eran utilizados como pigmentos y colorantes. Debido a la gran variedad de recursos naturales existentes en las diferentes áreas geográficas del territorio mexicano y a la pérdida de información sobre las tradiciones de estos pueblos, ocurrida después de la conquista, hoy no contamos con suficiente conocimiento relacionado con las técnicas y materiales utilizados en la creación de objetos rituales y cotidianos en tiempos prehispánicos.

Lo que sabemos actualmente sobre el uso de algún recurso en particular, se debe a las crónicas escritas en los primeros años de la conquista. Otra importante fuente de información sobre las antiguas formas de extracción y aplicación de los colorantes reside en algunas comunidades indígenas, aunque se debe tener en cuenta que esas recetas pueden haber sufrido cambios debidos a la influencia europea, derivada del proceso histórico del país. En años recientes, varios estudios biológicos, antropológicos y etnohistóricos han permitido el conocimiento de los nombres y la identificación taxonómica de algunos colorantes, así como sus usos.

Es natural pensar que una vez establecido el virreinato de la Nueva España, la historia de la producción artística haya sido asentada en documentos escritos y que el estudio de estos documentos ha de ofrecer más información con relación a los materiales y las técnicas utilizadas en el desarrollo de las artes. No es este el caso, se cuenta con muy pocos documentos que tomen nota de la explotación de recursos naturales por los artistas y artesanos, aun cuando puede extraerse alguna información de los contratos entre los artistas – sobre todo pintores – y sus patrones o de la documentación relativa a la importación y exportación entre España y las Américas.

La identificación y caracterización precisas de los pigmentos y los colorantes orgánicos presentes en el arte prehispánico y colonial es importante no solo para entender el conocimiento material y tecnológico detrás de la producción de esas obras de arte, sino que el material utilizado puede funcionar como marcador cronológico o geográfico (o ambos) y, por último, permite establecer las políticas y procedimientos de conservación y restauración más adecuados.

Sin embargo, la identificación de los colorantes orgánicos utilizados en la fabricación de objetos patrimoniales presenta varias dificultades. Actualmente se conoce el nombre indígena de muchos colorantes, pero no han sido identificados del todo botánicamente; en otros casos se cuenta con reportes antropológicos o históricos del uso de colorantes, pero no han sido identificados o relacionados con sus fuentes vegetales.

Por otra parte, teniendo en cuenta los aspectos materiales, la identificación de los colorantes orgánicos se dificulta por varias razones. Primero, debido a su alto poder de tinción, estas sustancias se encuentran en las muestras en concentraciones muy pequeñas. En segundo lugar, en general carecen de estructura cristalina, lo que facilita la identificación en el caso de los componentes inorgánicos. Además, cuando se analiza un objeto de interés histórico o artístico, la cantidad de muestra es extremadamente pequeña, en los raros casos en que se puede muestrear. Por tanto, la técnica analítica a utilizar debe ser no destructiva o microdestructiva, altamente específica, sensible y rápida. La falta de bases de información de colorantes orgánicos puros supone una dificultad adicional para la identificación de estos materiales.

La combinación de varias técnicas como difracción de rayos X (XRD), fluorescencia de rayos X (XRF), emisión de rayos X inducida por partículas

(PIXE), microscopía electrónica de transmisión (TEM), resonancia magnética nuclear portátil (RMN), entre otras, han probado su eficacia en la identificación de compuestos inorgánicos al brindar información sobre la estructura cristalina o la composición elemental de las sustancias.<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sup>

Las técnicas analíticas comúnmente utilizadas para compuestos orgánicos, como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS),<sup>8, 9, 10</sup> generalmente requieren un estándar de referencia y una muestra relativamente grande, pocas veces disponible en el caso de los colorantes mexicanos.

La espectroscopía Raman ha sido aplicada con éxito al estudio de objetos artísticos y patrimoniales,<sup>11, 12, 13</sup> utilizando bases de datos de pigmentos que han sido publicadas con este fin.<sup>14</sup> Esta técnica se ha aplicado al estudio de manuscritos medievales,<sup>12</sup> al análisis de posibles fraudes en papiros egipcios, en mapas y estampillas, y en estucos iraquíes.<sup>15</sup> En México, ha sido utilizado en el análisis de pintura mural maya en Ek'Balam<sup>16</sup> y, hace poco, en el estudio de un libro italiano coloreado de la época colonial,<sup>17</sup> el Acta de Independencia del Imperio Mexicano de 1821<sup>18</sup> y la máscara prehispánica de Malinaltepec, de la colección del Museo Nacional de Antropología.<sup>19</sup>

Pero cuando se trata de colorantes orgánicos naturales, la aplicación de la espectroscopía Raman encuentra obstáculos en la fuerte fluorescencia que se produce en las moléculas del colorante por el haz del láser utilizado para excitarlas y también en la baja sensibilidad de la técnica.<sup>20</sup> Una alternativa, utilizada con éxito para el análisis de colorantes orgánicos es la espectroscopía Raman corrida y sustraída (del inglés Subtracted Shifted Raman Spectroscopy, SSRS).<sup>21, 22</sup>

Las limitaciones del Raman también pueden ser superadas utilizando la espectroscopía Raman amplificada en superficies (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS),<sup>23</sup> donde la señal de Raman es amplificada cuando el analito se encuentra cerca de nanoestructuras metálicas – comúnmente adsorbido sobre el metal – mientras que la fluorescencia es prácticamente eliminada.<sup>24, 25, 26, 27, 28</sup> Otras dos variantes del SERS son la espectroscopía Raman amplificada en las puntas de las sondas (*Tip Enhanced Raman Spectroscopy*, TERS)<sup>29</sup> y espectroscopía Raman amplificada por nanopartículas aisladas por una coraza (*Shell-Isolated*

*Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy*, SHINERS),<sup>30</sup> que tienen ventajas y limitaciones con respecto al SERS.

Aunque el SERS ha sido utilizado para la identificación de colorantes orgánicos desde 1987,<sup>31</sup> el mayor impulso se ha dado en la última década, con la publicación de una gran cantidad de trabajos relacionados con colorantes puros y con su identificación en obras de arte<sup>24, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41</sup> e incluso con el estudio de colorantes sintéticos como los de bolígrafos comunes, con fines forenses.<sup>42</sup> Pero la enorme variedad de colorantes mexicanos no ha sido estudiada mediante SERS, ni siquiera mediante Raman, a excepción del índigo, el ácido carmínico y la brasilina, los colorantes principales en el azul maya, la cochinilla y el palo de Brasil, respectivamente. Un artículo de 1997 fue probablemente durante mucho tiempo el único trabajo publicado sobre el espectro Raman del achiote,<sup>43</sup> mientras que se cuenta con muy poca información sobre el resto de los colorantes mexicanos, unos 18. El estudio de algunos de estos colorantes, tanto en extractos a partir de sus fuentes naturales como a partir de fibras teñidas, constituye una parte importante y una aportación relevante de este trabajo. Se utilizaron un coloide estándar de Lee-Meisel,<sup>44</sup> soluciones acuosas de cochinilla, achiote, muitle y zacatlaxcalli y fibras de lana teñidas, utilizando recetas mexicanas tradicionales, con palo de Brasil, cempazúchitl, achiote y muitle. Los espectros SERS obtenidos pueden servir para la identificación de estos colorantes en futuras investigaciones.

Sin embargo, a pesar de las ventajas del SERS, no siempre puede ser aplicado al estudio de obras de arte y materiales históricos, en gran parte debido a la necesidad de depositar gotas del coloide de plata sobre la superficie a estudiar, lo que provocaría una contaminación permanente. Por lo tanto, en numerosas ocasiones es necesario usar simplemente Raman y en esta tesis se presentarán también resultados de la aplicación directa de la espectroscopía Raman en las pinturas murales de varios conventos dominicos del estado de Hidalgo y en una pintura de caballete de Baltasar de Echave Orio, uno de los principales exponentes de la pintura novohispana, conocido por la amplia gama de colores que usaba en sus obras. En este último caso, se utilizó por primera vez una técnica original diseñada para minimizar la posibilidad de ocurrencia de daños a las obras estudiadas mediante Raman.

Al utilizar Raman y dependiendo de la naturaleza del objeto de estudio, el láser puede causar daños en la muestra, principalmente pequeñas quemaduras – casi siempre microscópicas – en la superficie debidas a la

energía depositada por el rayo.<sup>45, 46</sup> Aunque no es muy común y los daños son difíciles de ver a simple vista, se necesita una solución para evitar más daños a las obras de arte que se analizan.

Una forma obvia de resolver el problema es disminuir la potencia del láser a niveles seguros y tratar de adquirir el espectro Raman.

Lamentablemente, en nuestro caso el láser del espectrómetro tiene una potencia mínima de 20 mW, muy alta para algunos substratos.

Comúnmente, los espectrómetros Raman portátiles no cuentan con opciones de control de potencia que pueden encontrarse en equipos de laboratorio<sup>45</sup> y es necesario buscar otra alternativa.

A partir de la experiencia adquirida en el análisis de materiales por haces de iones, donde se ha utilizado un flujo de helio para minimizar el daño en la superficie de las muestras estudiadas, se diseñó un colimador *pinhole* conectado a una línea de helio a través de un regulador de flujo y se realizaron pruebas sobre materiales que habían mostrado síntomas de deterioro bajo la incidencia del láser de 785 nm. Utilizando esta configuración, la superficie se enfría localmente y disminuye la cantidad de oxígeno disponible, reduciendo significativamente las quemaduras y oxidación del área irradiada.

En investigaciones previas se habían identificado materiales que podrían sufrir deterioro con mayor facilidad por la exposición al láser y fueron seleccionados para realizar las pruebas con el Raman enfriado por He. Se estudiaron entonces muestras de pintura azul de piroxilina usada en pintura moderna y dos materiales preparados como referencia de pintura sobre madera, bermellón y ocre, bajo condiciones de Raman normal y luego acoplado al flujo de He. Finalmente, la técnica fue probada por primera vez en una obra de arte al estudiar la pintura de Baltasar de Echave Orio antes mencionada, en el Museo Nacional de Arte de la Ciudad de México.

Con lo dicho hasta aquí, se puede resumir que este trabajo tratará sobre la aplicación de la espectroscopía Raman y dos de sus variantes, la espectroscopía Raman amplificada en superficies y la espectroscopía Raman acoplada a un flujo de helio, al estudio de materiales de interés histórico y artístico del patrimonio cultural mexicano. Esta técnica se suma a otras, como la fluorescencia de rayos X y la espectroscopía infrarroja, que ya se utilizaban para el mismo fin. La utilización del Raman, la búsqueda y aplicación de soluciones para resolver los problemas

de intensidad, sensibilidad y seguridad de la técnica, así como nuevos datos sobre colorantes poco estudiados, constituyen las principales novedades del trabajo.

### 1.1 PROBLEMA CIENTÍFICO

Los estudios realizados en objetos de interés artístico e histórico de las épocas prehispánica y novohispana de México han permitido identificar pigmentos y colorantes inorgánicos presentes en ellos, sin embargo, la identificación de colorantes orgánicos no ha sido posible, excepto en contados casos como el del índigo.

### 1.2 HIPÓTESIS

La espectroscopía Raman clásica, así como sus variantes – espectroscopía Raman amplificada en superficies (SERS) y espectroscopía Raman acoplada a un flujo de helio – pueden ser aplicadas con éxito y de manera general a la identificación de colorantes orgánicos en materiales de interés histórico y artístico, prehispánicos, novohispanos y del arte moderno.

### 1.3 OBJETIVO GENERAL

Establecer el método de la espectroscopía Raman y sus variantes (SERS y Raman-He) para la identificación de pigmentos y colorantes en materiales de interés histórico y artístico, prehispánicos y novohispanos.

### 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparación de sustratos para SERS. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y oro.
2. Obtención de espectros de SERS de muestras de referencia. Extractos de colorantes y fibras textiles teñidas.
3. Obtención de espectros de Raman de muestras de referencia y casos de estudio utilizando un flujo de helio acoplado. Estudio de “El martirio de San Ponciano”, de Baltasar de Echave Orio.
4. Obtención de espectros de Raman y SERS de casos de estudio. Estudios de las pinturas murales en los conventos agustinos de Hidalgo.

# 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

## 2.1 EFECTO RAMAN

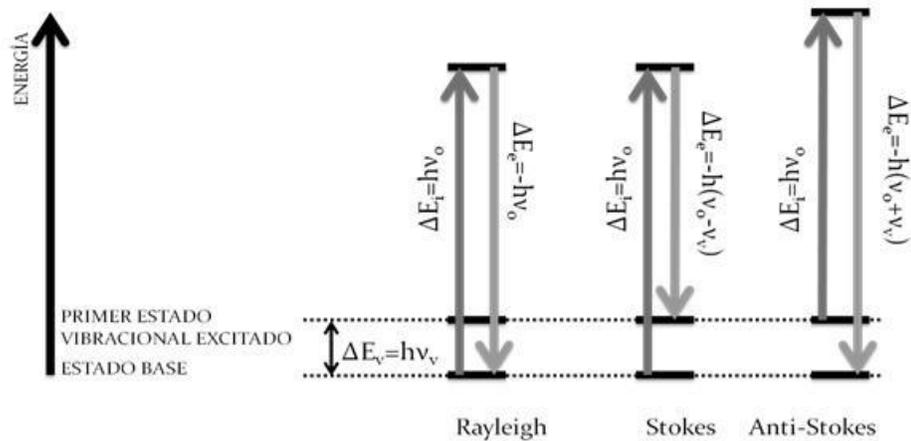
El efecto Raman, que consiste en la dispersión inelástica de un fotón por un electrón en un enlace de una molécula, fue reportado por primera vez por los físicos hindúes C. V. Raman y K. S. Krishnan<sup>47</sup> en 1928 y en ese mismo año, de manera independiente, fue también reportado por los científicos rusos Grigory Landsberg y Leonid Mandelstam.<sup>48</sup> Al parecer, los investigadores rusos descubrieron el fenómeno una semana antes que Raman, pero demoraron varios meses en publicarlo. Por otra parte, Léon Brillouin en 1922 y Adolf Smekal en 1923 habían predicho su ocurrencia, mientras que un grupo de investigadores franceses (Jean Cabannes, Pierre Daure, Yves Rocard y Auguste Rousset) ya habían observado el fenómeno, pero lo interpretaron como corrientes parásitas y solo tras la publicación de Raman comprendieron su error.

Cuando la luz es dispersada por un átomo o molécula, la mayoría de los fotones son dispersados elásticamente, en lo que se conoce como Dispersión de Rayleigh (Figura 1) donde los fotones dispersados tienen la misma frecuencia que los incidentes.<sup>49</sup>

Alrededor de uno de cada  $10^7$  fotones incidentes es dispersado inelásticamente, a frecuencias diferentes de la del fotón incidente y esta radiación dispersada brinda información sobre la composición de la molécula con que interactuó la radiación. En este caso se tienen dos

posibilidades, que se conocen como Dispersión de Stokes y Dispersión de Anti-Stokes (Figura 1) y son las bandas que se conocen como espectro Raman.

Figura 1 Efecto Raman.



En el caso de la Dispersión de Stokes, el fotón incidente interactúa con un electrón que se encuentra en el estado base y le cede una energía igual a  $h\nu_o$ . Al desexcitarse, la molécula emite un fotón con menor energía que el incidente y el electrón queda en el primer estado vibracional excitado,  $E = h\nu_v$ , por lo que la energía del fotón dispersado sería  $E = h(\nu_o - \nu_v)$ . Por el contrario, cuando ocurre una Dispersión Anti-Stokes, el fotón incidente le cede su energía a un electrón que se encuentra en primer estado vibracional excitado y el fotón dispersado tiene una energía  $E = h(\nu_o + \nu_v)$ , quedando el electrón finalmente en su estado base.

El espectro Raman es simétrico con respecto a las bandas de Rayleigh y sus bandas, sean Stokes o Anti-Stokes, contienen información de las transiciones vibracionales permitidas en la molécula y permite de esta forma su identificación. Sin embargo, la intensidad de las bandas de Raman dependen del número de electrones que ocupan los estados vibracionales, según la distribución de Boltzman:

$$\frac{N_1}{N_0} = \frac{g_1}{g_0} e^{-\frac{\Delta E_v}{k_B T}} \quad (1)$$

donde  $N_o$  y  $N_i$  son el número de electrones en los estados inferior y superior de vibración, respectivamente,  $g_o$  y  $g_i$  son la degeneración de estos estados,  $\Delta E_v$  es la diferencia de energía entre estos estados,  $k_b$  es la constante de Boltzman y  $T$  es la temperatura en Kelvin. A temperatura ambiente, el 99 % de los electrones se encuentran en el estado vibracional de menor energía, por lo que es mucho más probable, de ocurrir la dispersión inelástica, que

esta sea de tipo Stokes y no Anti-Stokes. Debido a esto, para la obtención del espectro Raman se utilizan fundamentalmente las bandas de Stokes.

#### 2.1.1 APLICACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS Y COLORANTES

Al igual que la espectroscopía infrarroja (IR), la espectroscopía Raman detecta vibraciones en los enlaces, pero no se detectan por igual las mismas vibraciones en los dos métodos. En infrarrojo se observan vibraciones durante las cuales cambia el momento dipolar, mientras que en Raman las vibraciones que se observan son aquellas que implican un cambio en la polarizabilidad. De manera general puede decirse que los enlaces que conectan dos partes idénticas de una molécula – como el C=C – son más activos en Raman que en IR. Una diferencia importante radica en las vibraciones de estiramiento (*stretching*) de los enlaces O-H, que son muy intensas en IR y muy débiles en Raman, porque este enlace es muy poco polarizable. Como consecuencia, el agua es prácticamente invisible en Raman pero domina el espectro IR cuando está presente.<sup>50</sup>

La espectroscopía Raman ha emergido en los últimos 20 años como una de las técnicas más importantes y efectivas para la identificación de pigmentos y colorantes en obras de arte, debido a su alta especificidad, pequeña cantidad de muestra necesaria, excelente resolución espacial y su aplicabilidad para análisis no destructivo e *in situ*.<sup>11, 12, 13</sup> Se han publicado bases de datos de espectros Raman de pigmentos<sup>14</sup> y se han estudiado pigmentos en manuscritos medievales,<sup>12, 15</sup> autenticación de pinturas del siglo XVII,<sup>15</sup> análisis de posibles fraudes en papiros egipcios, mapas y estampillas,<sup>15</sup> materiales de decoración púnicos (S. I a.n.e.) y estucos iraquíes del siglo X.<sup>15</sup>

En el contexto mexicano, fue aplicada por Vandenaabeele<sup>16</sup> en el análisis de pinturas murales mayas en Ek'Balam, donde pudo comprobarse la presencia de cinabrio, hematita, carbonato de calcio y azul maya. Recientemente, la espectroscopía Raman se ha aplicado como parte del proyecto MOVIL del Instituto de Física de la UNAM para el estudio no destructivo de obras de arte y materiales de interés histórico y arqueológico, sobre todo en el estudio de manuscritos y lítica. Tal es el caso de un libro italiano coloreado de la época novohispana, perteneciente al fondo antiguo del Palacio de Minería,<sup>17</sup> el estudio del papel del Acta de Independencia del Imperio Mexicano de 1821<sup>18</sup> y la Máscara de Malinaltepec del Museo Nacional de Antropología,<sup>19</sup> entre otros casos.

Sin embargo, la aplicación de esta espectroscopía no ha sido tan amplia como se esperaba, fundamentalmente por la débil señal de Raman, lo que

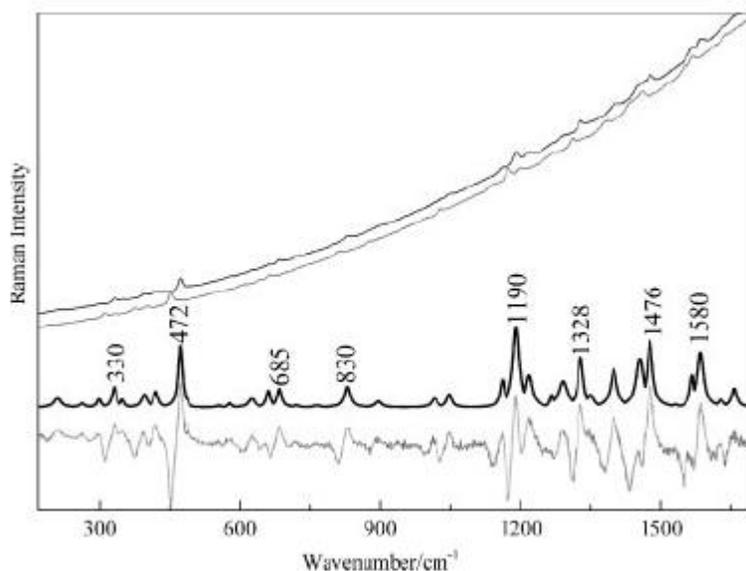
provoca una baja sensibilidad, la fuerte fluorescencia que exhiben bajo la irradiación con láser muchos colorantes orgánicos, así como las resinas y otros compuestos orgánicos utilizados en la preparación,<sup>20, 24, 29</sup> y las interferencias del material de soporte del objeto. Es este el caso del estuco en los murales, el papel en los manuscritos y las fibras de textiles.

### 2.1.1.2 SSRS

Una alternativa que permite eliminar la interferencia de la fluorescencia es la Espectroscopía Raman Corrida Sustraída (SSRS, del inglés *Subtracted Shifted Raman Spectroscopy*), en la que se obtienen varios espectros Raman de la misma muestra, con un pequeño corrimiento entre ellos, se restan y luego se ajusta y reconstruye el espectro resultante, haciendo coincidir cada pico con una Lorentziana.<sup>21, 22</sup> En la Figura 2 se muestran los resultados de aplicar el procedimiento a una muestra de alizarina.

No obstante, este método presenta dificultades relacionadas con la necesidad de contar con el equipamiento adecuado para adquirir los espectros corridos, lo que no es posible en todos los espectrómetros Raman, y con el procesamiento posterior de los datos, que podría resultar arduo. Algunos autores, sin embargo,<sup>22</sup> han reportado la utilización de programas especialmente diseñados para este fin, que pueden ayudar a solventar esta dificultad.

Figura 2  
Aplicación de  
SSRS para obtener  
el espectro de  
alizarina.<sup>21</sup>



### 2.2 SERS

A partir de las dificultades encontradas en el análisis de colorantes orgánicos por espectroscopía Raman, varios grupos de investigadores, tanto

en universidades como en museos, han utilizado la Espectroscopía Raman Amplificada en Superficies (SERS, del inglés *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*)<sup>23</sup> y han encontrado que la SERS permite amplificar significativamente la señal Raman y al mismo tiempo ocurre un proceso de extinción de la fluorescencia.<sup>24, 25, 26, 27, 28</sup> El número de publicaciones en el tema ha crecido de manera importante en las últimas dos décadas, como hacen notar Graham y Goodacre (Figura 3).<sup>51</sup>

En SERS, ocurre un vínculo entre la dispersión elástica por las partículas metálicas y la dispersión inelástica por las moléculas. Se entiende que SERS es primariamente un fenómeno asociado con la amplificación del campo electromagnético alrededor de un pequeño objeto metálico, excitado ópticamente en las cercanías de una resonancia dipolar intensa y aguda, como es el polariton del plasmón de superficie. Los campos dipolares amplificados son re-irradiados y excitan el adsorbato y, si la radiación molecular resultante se mantiene en resonancia (o cerca) con el objeto amplificador, la radiación dispersada será amplificada nuevamente (Figura 4). De esta forma, la SERS más intensa es en realidad una dispersión elástica por el metal, con la frecuencia cambiada.<sup>52</sup>

Figura 3  
Publicaciones  
sobre SERS.<sup>51</sup>

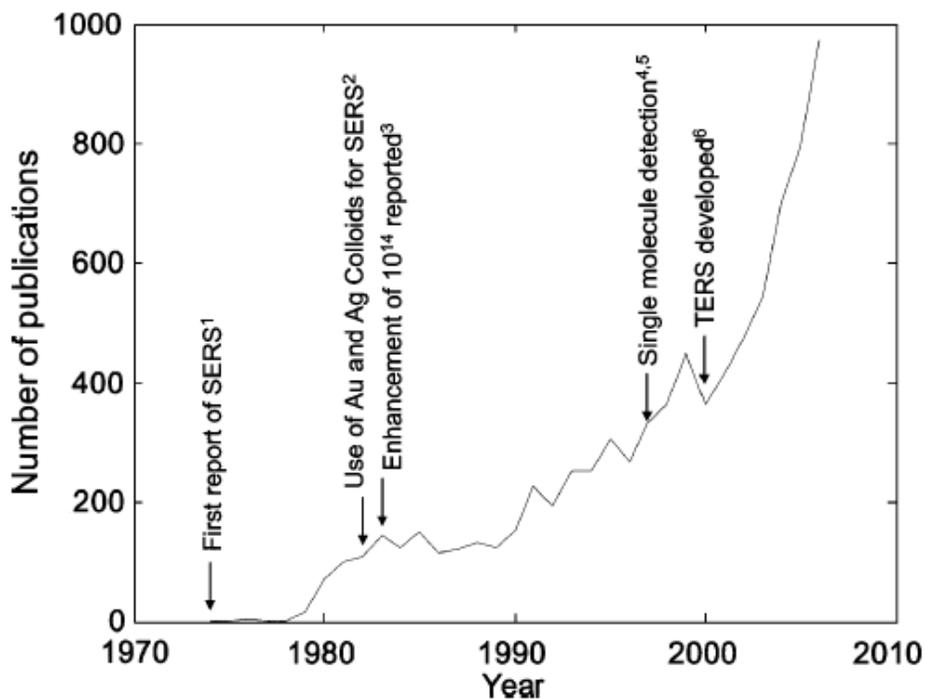
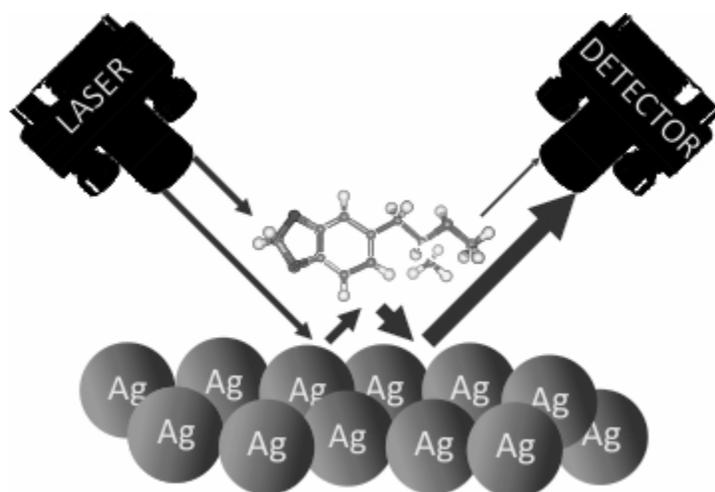


Figura 4 Efecto SERS.



En un trabajo más reciente, Moskovits<sup>20</sup> abunda sobre la aplicación de la teoría electromagnética para explicar la SERS y define la amplificación por SERS como la relación entre la intensidad de la dispersión de Raman en presencia de la partícula metálica y este mismo valor en ausencia de la partícula:

$$G = \left| \frac{\alpha_R}{\alpha_{R_0}} \right| |gg'|^2 \quad (2)$$

donde  $\alpha_{R_0}$  es la polarizabilidad de Raman de la molécula aislada,  $\alpha_R$  es la polarizabilidad de Raman de la molécula más la partícula, una vez que la molécula se encuentra adsorbida,  $g$  es el factor de amplificación de la luz incidente promediada sobre toda la superficie de la partícula y  $g'$  es el factor de amplificación de la luz emitida por la molécula. Para bandas con pequeño número de onda,  $g \approx g'$ . Para la plata, a 400 nm,  $g \approx 30$  y la amplificación por SERS es de aproximadamente  $5 \times 10^5$ .

La polarizabilidad de Raman de la molécula adsorbida difiere de la de la molécula aislada, pues al estar adsorbida la molécula en la partícula metálica pueden ocurrir transferencias de carga en los dos sentidos (del nivel de Fermi del metal al orbital LUMO de la molécula, que es más frecuente, y del orbital HOMO de la molécula al nivel de Fermi del metal), con lo que se alteran las resonancias del sistema. Este fenómeno contribuye a la amplificación química y ocurre frecuentemente en los estudios de SERS, preferentemente cuando el analito es una molécula con nubes electrónicas  $\pi$ .

El tamaño de la partícula influye también en la intensidad de la señal de SERS. En el límite superior, la partícula debe ser menor que la longitud de

onda utilizada para excitar, pues según se acerca el tamaño de la partícula a este valor, comienzan a aparecer modos de excitación que al no ser radiativos no contribuyen a la ocurrencia de SERS. Si las partículas son lo suficientemente grandes, no ocurre amplificación de la señal de Raman. Por otra parte, si las partículas son demasiado pequeñas su conductividad efectiva disminuye como resultado de los procesos de dispersión en la superficie y el plasmón de resonancia se debilita.

El tamaño de partícula es óptimo cuando es menor que la longitud de onda de la luz incidente pero no mucho menor que el recorrido libre medio de los electrones de conducción. En el caso de oro y plata, esto se cumple en el intervalo de los 10 a 100 nm.

La forma de las partículas influye en la intensificación SERS. Para el caso de esferas metálicas que la polarizabilidad ( $\alpha$ ) tiene la forma

$$\alpha = R^3 \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} \quad (3)$$

donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica relativa del metal respecto al medio. La polarizabilidad tiende a un máximo cuando el denominador tiende a cero y con ello se produce la resonancia plasmónica y la máxima intensificación del campo eléctrico en la superficie. Para que  $(\epsilon + 2)$  tienda a cero es necesario que la constante dieléctrica relativa del metal cumpla que  $\text{Re}(\epsilon) \approx -2$  e  $\text{Im}(\epsilon) \approx 0$ , lo que se cumple fundamentalmente para Au, Ag, Cu y, en menor medida, para los metales alcalinos.

La interacción de varias nanopartículas resulta también un elemento importante para la amplificación de SERS. Moskovits y Jeong<sup>53</sup> realizaron mediciones de Raman en nanopartículas aisladas y luego en nanopartículas acopladas utilizando un ligando bidentado, 1,4-bencenoditiol, sobre una superficie de silicio. En el primer caso solo se observa la banda correspondiente al silicio, incluso luego de añadir el ligando. Una vez añadida una segunda dosis de nanopartículas se obtuvo el espectro Raman del ligando.

La amplificación de la señal de Raman en SERS es de aproximadamente  $10^6 - 10^7$ , pero si se logran las condiciones óptimas de tamaño de partícula, longitud de onda incidente y geometría del conjunto partículas – analito este factor puede llegar a ser de  $10^{11}$  o incluso  $10^{14}$  si ocurren también fenómenos de amplificación química.<sup>20</sup> Para lograr este tipo de amplificación, lo ideal es contar con partículas (o rugosidades superficiales) que estén separadas 2 – 3 nm y que el analito se ubique exactamente en el espacio intersticial entre las dos partículas. Una manera común de intentar obtener estas geometrías es por agregación de las partículas, usualmente

con  $\text{KNO}_3$  y en menor medida con  $\text{NaCl}$ , cuando se trabaja con suspensiones coloidales.

Los puntos donde se cumplen estas condiciones se conocen como puntos calientes y una vez que están ocupados por moléculas adsorbidas en la superficie de las partículas, la adición de más adsorbato no provoca un aumento de la intensidad de la señal. Por tanto, solo una fracción de las moléculas adsorbidas participa en estos casos de gran amplificación.

#### 2.2.1 APLICACIÓN DE SERS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS Y COLORANTES

Si bien la SERS comenzó a utilizarse desde 1987 para la identificación de colorantes orgánicos,<sup>31</sup> no fue hasta la última década que comenzó a utilizarse ampliamente. Se han publicado un gran número de trabajos enfocados en la identificación de colorantes puros y a partir de muestras tomadas de obras de arte y objetos arqueológicos,<sup>24, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40</sup> incluso, ha sido aplicada con éxito en la identificación de tintas sintéticas utilizadas en bolígrafos comunes, con fines forenses.<sup>42</sup> Cabe señalar que no existen estudios de SERS sobre materiales mexicanos y sus colorantes, de los cuales una buena parte son propios del país. Además del estudio de bienes culturales, estas investigaciones tienen relevancia en otros ámbitos en los que el uso de colorantes representa un interés económico, como las industrias alimentaria y textil.

Generalmente, se utilizan muestras micrométricas del objeto de estudio, de las que se extrae el analito, utilizando N,N-dimetilformamida o una mezcla de ácido clorhídrico y metanol,<sup>29, 40</sup> aunque se ha reportado que pueden obtenerse mejores resultados utilizando un proceso de hidrólisis con vapores de ácido fluorhídrico en una microcámara y luego aplicando directamente las nanopartículas sobre la muestra.<sup>29, 33</sup>

Utilizando un enfoque no destructivo, varios autores han trabajado en la preparación de sondas de fibra óptica para SERS<sup>54, 55, 56, 57</sup> inmovilizando coloides de plata en el extremo de las fibras, con las que se han obtenido espectros de SERS *in situ* en diferentes materiales y superficies.

En un extenso trabajo publicado en 2006,<sup>24</sup> Chen *et. al.* demuestran con alizarina, ácido carmínico y ácidos laccaicos las ventajas de SERS sobre Raman. En todos los casos se aprecia una extraordinaria mejoría en los espectros obtenidos por SERS, al aumentar la intensidad de los picos y eliminarse el fondo (Figura 5, Figura 6, Figura 7).

Figura 5 Espectros de Raman (izquierda) y SERS (derecha) de alizarina.<sup>24</sup>

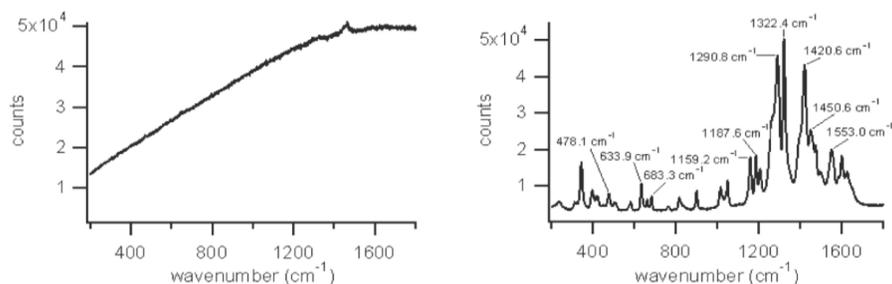


Figura 6 Espectros de Raman (izquierda) y SERS (derecha) de ácido carmínico.<sup>24</sup>

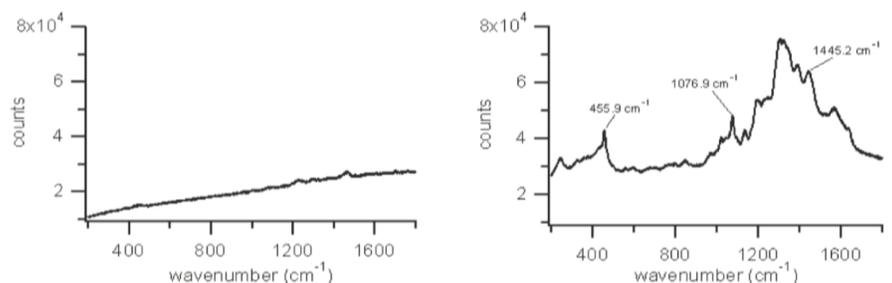
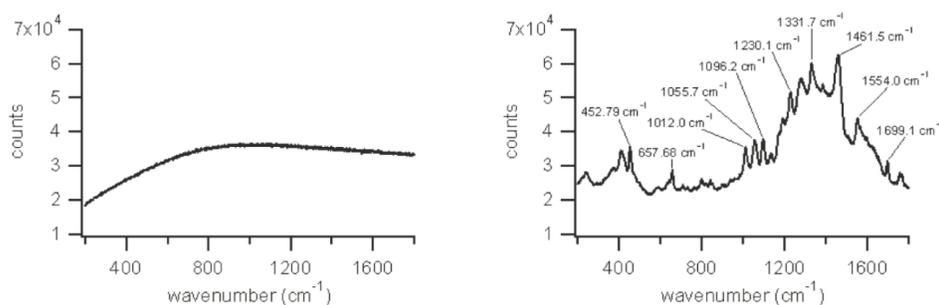


Figura 7 Espectros de Raman (izquierda) y SERS (derecha) de ácidos laccaicos.<sup>24</sup>



En 2009 se reportó la obtención de espectros SERS sin necesidad de tratamientos de extracción o hidrólisis, en muestras de pasteles de la paleta de la pintora Mary Cassat, así como en dos muestras tomadas de una de sus obras.<sup>38</sup> Los autores lograron obtener espectros de SERS de muestras tan pequeñas como un grano de colorante, sin necesidad de tratamiento, solo añadiendo a la muestra 5  $\mu$ L de coloide de plata concentrado mediante repetidas centrifugaciones. Sin embargo, otros autores<sup>58</sup> a pesar de reconocer el paso de avance que representa este resultado, apuntan que los pasteles no tienen mordiente y la siguiente prueba sería identificar los colorantes sobre el fondo de aceite de linaza en las pinturas.

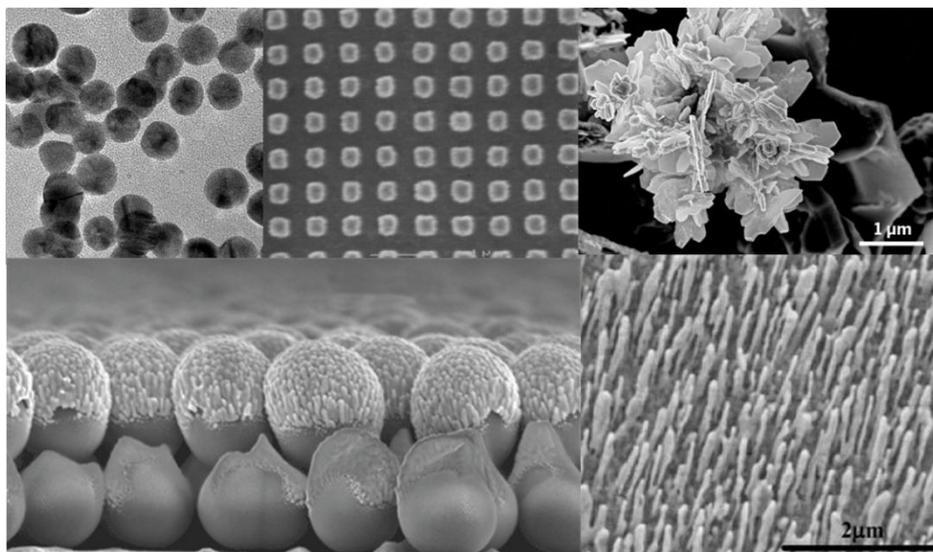
A excepción del trabajo presentado por Leona en septiembre de 2009,<sup>33</sup> donde se utiliza un láser de 488 nm para lograr la excitación de las moléculas estudiadas y donde se produce además un fenómeno de resonancia que incrementa aún más la señal, la mayoría de los estudios

encontrados en la literatura utilizan longitudes de onda de 633 y 785 nm y en menor medida 533 y 1064 nm.

### 2.3 PREPARACIÓN DE SUSTRATOS DE ORO Y PLATA PARA SERS

Para la aplicación de SERS es indispensable el uso de nanopartículas metálicas. El campo del diseño, simulación y preparación de sustratos para SERS crece constantemente, algunos ejemplos se muestran en la Figura 8. Se han reportado numerosos métodos de preparación de nanopartículas de plata y oro para SERS. Los más utilizados son métodos de reducción con citrato de sodio, hidroxilamina o borohidruro de sodio. Además se reportan métodos de formación del espejo de Tollens, evaporación al vacío, depósitos por láser pulsado al vacío, electrodepositos y fotorreducción, entre otros. Para caracterizar las nanopartículas obtenidas se utiliza espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), donde la plata presenta un plasmón de resonancia alrededor de los 400 nm y el oro alrededor de los 530 nm, así como microscopía electrónica de transmisión.

Figura 8  
Sustratos de  
SERS.



#### 2.3.1 MÉTODOS DE REDUCCIÓN

##### 2.3.1.1 REDUCCIÓN CON CITRATO DE SODIO

La reducción con citrato fue reportada por Lee y Meisel en 1982.<sup>44</sup> Con pequeñas variaciones, este método se continúa utilizando para la preparación de coloides de oro y plata.<sup>49, 59, 60</sup> En todos los casos se parte de soluciones de  $\text{AgNO}_3$  o  $\text{HAuCl}_4$ , con concentraciones de  $10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  y  $5 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , respectivamente, que se calientan a ebullición con agitación

vigorosa y luego se añade una alícuota de una solución al 1% de citrato de sodio dihidratado y se mantiene en ebullición y agitando por tiempos que van desde 30 min hasta una hora para formar los coloides de plata, y entre 5 y 25 min en el caso del oro, dando lugar por lo general a nanopartículas esféricas de entre 15 y 45 nm de diámetro.

Es importante asegurar una agitación vigorosa de todo el volumen de reacción para evitar la aparición de centros de nucleación donde se produzca un crecimiento acelerado de las partículas, lo que da como resultado partículas demasiado grandes y con una amplia distribución de tamaño. Además, para evitar que disminuya la temperatura de la mezcla cuando se añade el agente reductor, este se calienta previamente.

El citrato de sodio se añade en exceso en todos los casos (alrededor de 70:1 para la plata y 340:1 para el oro) pues actúa a la vez como agente reductor y como surfactante, para estabilizar el coloide. Esta presencia de citrato de sodio adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas tiene como consecuencia la presencia de bandas de citrato en los espectros SERS de estos coloides, las que deben ser identificadas previamente – adquiriendo el espectro del coloide, sin añadir analito – para evitar asignaciones erróneas al estudiar otras moléculas.

#### 2.3.1.2 REDUCCIÓN CON HIDROXILAMINA

---

Este método fue propuesto por Leopold y Lendl en 2003<sup>61</sup>, quienes estudiaron la influencia del orden y la velocidad de adición de los reaccionantes y obtuvieron rendimientos superiores al 90% en todos los casos, aunque cuando se añadió gota a gota el agente reductor la distribución de tamaño de las partículas fue más amplia, centrada en 67 nm.

Los mejores resultados se reportan para la adición de 10 mL de nitrato de plata,  $10^{-2}$  molL<sup>-1</sup> a 90 mL de una solución de hidroxilamina a pH 9. La reacción es instantánea y se obtienen partículas de plata de 34 nm, como promedio, a temperatura ambiente y con agitación. En este caso no influyó la velocidad de adición, se obtuvieron resultados similares cuando la plata se añadió rápidamente y cuando se añadió gota a gota.

Las condiciones de reacción, la velocidad de la preparación y los resultados reportados convierten este método en una opción muy interesante para la preparación de coloides de plata para SERS.

#### 2.3.1.3 REDUCCIÓN CON BOROHIDRURO DE SODIO

---

La reducción con borohidruro de sodio se propone como un método simple para obtener coloides de plata estables.<sup>49, 62</sup> La reacción transcurre en un baño de hielo y, como en el caso de la hidroxilamina, se añade gota a gota la solución de nitrato de plata a un recipiente que contiene el borohidruro de sodio, siempre bajo agitación vigorosa. Luego se mantiene la mezcla sin agitar durante 1.5 h para finalmente agitar nuevamente durante 10 min. El coloide obtenido es de color amarillo y muestra un pico de absorción máxima en UV-Vis alrededor de los 390 nm. El tiempo y la temperatura de reacción, sin embargo, pueden ser desventajas de este método cuando se compara con el antes mencionado de reducción con hidroxilamina.

Esta metodología se ha reportado también para la obtención de coloides de oro<sup>63</sup>, añadiendo además citrato de sodio a la mezcla de reacción para formar finalmente nanopartículas de 4 nm, predominantemente esféricas.

#### 2.3.1.4 NANOBARRAS DE ORO

---

La combinación de agentes reductores y surfactantes se ha utilizado para preparar nanobarras de oro.<sup>63</sup> En este caso se forman primero nanopartículas de oro de 4 nm, haciendo reaccionar ácido cloroáurico con citrato de sodio y borohidruro de sodio, en baño de hielo y con agitación, para luego mezclar 1 mL de la solución resultante con 9 mL de una mezcla de  $\text{HAuCl}_4$ , bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y ácido ascórbico (solución B). A la solución resultante se le añaden nuevamente 9 mL de la solución B y como resultado se obtienen nanobarras de oro de hasta 600 nm de longitud.

Los autores proponen que el CTAB actúa como un agente director de la dirección preferencial de crecimiento, al adsorberse en las caras de las nanopartículas y formar una bicapa que protege la partícula y evita la adición de nuevos átomos de oro, excepto en los extremos, por lo que el crecimiento ocurre en una sola dirección.

Este método ofrece una alternativa interesante para preparar partículas anisotrópicas que podrían utilizarse con éxito, tal como comprobaron los autores, como sustratos de SERS.

#### 2.3.1.5 REDUCCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

---

Reportada recientemente,<sup>33</sup> la reducción asistida por microondas permite obtener coloides de plata para SERS de manera rápida y controlada. La reacción toma solo 3 - 4 min y se parte de sulfato de plata, obtenido mediante la reacción de una solución de ácido sulfúrico con nitrato de plata, al que se le añaden glucosa y citrato de sodio y se irradian con

microondas en un vial sellado de teflón. Las partículas resultantes presentan un tamaño muy homogéneo ( $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$ ,  $\text{FWHM} = 50 \text{ nm}$ ).

#### 2.3.1.6 ESPEJO DE TOLLENS

---

Para formar el espejo de Tollens, Wang *et. al.*<sup>60</sup> añadieron hidróxido de amonio concentrado a un beaker que contenía  $\text{AgNO}_3$   $0.1 \text{ molL}^{-1}$ , agitando, para formar un complejo de plata. Seguidamente se añade hidróxido de potasio concentrado y nuevamente hidróxido de amonio concentrado, gota a gota, para redissolver el precipitado recién formado. Una alícuota de esta solución se mezcla con otra de dextrosa  $0.5 \text{ molL}^{-1}$  y se vierten sobre un portaobjetos de vidrio, que fue secado al vacío durante la noche.

Este método presenta varios inconvenientes, pues se necesitan varios pasos de reacción para preparar la solución final, es necesario contar con las condiciones para el secado al vacío y por último es un proceso lento. Además, antes de estar listo para ser utilizado en estudios de RAMAN, el portaobjetos preparado debe someterse aún a varios pasos de tratamiento con 4-mercaptopiridina, enjuagues con agua desionizada y secado final en corriente de nitrógeno ultrapuro.

#### 2.3.1.7 ELECTRODEPÓSITOS SOBRE SUSTRATOS DE ALÚMINA POROSA

---

En el mismo artículo,<sup>60</sup> los autores reportan la formación de nanobarras de plata sobre alúmina por electrodepositos. El procedimiento es medianamente complejo e incluye el recubrimiento de membranas de alúmina con capas de Ag de  $1 \mu\text{m}$  de espesor mediante evaporación al vacío para formar un electrodo, sobre el que se depositan luego las partículas de plata por electrólisis y se logra el crecimiento de barras de plata en los poros del  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Posteriormente se lava y seca bajo  $\text{N}_2$  y se fija la película de plata formada sobre un portaobjetos de vidrio utilizando una resina epóxica. El sustrato se trata con hidróxido de sodio concentrado durante 5 h, para disolver el óxido de aluminio, dejando las nanobarras de plata fijadas en el portaobjetos. Por último, como en el caso anterior, se realiza un tratamiento con 4-mercaptopiridina.

Este método presenta desventajas similares a las del espejo de Tollens, debido al número de pasos y el tiempo necesarios para preparar el sustrato final.

#### 2.3.1.8 EVAPORACIÓN AL VACÍO

---

Un último método propuesto también por Wang *et. al.*<sup>60</sup> consiste en la formación de películas de plata mediante la evaporación térmica de polvo de plata sobre un sustrato de vidrio en una cámara de vacío. El método es

más simple que los reseñados previamente, pero supone contar con la infraestructura necesaria para la evaporación.

Otros autores<sup>24</sup> reportan también la utilización de la evaporación al vacío, en este caso de cuentas de plata, seguida por electrodepositos sobre muestras de tejido. En una variante de este último procedimiento, se recubre con alúmina un portaobjetos de vidrio, mediante centrifugación a 2000 rpm y luego se evaporan al vacío las cuentas de plata y se electrodepositan sobre la alúmina.

También se ha realizado la evaporación al vacío para depositar directamente una capa de plata sobre muestras de pintura que contenían alizarina o ácido laccaico.<sup>64</sup> Ambos colorantes fueron identificados exitosamente luego de depositar una capa de 30 nm de nanopartículas de plata sobre la superficie de la muestra. Aunque la técnica es microinvasiva, es de destacar la facilidad con que se logró adquirir los espectros de las dos antraquinonas.

#### 2.3.1.9 DEPÓSITOS AL VACÍO MEDIANTE LÁSER PULSADO

---

Utilizando blancos de oro, Sanchez-Cortés y sus colaboradores<sup>65</sup> recubrieron sustratos de vidrio y de fluoruro de calcio mediante depósitos con un láser pulsado de ArF, con una longitud de onda de 193 nm y una afluencia de  $2.7 \text{ J cm}^{-2}$ . Las partículas obtenidas fueron caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía UV-Vis y se encontró una mezcla de partículas con un diámetro promedio de 7 nm y otras más pequeñas, menores a 2 nm de diámetro.

#### 2.3.1.10 FOTORREDUCCIÓN

---

Se han reportado varios métodos de fotorreducción, algunos de ellos incluyendo el uso de un agente reductor<sup>66, 67</sup> y otros debidos solamente al láser, donde el agua actúa como reductor.<sup>68</sup> En el primer caso, se obtuvieron amplificaciones de la señal de Raman de piridina del orden de  $10^5$  y el sustrato se mantuvo activo por más de 50 días. Sin embargo, es el trabajo de Cañamares<sup>68</sup> el que suscita más interés, por la simplicidad de su aplicación – si se cuenta con el equipamiento adecuado – y la posibilidad de obtener nanopartículas de plata sin la presencia de agentes reductores en el medio. Este primer trabajo de 2007 tuvo una interesante continuación en 2010, con su aplicación al análisis de colorantes en fibras textiles, lo que será discutido más adelante.

#### 2.3.2 TERS

La espectroscopía Raman amplificada por puntas en sondas (del inglés *Tip Enhanced Raman Spectroscopy*) es una variante del SERS que promete ser

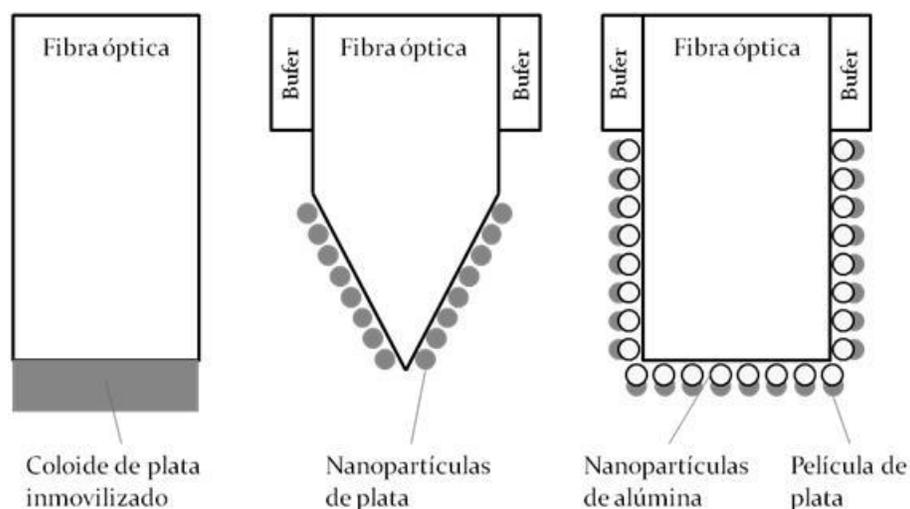
una vía para realizar análisis realmente no destructivos.<sup>54, 55, 56, 57</sup> En este caso se depositan nanopartículas de plata en el extremo de una fibra óptica que se utiliza para transportar la señal del láser de excitación y la señal emitida por el analito.

Para preparar las fibras ópticas se han utilizado varios métodos (Figura 9). Uno de ellos es sumergir la fibra en una solución de  $\text{AgNO}_3$  y citrato de sodio, para luego hacer incidir un láser de 514 nm y provocar la reducción y depósito de los cationes  $\text{Ag}^+$ .<sup>56</sup> También se han utilizado fibras funcionalizadas en un extremo con 3-aminopropil-trimetoxisilano que se sumergen en una solución coloidal de plata.<sup>57</sup> Las partículas de plata interactúan con los grupos funcionales y quedan enlazadas al extremo distal de la fibra. Utilizando este método, los autores pudieron identificar cristal violeta en una colección de disfraces del siglo XIX.

Stokes, en el 2004,<sup>54</sup> utilizó fibras ópticas afiladas en la punta hasta volverlas cónicas, sobre las que se depositó una capa fina de nanopartículas de plata por evaporación. Esto permitió obtener una muy buena resolución espacial y se lograron obtener espectros de colorantes, en condiciones de laboratorio, con límites de detección de 1 ppm. Por último, también se ha reportado la preparación de sensores para TERS mediante el depósito de una capa de nanopartículas de alúmina seguida por otra de nanopartículas de plata en la punta de una fibra óptica,<sup>55</sup> lo que permitió la detección *in situ* de varios colorantes.

Sin embargo, esta técnica necesita métodos precisos y confiables de posicionamiento de las sondas, con una buena resolución espacial, pues es necesario tocar la superficie analizada o al menos acercarse a unos pocos nanómetros de distancia. Además, es necesario controlar con gran precisión los movimientos en el plano de la región analizada, para poder asegurar que se estudia exactamente la zona de interés. La precisión de este movimiento en el plano depende de la resolución espacial de la sonda, es decir, del área que cubra la punta de la fibra óptica. El diseño y construcción de un brazo que cumpla estas condiciones de movilidad y precisión no constituye un impedimento para la aplicación del TERS *in situ* en el estudio de bienes culturales, pero sí pueden aparecer problemas en su uso porque es necesario mantener estable el sistema durante la medición, lo que puede resultar difícil en condiciones de trabajo de campo.

Figura 9 Diseños de fibras ópticas para TERS.<sup>54, 55, 56</sup>



### 2.3.3 SHINERS

Otra variante del SERS es la espectroscopía Raman amplificada por nanopartículas aisladas por una coraza (*Shell-Isolated Nanoparticle-Enhanced Raman Spectroscopy*, SHINERS),<sup>30</sup> donde se sintetizan nanopartículas de oro recubiertas por una capa inerte de Si o Al y se obtiene un polvo.

Al utilizarla, se dispersa una capa muy fina del substrato sobre el material a estudiar y luego se hace incidir el láser del espectrómetro Raman. Se logra así una amplificación de la señal en toda la superficie y pueden estudiarse puntos discretos o toda el área, haciendo un mapeo.

El substrato se desarrolló pensando en el estudio de contaminantes ambientales, en el artículo se pone el ejemplo de naranjas contaminadas con pesticidas, en las que se identifica el contaminante al ser cubiertas con el polvo de nanopartículas y luego estudiadas con un láser de 785 nm, pero para su aplicación en objetos patrimoniales tiene el serio inconveniente de que es necesaria una limpieza posterior del objeto de estudio, para eliminar los restos de nanopartículas. En los casos en que no se pueda garantizar una completa eliminación de estos restos, no será posible utilizar este método.

### 2.4 SERS EN FIBRAS TEXTILES

La identificación de los colorantes fijados en fibras textiles, mediante espectroscopía Raman, presenta varias dificultades, nuevamente ligadas a la pequeña cantidad de colorante presente y a la matriz en que se encuentra. Por otra parte, la aplicación de SERS también se ha topado con desafíos, relacionados a la utilización de un mordiente – comúnmente

alumbre – para fijar la molécula colorante a la fibra. La presencia de aluminio acomplejando al colorante puede interferir en la interacción con la nanopartícula de plata u oro, imprescindible para lograr la amplificación de las señales de Raman. Por estas razones, se han desarrollado diversos procedimientos, que incluyen la extracción del colorante y posterior utilización de nanopartículas, la fotorreducción *in situ* de una solución de nitrato de plata o la aplicación directa de coloides de plata sobre las fibras teñidas.

#### 2.4.1 EXTRACCIÓN E HIDRÓLISIS

Se han encontrado varios procedimientos extractivos<sup>29, 40, 69, 70</sup> y uno de hidrólisis<sup>29, 33</sup> para preparar las muestras de colorantes para SERS. Si bien se reportan excelentes resultados mediante la hidrólisis, en el caso de la extracción se han obtenido resultados de diversa índole y probablemente sea necesario realizar más estudios en esta dirección.

Dos de los métodos de extracción<sup>29, 40</sup> difieren solamente en el primer paso, en un caso se trata la muestra con una mezcla de ácido clorhídrico 3 moleqL<sup>-1</sup> y metanol, 1 : 1, mientras que en el otro el primer paso es el tratamiento con una mezcla de N,N-dimetilformamida y agua (1:1) con 1 % de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). A partir de aquí el procedimiento es común e incluye evaporación a sequedad, redisolución en metanol al 20 % en agua y en algunos casos extracción en fases con tolueno o n-pentanol.

Por otra parte, en un trabajo enfocado a preparar muestras para su análisis por HPLC-MS, Zhang y Laursen<sup>69</sup> compararon la extracción con HCl, EDTA y ácido fórmico. Encontraron que la extracción con HCl provoca la pérdida de los glicósidos de algunos flavonoides, mientras que el EDTA y el ácido fórmico no dañan o dañan muy poco estas moléculas.

Por último, un interesante método de extracción fue patentado por Leona en 2008.<sup>70</sup> Llamado *Matrix Transfer SERS (MT-SERS)*, en este método se utiliza un gel formado por uno de varios hidroxialquil-metacrilatos, que se carga con una solución compuesta por agua, un solvente orgánico (DMF, DMSO o piridina) y un agente quelatante, usualmente EDTA o algunas de sus sales de sodio. El gel se coloca sobre la muestra de textil durante varias horas (4 u 8) a temperatura ambiente y luego se retira. Se añade entonces el substrato de SERS y se puede obtener el espectro del colorante extraído. El método puede aplicarse con ligeras variaciones, como fijar el gel, previamente cargado con la solución de agua : solvente orgánico : agente quelatante y con el coloide de plata, en la punta de una fibra óptica acoplada a un espectrómetro Raman. A pesar de la falta de información

precisa que se encuentra en la patente, parece ser un método de aplicación relativamente fácil y de buenos resultados.

Por último, la hidrólisis<sup>33</sup> se realizó exponiendo las muestras a vapores de fluoruro de hidrógeno por 5 – 30 min en una microcámara. Para esto, se depositaron 5 µL de HF en el fondo de un vial cónico mientras que la muestra se depositó en una tapa de un vial más pequeño, colocada dentro del mayor. El vial grande se cerró y se permitió que los vapores de HF fluyeran a través de él, gracias a unas pequeñas aberturas practicadas en la tapa. El método se basa en el acomplejamiento del aluminio por el HF, lo que libera las moléculas del colorante y se ha reportado también el uso de HF para la extracción de antraquinonas, evitando su hidrólisis, antes de su análisis por HPLC.<sup>71</sup> Para obtener los espectros de SERS se depositó una gota del coloide de plata en la muestra hidrolizada.

#### 2.4.2 FOTORREDUCCIÓN *IN SITU*

En 2010, el grupo español del Instituto de Estructura de la Materia de Madrid publicó un artículo<sup>41</sup> donde se reporta la fotorreducción *in situ* de Ag<sup>+</sup> para formar nanopartículas directamente sobre una fibra teñida, inmovilizada en un portaobjetos e inmersa en una solución de AgNO<sub>3</sub> y bajo la irradiación con un láser de 514 nm.

El trabajo es una ampliación de los estudios de fotorreducción para preparar substratos de SERS, realizados por el mismo grupo (ver epígrafe 2.3.1.10) y permitió la identificación de alizarina, ácido carmínico y flavonoides en fibras textiles teñidas con varios colorantes y plantas (granza, cochinilla, cáscara de cebolla, chilca y palo mora, entre otros). También se logró obtener el espectro de la alizarina presente en una muestra de tejido egipcio.

Por una parte, el método tiene la ventaja de que permite obtener los espectros de colorantes aun cuando se han utilizado mordientes para fijarlos a las fibras. Sin embargo, los picos se observan superpuestos sobre los de carbono amorfo (alrededor de 1300 y 1500 cm<sup>-1</sup>), llegando al caso en que solo se observa el espectro del carbono. Esto habla de la formación de carbono durante el experimento, aunque según los autores no se debe a la combustión de la fibra, sino a fenómenos de fotodisociación de los compuestos orgánicos que la cubren.

Es de resaltar, además, que a pesar de que las condiciones experimentales parecen fáciles de reproducir, algunos detalles deben ser observados cuidadosamente, principalmente el enfoque del microscopio y la

inmovilidad de la platina donde se encuentra la muestra, durante todo el tiempo del experimento.

#### 2.4.3 APLICACIÓN DIRECTA DE NANOPARTÍCULAS

Como parte de un proyecto donde se estudió además la combinación de cromatografía de capa delgada (TLC) con SERS para la separación e identificación de antraquinonas, y la combinación de estas dos con la extracción de los colorantes a partir de fibras teñidas, Brosseau *et. al.*<sup>35</sup> probaron la aplicación directa de coloides de Lee – Meisel sobre fibras de lana mordentadas y teñidas con purpurina, ácido carmínico, granza y amarillo de jazmín.

Es en extremo interesante la facilidad de aplicación de este método y los resultados que se obtienen. Por una parte, se comparó el espectro de una fibra teñida con el obtenido luego de una extracción con ácido fórmico : metanol a partir de la misma fibra y el espectro obtenido directamente es mucho más intenso y con una mejor relación señal / ruido. Por otra parte, se pueden apreciar incluso diferencias cuando la fibra contiene o no mordiente, pues en el caso de la alizarina se observó un corrimiento de las bandas a menores números de onda cuando había aluminio presente.

Por último, el método demostró su utilidad en el estudio de tres muestras reales de textiles europeos, donde logró determinarse la presencia de varios colorantes orgánicos del grupo de las antraquinonas.

#### 2.5 EFECTOS DEL LÁSER EN LOS SUBSTRATOS ESTUDIADOS

Si bien no abundan los estudios dedicados a analizar el efecto del láser utilizado para excitar las moléculas y provocar el efecto Raman, es común encontrar en los artículos dedicados al análisis directo de objetos patrimoniales o históricos referencias al peligro de dañar la muestra.

Algunos trabajos se han orientado directamente a la degradación de pigmentos y colorantes por la acción del láser,<sup>72, 73</sup> otros, aunque no directamente relacionados con el estudio de obras de arte, brindan información sobre el efecto del láser en amino ácidos aromáticos,<sup>74</sup> partículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ <sup>75</sup> y películas delgadas.<sup>76</sup>

Pero volviendo a las obras de arte, en 2001 se publicó un artículo<sup>72</sup> que hacía referencia a la posible confusión ocurrida al analizar, mediante espectroscopía Raman, el cuadro de Boticelli “Trionfo d’ Amore”. El blanco de plomo ( $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ ), utilizado comúnmente en el renacimiento, se degrada por oxidación de los peróxidos ambientales a  $\text{PbO}_2$ , de color negro o café oscuro y es esta por lo general la causa del oscurecimiento de

un gran número de pinturas, desde el gótico hasta el siglo XIX. También puede degradarse por acción de los sulfuros (provenientes de gases sulfurosos presentes en la atmósfera del lugar, por acción bacteriana o por reacción del blanco de plomo con otros pigmentos que contienen sulfuro, como el bermellón) y en este caso se obtiene galena, PbS.

En la obra de Boticelli estudiada, se reportó<sup>77</sup> la presencia de massicot (PbO) en varias zonas del cuadro. Sin embargo, Smith y sus colaboradores<sup>72</sup> sugieren que en realidad se trata de PbO<sub>2</sub> degradado, pues este se transforma en PbO cuando la potencia del láser es mayor de 1.25 mW y en el estudio del “Trionfo d’ Amore” se utilizó una potencia de 5 mW.

En un estudio más reciente,<sup>73</sup> De Santis analiza en profundidad el efecto del láser en la degradación de varios pigmentos presentes en un modelo a escala, realizado probablemente en la segunda mitad del siglo XVII, de un *cembalo* o clavecín. Los autores encontraron evidencias de degradación del índigo, el azul de Prusia, los contaminantes del blanco de plomo y en pigmentos amarillos, probablemente hidróxidos de hierro, utilizando potencias de láser de tan solo 3.2 mW.

El índigo se degrada inicialmente a leuco-índigo, formando granos blancos y puede más tarde convertirse en carbón, lo que indicaría primero un proceso reductivo seguido de combustión en algunos casos. El azul de Prusia, por su parte, da lugar a óxidos de hierro, fundamentalmente algunas fases cristalinas de hematita, lo que se puede apreciar visualmente al cambiar la coloración de la zona a tonos amarillos o naranjas; algo similar ocurre con el hidróxido de hierro presente en las zonas amarillas. Los productos de la degradación ambiental del blanco de plomo, tal como se vio en el caso anterior, dan lugar a la formación de massicot bajo la irradiación del láser, incluso a bajas potencias. En estas zonas se observan granos negros o sombras anaranjadas sobre el fondo blanco.

Una estimación de la temperatura alcanzada localmente en el volumen de dispersión dio como resultado que para el blanco de plomo, sin importar el nivel de potencia del láser, se obtienen siempre temperaturas del orden de los 340 – 350 K, lo que es consistente con la resistencia de este material (no así de sus productos de degradación química) a sufrir daños por el láser.

Para el azul de Prusia se observaron aumentos de temperatura que llegaron a los 1200 K y a partir de los 650 K se pudo apreciar la formación de hematita. El amarillo de hidróxido de hierro tiene un comportamiento similar, con temperaturas que van de 410 K a 800 K. A 800 K, todo el

pigmento se había convertido en hematita. El índigo, finalmente, tuvo picos de temperatura de unos 780 K, si bien en este caso fue más difícil la estimación y el rango de error es de unos 80 K.

#### 2.5.1 ESPECTRÓMETROS RAMAN PORTÁTILES

Parece claro entonces que para evitar degradación de los pigmentos y daños a las obras de arte bajo estudio, lo mejor es trabajar a niveles de potencia bajos, por debajo de 1 mW, con tiempos de adquisición relativamente largos, en dependencia del material estudiado, que pueden llegar a ser de varios minutos.

Dos consideraciones prácticas pueden impedir, en muchos casos, la aplicación de estas condiciones de trabajo. La primera está relacionada con el poco tiempo disponible cuando se realizan trabajos *in situ*, lo que hace necesario llegar a un compromiso de tiempo de adquisición vs calidad de los espectros obtenidos, para lograr obtener la mayor cantidad de datos posibles, sin sacrificar en gran medida su calidad. El otro aspecto tiene que ver con las características de los espectrómetros portátiles: por lo general carecen del control de potencia fino de los espectrómetros de laboratorio, que permite trabajar a niveles de décimas de mW.

En un trabajo publicado en 2007,<sup>45</sup> se realizó una comparación entre cuatro espectrómetros portátiles comerciales y un quinto no comercial. Este último disponía de un sistema de ajuste continuo de la potencia del láser, mientras que dos espectrómetros Renishaw lograban disminuir la potencia mediante el uso de filtros de densidad neutral. Sin embargo, en ningún caso se hace mención de cuál es la potencia mínima que se alcanza en la muestra. Estos tres espectrómetros son, coincidentemente, los de menor facilidad de transporte e instalación.

Los dos restantes, el RSL-1 de Ocean Optics y el Inspector Raman de DeltaNu, son pequeños, compactos y ligeros – y también mucho más baratos – pero la potencia del láser en la muestra es considerablemente alta. El RSL-1 carece de control de potencia, por lo que siempre se trabaja a la potencia máxima de 500 mW. La sonda que se utiliza sí incluye un disparador, que permite limitar el tiempo de exposición de artefacto estudiado a la radiación. Por último, aunque no se menciona en el artículo, por la experiencia de trabajo conocemos que el Inspector Raman tiene un control de potencia discreto, que permite seleccionar cinco niveles, con un mínimo de 20 mW.

### 2.5.2 NUEVAS ALTERNATIVAS: HELIO PARA ENFRIAR

En otra rama del análisis no destructivo de obras de arte, específicamente en el análisis mediante aceleradores de partículas, se ha reportado el uso de una corriente de helio para enfriar la zona en que incide el haz de partículas y minimizar los daños a la muestra.<sup>78, 79</sup> Al igual que en el caso del láser, la energía depositada por los iones, aun los más ligeros como los protones de 3 MeV, es considerable. Si la intensidad del haz es superior a unos nanoamperios se puede quemar y modificar la región analizada.

En sistemas de haz externo, el uso de un flujo de helio permite captar rayos X de menor energía y enfriar la superficie, reducir la cantidad de oxígeno y disminuir el daño al material estudiado. Una metodología similar puede emplearse para los estudios de Raman, de forma tal que se minimicen los daños a la superficie estudiada, como se discutirá más adelante en este trabajo.

### 2.6 COLORANTES ORGÁNICOS MEXICANOS

El índigo y la cochinilla son los dos colorantes orgánicos mexicanos más conocidos, su producción fue ampliamente explotada desde tiempos prehispánicos hasta el siglo XIX. Presente en los objetos prehispánicos comúnmente el índigo se encuentra en forma de “Azul maya”, un pigmento obtenido mediante la mezcla de índigo y paligorskita.<sup>80, 81, 82, 83</sup> El índigo es extraído de varias leguminosas del género *Indigofera*, entre ellas la *Indigofera suffruticosa*, que se muestra en la Figura 10, junto a muestras de tejidos teñidos con el colorante. Actualmente, el índigo es comúnmente utilizado para obtener el color azul de los *blue jeans*.

Por otra parte, la producción de la cochinilla fue registrada por primera vez en la Matrícula de tributos, un código del siglo XVI que detalla los tributos pagados a los aztecas por los pueblos conquistados. Este colorante se produce aun de la misma manera en Oaxaca: los cadáveres secos de *Dactylopius coccus*, un parásito que habita en las hojas de nopal (*Opuntia ficus-indica*), son aplastados y disueltos en agua (Figura 11).

Pero índigo y cochinilla, si bien los más conocidos, son solo dos de los más de veinte colorantes que se mencionan por las tradiciones orales o escritas como fuentes de color en épocas prehispánicas o novohispanas.<sup>84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91</sup> La mayoría produce diferentes tonos de rojos o amarillos, aunque también aparecen algunos azules y negros. En la Tabla 1 se presenta una lista incompleta de estos colorantes, incluyendo su nombre común y *náhuatl*, así como su fuente natural o taxonomía y la estructura química del colorante, en la mayoría de los casos.

Para el colorante rojo *ezquahuitl* no se conoce su fuente natural y no se le puede hacer corresponder con ninguno de los colorantes aún en uso en

México, mientras que se encontraron cuatro posibles fuentes del azul *matlalli*. Por esta razón, la tabla no incluye los componentes químicos de estos colorantes.

En el caso del *cococxihuitl* no se ha aislado e identificado la molécula responsable del color, pero se incluyen en la tabla tres alcaloides que han sido identificados en los extractos de esta planta.<sup>92</sup> Para el *zacatlaxcalli* se incluyó la estructura de la quercetina en base a resultados no publicados de otros investigadores.\*

Figura 10  
Indigofera  
suffruticosa y  
muestras de tejidos  
teñidos.

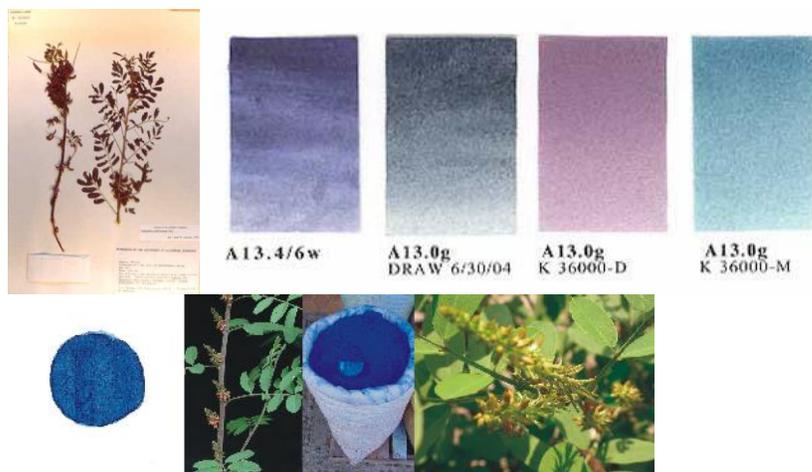
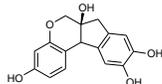
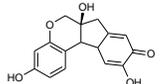
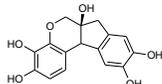
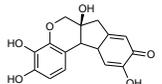
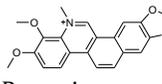
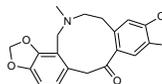
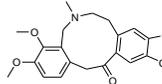
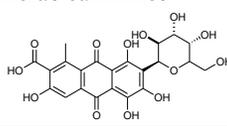
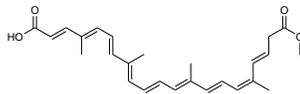
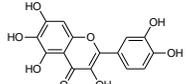
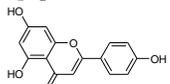
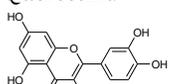


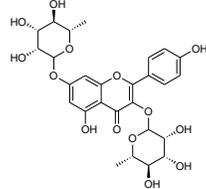
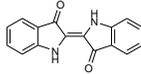
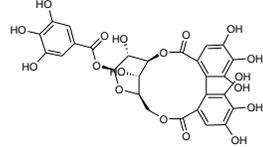
Figura 11  
Cochinilla  
(Dactylopius  
coccus) y  
muestras de  
tejidos teñidos.



\* Araceli Gabriela Galindo Ruíz, Tania Carolina Soto Ruíz, Baldomero Esquivel (tutor); *Estudio químico de la Cuscuta sp (Zacatlaxcalli). Un colorante Natural*, tesis para obtener el título de licenciada en química por la Facultad de Química de la UNAM, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México 2012

Tabla 1 Colorantes mexicanos.

Color	Nahuatl	Fuente	Común	Estructura química
Rojo	Ninguno	<i>Caesalpinia echinata</i>	Palo de Brasil	Brasilina  Brasileína 
Rojo	Posiblemente <i>quamochitl</i>	<i>Haematoxylum campechianum</i>	Palo de Campeche	Hematoxilina  Hemateína 
Rojo	<i>Cococixhuatl</i>	<i>Bocconia arborea</i>		Queleritrina  Protopina  Alocriptopina 
Rojo	<i>Ezquahuitl</i>	Desconocido	<i>Chuh cakché</i> , Palo de sangre	Desconocido
Rojo	<i>Nocheztli</i>	<i>Dactylopius coccus</i>	Cochinilla	Ácido carmínico 
Rojo, naranja y amarillo	<i>Achiotl</i>	<i>Bixa orellana</i>	Achiote, bijol, annato	Bixina 
Amarillo	<i>Cempoalxóchitl</i>	<i>Tagetes erecta</i>	Cempazúchitl	Quercetagetina 
Amarillo	<i>Xochipalli</i>	<i>Cosmos sulphureus</i>		Apigenina 
Amarillo	<i>Zacatlaxcalli</i>	<i>Cuscuta americana</i>		Quercetina 

Color	Nahuatl	Fuente	Común	Estructura química
Azul	Matlalli o matlalin	Confuso: <i>Guaiacum coulteri</i> <i>Commelina celestis</i> , <i>Cissus sicyoides</i> o <i>Calliandra gracilis</i>		Desconocido
Azul	Mohuitli	<i>Jacobinia spicigera</i>	Muitle	Kaempferitrina 
Azul	Xiuhquilitl	<i>Indigofera suffruticosa</i>	Índigo	Índigo 
Negro	Nacazcolotl	<i>Caesalpinia coriaria</i>		Corilagina 

De este grupo, se presentan a continuación algunos detalles del muitle, el palo de Brasil, el zacatlaxcalli, el cempazúchitl y el achiote. El muitle o sacatinta se extrae de la *Jacobinia spicigera* y produce tonos azules y morados. Se ha establecido cierta controversia sobre la estructura del colorante presente en el muitle (Figura 12), se ha afirmado incluso que se trata del índigo.<sup>93</sup> Sin embargo, a partir de los trabajos de Euler<sup>90</sup> y Domíniguez<sup>91</sup> se puede afirmar que el colorante presente en las hojas del muitle es la antocianina kaempferitrina. Más adelante, en el capítulo de resultados, se analizará en más detalle este caso.

El palo de Brasil (*Caesalpinia Echinata*, Figura 13) es probablemente la única planta que le ha dado nombre a un país, Brasil.<sup>94</sup> En 1500, los navegantes portugueses recién llegados a las costas de lo que hoy se conoce como Brasil, encontraron bosques donde abundaba un árbol utilizado por los indígenas para extraer un pigmento rojo. El árbol era muy parecido al que acostumbraban a importar desde Asia y que llamaban “*pau brasil*” o “palo resplandeciente”. Desde entonces, el país adoptó ese nombre. De su madera, así como a partir de otras especies del género *Caesalpinia*, se obtiene la brasilina, brasileína en su forma oxidada. Se utiliza, al igual que la grana, para obtener tonos rojos.

Entre los amarillos se pueden mencionar el achiote, el cempazúchitl y el zacatlaxcalli. El achiote, que también puede dar tonos rojizos y anaranjados, es utilizado ampliamente como colorante alimenticio, sobre todo en la península de Yucatán. Con el mismo objetivo se utiliza en Europa y Cuba, bajo los nombres de *annato* y *bijol*. Su colorante principal es el caroteno bixina, que se extrae a partir de las semillas de la *Bixa orellana* (Figura 14).

A partir del cempazúchitl (*Tagetes Erecta*) se extrae la quercetagina, un flavonoide utilizado comúnmente para lograr tonos amarillos (Figura 15). Además de su tradicional uso en los altares del día de muertos, el cempazúchitl se utiliza también como colorante alimenticio, para darle el tono amarillo – naranja a las carnes de los pollos.

El zacatlaxcalli es otro colorante amarillo, que se extrae de la *Cuscuta americana*, una planta parásita que abunda luego de la temporada de lluvias y puede encontrarse en diversas partes del país. Como ya se mencionó, estudios recientes, no publicados aún, parecen confirmar la sospecha de que su colorante principal es un flavonoide, en este caso la quercetina. En el capítulo de resultados se volverá sobre este tema.

En general, todos estos colorantes son moléculas polares que además contienen dobles enlaces conjugados, o lo que es lo mismo, una nube de electrones  $\pi$  deslocalizados, que son responsables de su poder colorante. Por esta misma razón, la presencia de nubes electrónicas  $\pi$ , estas moléculas son también en su mayoría fuertemente fluorescentes. Estas moléculas son muy polarizables y comoquiera que los cambios en la polarizabilidad son en parte responsables de la amplificación observada en SERS, además de que al contener grupos donores de electrones podrían adsorberse en la superficie de las nanopartículas metálicas, estas moléculas presentan las características necesarias para ser estudiadas mediante esta técnica.

Figura 12 Jacobinia spicigera y muestras de tejidos teñidos.



Figura 13 Caesalpinia echinata y muestras de tejidos teñidos.



Figura 14 Semillas de Bixa orellana.



Figura 15 Tagetes erecta y muestras de fibras teñidas.



Figura 16 Cuscuta americana y muestras de fibras teñidas.



## 2.7 EL ARTE NOVOHISPANO

Desde los primeros tiempos de la conquista, el arte novohispano tuvo una función evangelizadora, los cuadros mezclan escenas de varios momentos de la vida de los santos, lo que permite sintetizar todo lo que es necesario saber sobre una historia.<sup>95</sup> La misma función tenían las pinturas murales de las iglesias y los conventos, incluyendo las que se encuentran en las construcciones de los agustinos en el actual estado de Hidalgo, entre los que se cuentan los ex-conventos e iglesias de Actopan, Epazoyucan e Ixmiquilpan.

Para comienzos del siglo XVII esta primera etapa evangelizadora dio paso al establecimiento del clero en las comunidades urbanas.<sup>96</sup> Las ideas de la Contrarreforma impulsaron un florecimiento de la iconografía religiosa, que incluía pasajes bíblicos, escenas de la vida de los santos y especialmente de sus martirios.

En el contexto novohispano se mezclaban pintores con tendencias flamencas e italianas con pintores nacidos en España pero formados en territorio americano. Andrés de Concha y Simón de Perennys estaban más cerca de la pintura europea, mientras que Baltasar de Echave Orio fue la cabeza de un grupo de pintores que dio forma por primera vez al arte propiamente novohispano.

### 2.7.1 BALTASAR DE ECHAVE ORIO Y EL MARTIRIO DE SAN PONCIANO

Echave Orio nació en Zumaya, Guipúzcoa, en 1558 y se cree que llegó a la Nueva España en 1582, aunque también se ha reportado que ya a la edad de veinte años se estaba formando en la Ciudad de México bajo la tutela de Alonso Franco.<sup>95</sup> Se habla también de un posible viaje a Europa que lo familiarizó con la pintura que se realizaba en el ámbito del Escorial.

Se convirtió en el padre de la identidad pictórica novohispana y en el modelo de varias generaciones de pintores que en las décadas siguientes hicieron citas de sus grandes cuadros. Sus modelos y su paleta se mantuvieron vigentes por más de siglo y medio.

En 1603, las reliquias de San Ponciano arribaron a la Ciudad de México de manos del padre Martín Peláez, quien le encargó una representación de su martirio a Echave Orio. La obra habría de colocarse en uno de los retablos del jesuita Colegio Máximo de San Pedro y San Pablo.

La obra se pintó sobre un panel de madera de pino compuesto por cinco tablones, aunque hasta nuestros días solo ha llegado una parte de ella,

pues se perdió casi la mitad del tablón situado en el extremo derecho. Sobre el cuadro se ha dicho:

*El Martirio de san Ponciano impone un cambio sustancial en la paleta novohispana, detonado por el uso innovador de una amplia variedad de materiales orgánicos con los que Orio introdujo en el panorama pictórico una nueva gama de tonalidades. Asimismo, con el manejo de los fondos de color pardo rojizo, que comparte con otras obras pintadas sobre lienzo, operó la transición de las bases blancas con imprimaturas claras verdosas y amarillas hacia los fondos oscuros. Los artistas del siglo XVII que tuvieron acceso a la producción artística de la genealogía echaviana, aquellos que llegaron a ver su obra desplegada en los programas retablísticos, seguramente adoptaron y renovaron las soluciones colorísticas y efectistas de su obra. La circulación de los “modelos a color” es un fenómeno sobre el que todavía no nos detenemos a pensar.<sup>95</sup>*

#### 2.7.2 LA PINTURA MURAL EN LOS CONVENTOS AGUSTINOS

Desde 1524, varias órdenes religiosas –comenzando por los franciscanos - iniciaron la colonización y evangelización del territorio de la Nueva España. En la zona que hoy ocupa el estado de Hidalgo, los monjes agustinos construyeron a partir de 1540 una serie de templos y conventos monumentales, que servían de punta de lanza en la conquista espiritual de los otomíes. Al encontrarse en territorio “hostil”, los edificios tenían formas arquitectónicas que recordaban fortalezas medievales, con sus anchos y altos muros, terminados en almenas.

La decoración de los templos y conventos agustinos consistía casi exclusivamente en pinturas murales, algunas al fresco y otras realizadas utilizando una técnica similar, bautizada como seudofresco por Toussaint, aunque también se pueden encontrar murales pintados al temple.<sup>97</sup> Entre las más importantes se cuentan las pinturas de Actopan, Epazoyucan e Ixmiquilpan, que fueron descubiertas en el siglo XX – comenzando por las de Epazoyucan en 1922 – al raspar varias capas de cal que las cubrían. Estas pinturas respondían al principio esgrimido por los primeros evangelizadores de que, para el recién converso, la doctrina cristiana entraba mejor por los ojos.<sup>98</sup>

El templo y ex-convento de San Nicolás de Tolentino, en Actopan, se fundó en 1546 por fray Andrés Mata y sus pinturas murales, principalmente las que decoran el cubo de la escalera, constituyen uno de los mejores exponentes de la pintura del Siglo de Oro en América y recuerda a los palacios italianos del renacimiento.<sup>97</sup> En el atrio del ex-

convento de San Andrés Apóstol, en Epazoyucan, se mezclan estilos flamencos e italianos con la influencia española. A diferencia de los dos anteriores, los muros del templo de San Miguel Arcángel de Ixmiquilpan muestran figuras claramente indígenas, con imágenes alegóricas a la eterna lucha del bien contra el mal.

*Figura 17 Templo y exconvento de San Nicolás de Tolentino, Actopan, Hidalgo.*



Figura 18 Pinturas murales en Hidalgo. Ex-convento de San Nicolás de Tolentino, Actopan.



Figura 19 Pinturas murales en Hidalgo. Ex-convento de San Nicolás de Tolentino, Actopan.



*Figura 20 Pinturas murales en Hidalgo. Ex-convento de San Andrés Apóstol, Epazoyucan.*



*Figura 21 Pinturas murales en Hidalgo. Ex-convento de San Andrés Apóstol, Epazoyucan.*



Figura 22 Pinturas murales en Hidalgo. Templo de San Miguel Arcángel, Ixmiquilpan.



Figura 23 Pinturas murales en Hidalgo. Templo de San Miguel Arcángel, Ixmiquilpan.



*Figura 24 Pinturas murales en Hidalgo. Templo de San Miguel Arcángel, Ixmiquilpan.*



# 3 MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 3.1 REACTIVOS

El ácido carmínico con pureza del 96 % y el índigo con pureza del 95 %, utilizados como estándares, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich México. Para la preparación de las nanopartículas metálicas, tanto en la UNAM como en el Instituto de Estructura de la Materia del CSIC, en Madrid,, todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, con pureza del 99.99 %. El agua utilizada en México fue bidestilada y luego desionizada en un equipo Millipore Simplicity, con una resistividad de 18.2 mΩ. En España se utilizó agua tipo I proveniente de un equipo MilliQ Direct, de Millipore.

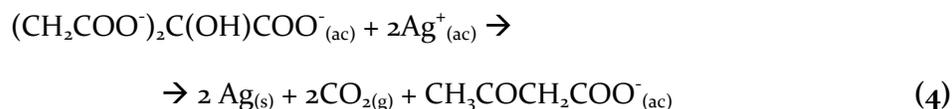
## 3.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS COLOIDALES

Se sintetizaron dos grupos de coloides, uno primero en el Instituto de Física de la UNAM y un segundo grupo en el Instituto de Estructura de la Materia del CSIC, en Madrid (IEM), durante una estancia de esta investigación. Los detalles de cada síntesis se explican a continuación, pero en general se siguieron los procedimientos descritos por Lee – Meisel<sup>44</sup> y por Leopold y Lendl.<sup>61</sup>

### 3.2.1 MÉXICO

#### 3.2.1.1 REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON CITRATO DE SODIO

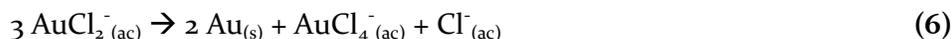
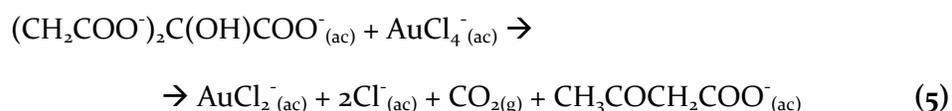
En un balón de reacción de 100 mL, acoplado a un condensador de reflujo, se vertieron 50 mL de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-3}$  molL $^{-1}$  y se calentó a ebullición, agitando vigorosamente. Se añadió entonces 1 mL de una solución al 1 % de citrato de sodio dihidratado y se mantuvo la agitación y el calentamiento durante 30 min. La plata se reduce según la siguiente reacción:<sup>99</sup>



La solución, previamente incolora, tomó una ligera coloración amarilla a los 20 min y al final presentaba un tono amarillo fuerte y una apariencia transparente. Manteniendo estas relaciones molares (68 : 1, citrato : plata) se realizaron varias réplicas con tiempos de reacción de 20, 25, 30 y 60 min. Los coloides resultantes se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis y TEM.

#### 3.2.1.2 REDUCCIÓN DE ÁCIDO CLOROÁURICO CON CITRATO DE SODIO

En el mismo equipo de reacción utilizado en el caso anterior (balón de 100 mL y condensador de reflujo) se añadieron 50 mL de  $\text{HAuCl}_4$   $5 \times 10^{-4}$  molL $^{-1}$  y se calentó a ebullición, agitando. Se añadieron entonces 2,5 mL de la solución al 1 % de citrato de sodio dihidratado, previamente calentado y se mantuvo el calentamiento y la agitación por 5 min. La reducción del oro ocurre en dos pasos:<sup>100</sup>



Con estas mismas relaciones molares (340 : 1, citrato : oro), se realizaron réplicas con tiempos de reacción de 2, 5, 10, 15, 20 y 30 min. El cambio de coloración es instantáneo, la solución inicial es amarilla y el color cambia inmediatamente a negro cuando se añade el agente reductor, para ir cambiando hasta un rojo - violáceo a los pocos minutos. Los coloides se caracterizaron como en 3.2.1.1.

#### 3.2.1.3 REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON HIDROXILAMINA HIDROCLÓRICA

En un vaso de precipitado de 100 mL se añadieron 50 mL de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-3}$  molL $^{-1}$  y se agitaron a 300 rpm con un agitador magnético. Se añadieron

inmediatamente 5 mL de una mezcla de hidroxilamina hidroclicrica e hidróxido de sodio ( $0.015 \text{ molL}^{-1} : 0.03 \text{ molL}^{-1}$ ) y se mantuvo la agitación durante 3 y 5 min.

En una variante de este experimento se añadieron 5 mL de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-2} \text{ molL}^{-1}$  a 50 mL de la mezcla de hidroxilamina e hidróxido de sodio ( $1.5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1} : 3 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ) en un vaso de precipitado de 100 mL y bajo agitación magnética de 300 rpm.

En los dos casos la relación molar hidroxilamina : plata fue de 15 : 1. La reacción es instantánea, así como el cambio de color. La reacción, según reporta James,<sup>101</sup> va acompañada por desprendimiento de nitrógeno:

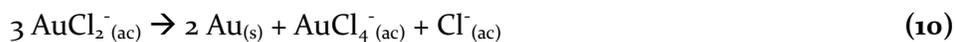
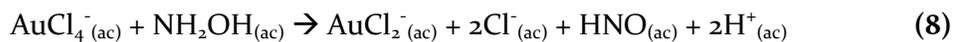


#### 3.2.1.4 REDUCCIÓN DE ÁCIDO CLOROÁURICO CON HIDROXILAMINA HIDROCLÓRICA

Tal como se describió en 3.2.1.3 para el caso de la plata, la formación de coloides de oro por reducción con hidroxilamina se realizó a través de dos variantes. En la primera se colocaron en un vaso de precipitado de 100 mL, 50 mL de  $\text{HAuCl}_4$   $5 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  y se agitaron a 300 rpm antes de añadir de golpe 5 mL de la mezcla de hidroxilamina e hidróxido de sodio,  $0.015 \text{ molL}^{-1} : 0.03 \text{ molL}^{-1}$ . La relación molar es de 30 : 1 (hidroxilamina : oro).

De manera similar a 3.2.1.3, en la segunda variante el beaker contenía 50 mL de hidroxilamina e hidróxido de sodio ( $1.5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1} : 3 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ), bajo agitación magnética a 300 rpm, a los que se añadieron 5 mL de  $\text{HAuCl}_4$   $10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ , con lo que la relación molar fue en este caso 1,5 : 1 (hidroxilamina : oro).

La reacción y el cambio de color asociado fueron, en los dos casos, también instantáneos. En este caso la reducción también ocurre en varios pasos:<sup>102</sup>



### 3.2.2 ESPAÑA

#### 3.2.2.1 REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON CITRATO DE SODIO

Los coloides de plata se sintetizaron por la reducción de  $\text{AgNO}_3$  con citrato de sodio. Se preparó una solución de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  añadiendo 50 mL

de agua a 8.5 mg de la sal y se calentó a reflujo bajo agitación constante. Se virtió entonces 1 mL de una solución de citrato de sodio al 1% (114 mg de la sal en 10 mL de agua) y la mezcla se mantuvo a reflujo por 60 min. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se caracterizó el coloide inmediatamente por espectroscopía UV – Visible y más tarde por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

#### 3.2.2.2 REDUCCIÓN DE ÁCIDO CLOROÁURICO CON CITRATO DE SODIO

Se tomaron 50 mL de una solución de  $\text{HAuCl}_4$   $2.24 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  y se calentaron a reflujo bajo agitación. Se añadió entonces 1 mL de citrato de sodio 1 % y se mantuvo el reflujo por 5 min. La mezcla se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente y se dejó descansar toda la noche. Los coloides se caracterizaron como se explica en 3.2.2.1.

#### 3.2.2.3 REDUCCIÓN DE NITRATO DE PLATA CON HIDROXILAMINA HIDROCLÓRICA

En un Erlenmeyer de 250 mL se virtieron 90 mL de una solución de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$   $1.66 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  y se agitó a 300 rpm antes de añadir 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$   $1 \text{ molL}^{-1}$ . Manteniendo la agitación, se añadieron gota a gota durante un minuto 10 mL de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ , la mezcla se agitó a baja velocidad por otros 10 min y se dejó descansar hasta el día siguiente. La caracterización de los coloides se realizó como en 3.2.2.1.

### 3.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Aunque para este trabajo se utilizaron muestras ya preparadas en experimentos anteriores, se incluye una breve descripción de los métodos de extracción y tinción utilizados. Sin embargo, las muestras de pinturas modernas para el estudio del Raman enfriado por helio sí fueron preparadas como parte de esta investigación.

#### 3.3.1 EXTRACCIÓN

Muestras frescas de cochinilla (*Dactylopius coccus*), achiote (*Bixa orellana*), muitle (*Justicia spicigera*) y zacatlaxcalli (*Cuscuta sp.*) se colectaron o compraron en mercados locales. Luego de limpias, aplastadas (solo para la cochinilla) y secas, fueron maceradas con agua y se dejaron reposar por tres días. El extracto de cochinilla se filtró y luego se liofilizó. Los restantes extractos también se liofilizaron.

#### 3.3.2 TEÑIDO DE FIBRAS DE LANA

Se tiñeron fibras de lana con achiote (*Bixa orellana*), palo de Brasil (*Caesalpinia echinata*), cempazúchitl (*Tagetes erecta*) y muitle (*Justicia spicigera*). El proceso varió en dependencia del colorante, aunque en todos los casos se utilizó 1 kg de fibra. **Achiote:** se maceraron 250 g de semillas de

achiote y luego se pasaron a una solución de amoníaco y jabón (1:1), calentada a ebullición. Se añadieron las fibras y la solución se calentó a 80 °C durante una hora. Al final, se enjuagaron con jugo de limón.

**Cempazúchitl:** se maceraron 2 kg de las flores y se dejaron en agua fría una noche. Luego de 24 horas se calentaron a ebullición en una vasija de cobre durante una hora. La solución se dejó enfriar hasta 40 °C. Se añadieron luego las fibras pre-mordentadas y se dejaron los pétalos para lograr colores más vívidos. Después de añadir las fibras, la solución se calentó a 80 °C durante una hora y al final se sacaron a secar, para luego sumergirlas en un segundo baño y repetir el ciclo de maceración – decocción con flores nuevas. **Palo de Brasil:** 300 g de astillas se maceraron, se hirvieron en agua por tres horas y luego se dejaron reposar tres días. La solución resultante y las fibras pre-mordentadas se calentaron a 80 °C por una hora. Como mordientes, se utilizaron 250 g de alumbre y 60 g de cremor tártaro por kilogramo de fibras. **Muitle:** aproximadamente 2 kg de hojas fueron cortadas en trozos y dejadas en agua durante dos semanas. El líquido remanente se filtró y se añadieron las fibras pre-mordentadas, para luego calentar la solución a 80 °C por una hora.

### 3.3.3 PINTURA SOBRE TABLA

Las muestras de bermellón y ocre se prepararon en paneles de madera, utilizando técnicas de pintura del siglo XVI.<sup>5</sup> **Ocre:** una base de yeso y una imprimatura verde compuesta por tierra verde de Verona (silicatos de  $Al^{3+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Fe^{2+}$ ) y carbón. Se utilizó aceite de linaza mezclado con blanco de plomo como aglutinante. **Bermellón:** base de yeso y la mezcla de aceite de linaza con blanco de plomo como aglutinante, barnizado con resina de copal.

### 3.3.4 PINTURAS MODERNAS

Las pinturas de piroxilina azul y negra se adquirieron de Poly Form. Este tipo de pinturas se utilizaron en obras modernas por los muralistas mexicanos desde la década de 1930.<sup>103, 104</sup> Una cantidad suficiente de pintura se vertió en un pequeño contenedor y se dejó secar durante varios días. Sin ningún otro tratamiento, estas muestras fueron utilizadas para adquirir los espectros de Raman.

Figura 25  
Extractos de  
colorantes. A)  
Ácido carmínico;  
B) Muitle; C)  
Cochinilla; D)  
Zacatlaxcalli; E)  
Achiote.

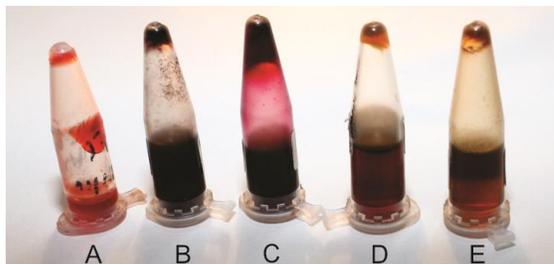
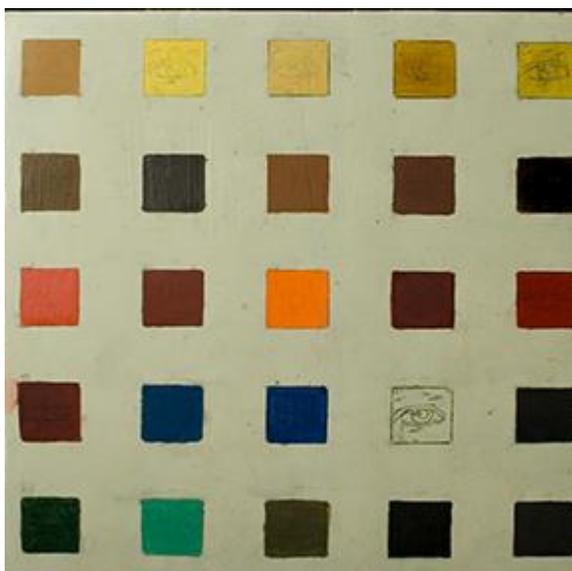


Figura 26 Fibras  
teñidas. A)  
Achiote; B)  
Cempazúchitl; C)  
Muitle; D) Palo de  
Brasil.



Figura 27 Tabla  
pintada con  
técnicas del siglo  
XVI.



### 3.4 ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

Los espectros UV-Vis se obtuvieron en un VARIAN Cary 5000 UV-Vis-NIR Spectrometer y en un espectrómetro Shimadzu UV 3600, realizando un barrido continuo desde 900 hasta 180 nm. La muestra se colocó sin diluir en cubetas de cuarzo, con paso óptico de 1 mm, utilizando agua desionizada 18 mΩ como blanco.

### 3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las imágenes de microscopía electrónica se obtuvieron en un microscopio JEOL JEM 2010F, del tipo FEG (cañón de electrones de emisión de campo

ZrO<sub>2</sub>/W Schottky), con un voltaje de aceleración de 200 keV y una resolución punto a punto de 2,1 nm y 1,9 nm entre líneas. Está equipado con un detector de campo oscuro de gran ángulo (HAADF, High Angle Annular Dark Field), un sistema de barrido por transmisión (STEM, Scanning Transmission Electron Microscopy) y un espectrómetro EDS Noran Advantage. Se utilizaron los modos de operación TEM y STEM, para campo claro e imágenes de contraste Z, respectivamente.

Las muestras se prepararon depositando 2 µL de la solución del coloide sobre rejillas de cobre de 400 mesh (PELCO International), previamente tratadas con 2 µL de parlodian al 2 % en acetato de amilo (SPI Supplies).

Las imágenes se analizaron utilizando los programas Digital Micrograph 1.83.842 de Gatan Inc. e ImageJ 1.42q.

### 3.6 MICROSCOPIA ÓPTICA

Las imágenes de microscopía óptica se adquirieron con un microscopio Edmund Optics E-Zoom6V, equipado con una cámara digital y a un aumento de 5x. En todos los casos, se tomaron las imágenes de la muestra sin analizar y luego de adquirir los espectros de Raman normal y enfriado con helio.

### 3.7 RAMAN Y SERS

Los espectros Raman se obtuvieron utilizando cuatro equipos diferentes, en laboratorios del CCADET, del IFUNAM y del IEM. De ellos, tres son de mesa y uno es portátil, aunque también puede utilizarse en el laboratorio.

En el primero de ellos se utilizó un Nicolet. Almega XR Dispersive Raman (Thermo Scientific) con una longitud de onda de excitación de 532 nm, una potencia máxima del láser de 20 mW, un tiempo de adquisición de 5 s y se promediaron 5 espectros. El rango de adquisición fue de 123 a 4257 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>; la apertura del monocromador fue de 25 µm y la cámara CCD se mantuvo a -50 °C.

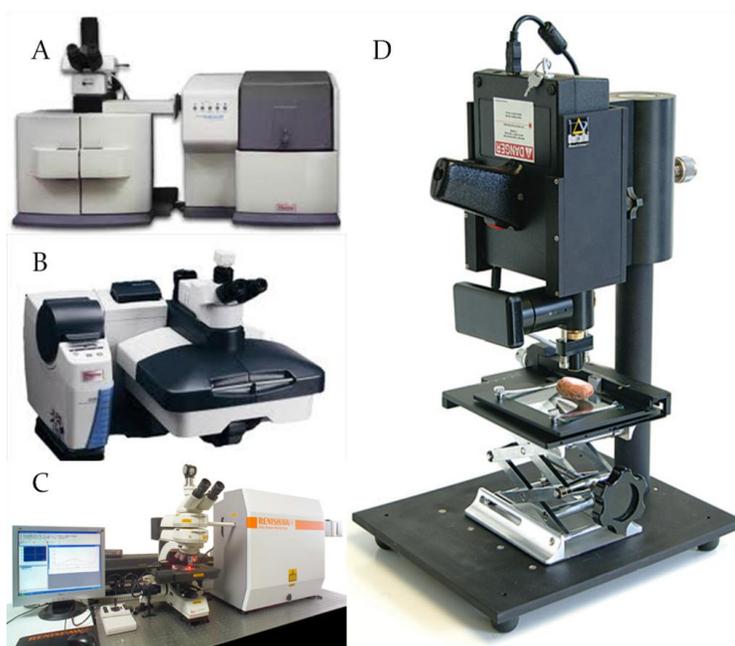
El segundo espectrómetro fue un Inspector Raman, de Delta Nu, con un láser de 785 nm. La potencia del láser varió entre alta (100 mW), media (60 mW) y baja (20 mW), la resolución se mantuvo siempre baja (15 cm<sup>-1</sup>) y se utilizó la corrección de línea base. Además, el tiempo de integración varió entre 2 y 5 s y se promediaron entre 10 y 50 espectros en el rango de 200 a 2000 cm<sup>-1</sup>. Para estudios en líquidos se utilizó el aditamento correspondiente del espectrómetro y viales de vidrio cilíndricos de 1 mL, con aproximadamente 2.5 mm de radio. Este es un equipo portátil, compacto y con un peso de aproximadamente dos kilogramos.

También en el IFUNAM, se utilizó un DXR Raman Microscope, de Thermo Scientific. Se escogió el láser de 532 nm y el mayor objetivo posible, 50x; la potencia varió entre 0.5 mW y 2 mW.

Por último, en el IEM se utilizó un Microraman Renishaw RM 2000, con una longitud de onda de excitación de 514 nm, la potencia del láser en la muestra fue de 2 mW y la resolución del equipo de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Los estudios en solución se realizaron utilizando una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

Los espectros obtenidos fueron analizados con los programas Grams / AI y Omnic, de Thermo Scientific.

Figura 28  
Espectrómetros  
Raman. A) Nicolet  
Almega XR,  
Thermo Scientific;  
B) DXR Raman  
Microscope,  
Thermo Scientific;  
C) Microraman  
Renishaw RM  
2000; D) Inspector  
Raman, Delta Nu.



### 3.7.1 RAMAN Y SERS DE COLORANTES

#### 3.7.1.1 RAMAN DE COLORANTES

Se analizaron muestras de referencia de índigo y ácido carmínico (Sigma-Aldrich), tanto en sólido como en una solución de  $1 \text{ mgmL}^{-1}$ . También se obtuvieron espectros en solución de colorantes extraídos de sus fuentes naturales (índigo, cochinilla, palo de Brasil, muitle y achiote) a varias concentraciones entre  $1 \mu\text{gmL}^{-1}$  y  $1 \text{ mgmL}^{-1}$ , así como de fibras textiles teñidas con cochinilla, muitle, palo de Brasil, achiote y cempazúchitl. Por último, se adquirieron los espectros Raman de muestras sólidas de grana y añil.

#### 3.7.1.2 SERS DE PIRIDINA

---

Para comprobar la actividad como sustratos de SERS de los coloides sintetizados en la UNAM se utilizó una solución de piridina  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  y se estudió el efecto del pH. Para el experimento se obtuvo el espectro Raman de la piridina solamente y luego se mezclaron  $300 \mu\text{L}$  de la solución de piridina con  $300 \mu\text{L}$  del coloide de plata y  $300 \mu\text{L}$  de  $\text{NaCl } 0.2 \text{ mol L}^{-1}$ , a los que se le adquirió también el espectro Raman. El pH de esta última solución se fue variando utilizando  $\text{NaOH}$  y  $\text{HCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a valores de 3, 6, 10 y 12. Bajo las mismas condiciones, se probó el efecto SERS de estos coloides con soluciones de ácido carmínico puro y de extractos de colorantes.

#### 3.7.1.3 SERS DE ÁCIDO CARMÍNICO

---

Los espectros de SERS del ácido carmínico puro se obtuvieron primeramente en el espectrómetro Renishaw RM2000 a  $514 \text{ nm}$ , utilizando los coloides de plata preparados en el IEM por reducción con citrato ( $\text{AgCt}$ ) y con hidroxilamina ( $\text{AgHx}$ ). Se promediaron 15 espectros de 2s y se realizó un primer estudio de la influencia del pH. Los niveles de pH (ligeramente ácido, neutro y ligeramente básico) se controlaron añadiendo  $\text{HNO}_3$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  o  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , según el caso.

Un segundo estudio del ácido carmínico se realizó en la UNAM con el espectrómetro Inspector Raman a  $785 \text{ nm}$  (ver condiciones en 3.7.1.2), utilizando los tres coloides preparados en el IEM. En este caso se trabajó con pH de 2 a 13, utilizando  $\text{HCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$  y  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$  para controlarlo.

En todos los casos se trabajó con muestras de poco más de  $1 \text{ mL}$ , conformadas por  $900 \mu\text{L}$  de coloide,  $40 \mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$   $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  para provocar la agregación y  $100 \mu\text{L}$  de ácido carmínico  $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 3.7.1.4 SERS DE EXTRACTOS

---

Para preparar las muestras de extractos acuosos se mezclaron  $900 \mu\text{L}$  de coloide con  $40 \mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$   $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  y luego se añadieron  $100 \mu\text{L}$  del colorante ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). El pH de la mezcla se ajustó con  $\text{NaOH } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . Todos los espectros se adquirieron en el espectrómetro Inspector Raman, con las condiciones señaladas en 3.7.1.2.

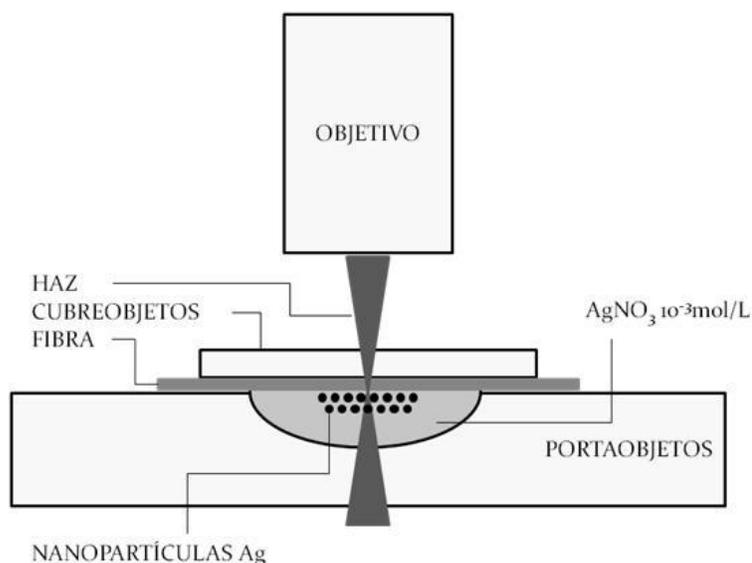
#### 3.7.1.5 FOTORREDUCCIÓN *IN SITU* SOBRE FIBRAS TEÑIDAS

---

La fotorreducción *in situ* se realizó con el Renishaw RM2000, utilizando el láser de  $514 \text{ nm}$ . Un fragmento de aproximadamente  $10 \text{ mm}$  de fibra de lana teñida se fijó a un cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjetos con

una cavidad llena de una solución de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-3} \text{ mol/L}$ . El haz del láser se enfocó en la cara interna del portaobjetos, que corresponde con la zona de la interfase vidrio (fibra) /  $\text{AgNO}_3$ , utilizando un microscopio óptico Leica y un objetivo Leica PLAN de 100x, como se muestra en la Figura 29. Los tiempos de reacción variaron entre 20 y 60 min y se tomaron espectros consecutivos cada 2 min. Una metodología similar se aplicó en la UNAM, con el espectrómetro DXR Raman Microscope (Thermo Scientific), pero en este caso, debido a las características del equipo, se utilizó un objetivo de 50x.

Figura 29 Arreglo para la fotorreducción in situ.



### 3.7.1.6 SERS DE FIBRAS TEÑIDAS

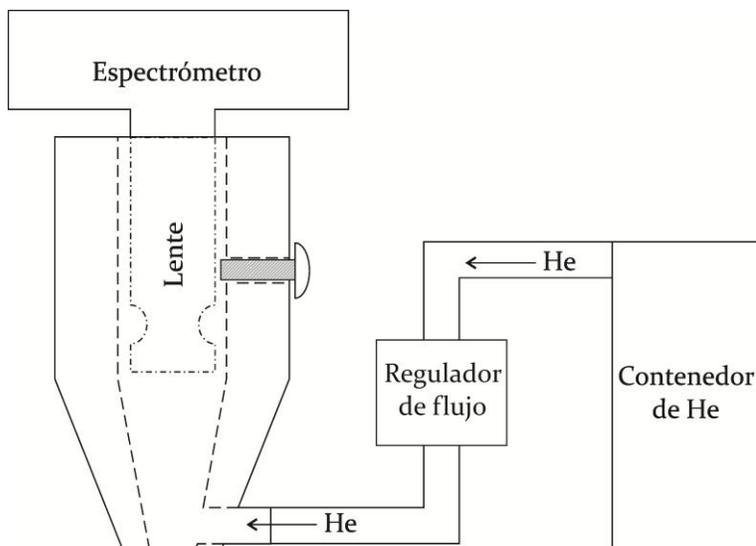
Para las fibras teñidas, se mezclaron 20  $\mu\text{L}$  de coloide con 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{KNO}_3$   $0.5 \text{ mol/L}$  y luego se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla sobre la fibra, fijada en un cubreobjetos. Los espectros SERS se adquirieron a diferentes tiempos, con la fibra completamente húmeda o una vez que se había secado completamente. En todos los casos se utilizó el Inspector Raman con el aditamento NuScope para enfocar la región de estudio. Las condiciones de adquisición fueron las mismas del epígrafe 3.7.1.2.

### 3.7.2 RAMAN ENFRIADO CON HELIO

Se realizaron los experimentos adquiriendo espectros de Raman normal y otros utilizando una corriente de helio. Los espectros se adquirieron en el Inspector Raman, con las potencias máxima (100 mW) o mínima (20 mW). Los tiempos de integración variaron de 1 a 10 s y en cada experimento se promediaron de 2 a 3 espectros. Para el enfriamiento por helio se diseñó y utilizó un colimador *pinhole* acoplado a una línea de helio a través de un

controlador de masa del flujo de gas (Mass-Trak, Sierra Instruments, modelo 810C-DR-13-V4-S4-MP, rango: 0 - 10 Standard Liter per Minute, SLPM). Los flujos de helio variaron entre los 2 y los 9 SLPM. El arreglo utilizado se muestra en la Figura 30.

Figura 30 Arreglo para el Raman enfriado por helio.



### 3.7.3 RAMAN DE PINTURA MURAL

Los estudios de pintura mural se realizaron en ex-conventos e iglesias del estado de Hidalgo. Por la altura a que se encontraban las imágenes, desde poco más de 1 m hasta unos 4 m, en una escalinata, el espectrómetro se montó sobre un andamio, utilizando una base móvil y un brazo o un trípode, en dependencia de las circunstancias. Se utilizó siempre el Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm, con tiempos de integración de entre uno y cinco segundos, realizando solo una adquisición o tomando tres espectros y promediando, en dependencia de la resistencia del material a la degradación inducida por el láser.

Figura 31  
Adquisición de  
espectros de  
Raman de pintura  
mural. Ex-  
convento de San  
Nicolás de  
Tolentino,  
Actopan, Hidalgo.



Figura 32  
Adquisición de  
espectros de  
Raman de pintura  
mural. Ex-  
convento de San  
Andrés Apóstol,  
Epazoyucan,  
Hidalgo.



# 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En este capítulo se presentarán y discutirán los resultados de la investigación. Una buena parte tratará de los intentos de establecer una metodología para la identificación, en el laboratorio, de varios colorantes orgánicos comúnmente utilizados en México. Se analizarán también los resultados obtenidos al acoplar un flujo de helio al espectrómetro Raman, para solucionar problemas de degradación de los materiales estudiados por la acción de láser, en los frecuentes casos de estudios de objetos que no pueden ser analizados mediante SERS. Se presentarán además estudios *in situ* de pintura de caballete y pintura mural.

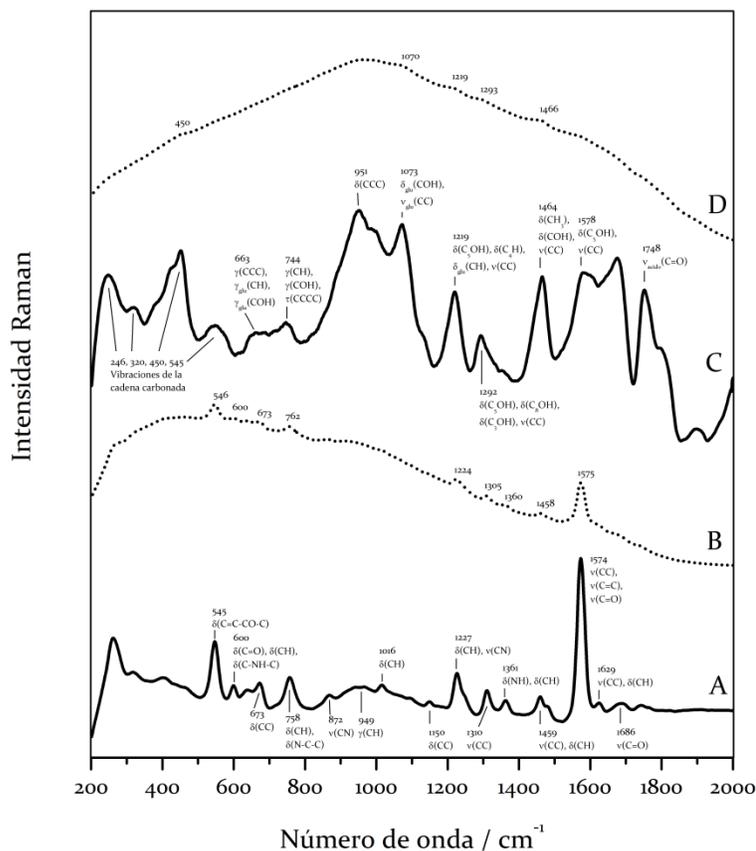
## 4.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN DE COLORANTES

Uno de los objetivos principales de esta tesis es establecer una metodología para la identificación de colorantes orgánicos en obras de arte y en objetos de interés histórico. Como primer paso, se adquirieron los espectros de Raman de muestras de colorantes puros sólidos y en solución, de colorantes extraídos a partir de sus fuentes naturales, también en sólido y en solución, de muestras de fibras teñidas de la manera tradicional y de muestras sólidas de colorantes, también preparados con métodos artesanales.

La extracción de los colorantes y el teñido de las fibras, aunque fueron descritos en el capítulo anterior (3.3.1 y 3.3.2), no se discuten aquí porque

no se realizaron como parte de este trabajo y solo se utilizaron las muestras ya preparadas.

Figura 33  
 Espectros Raman de ácido carmínico e índigo sólidos. A) Índigo con corrección de línea base; B) Índigo sin corrección de línea base; C) Ácido carmínico con corrección de línea base; D) Ácido carmínico sin corrección de línea base. Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm.



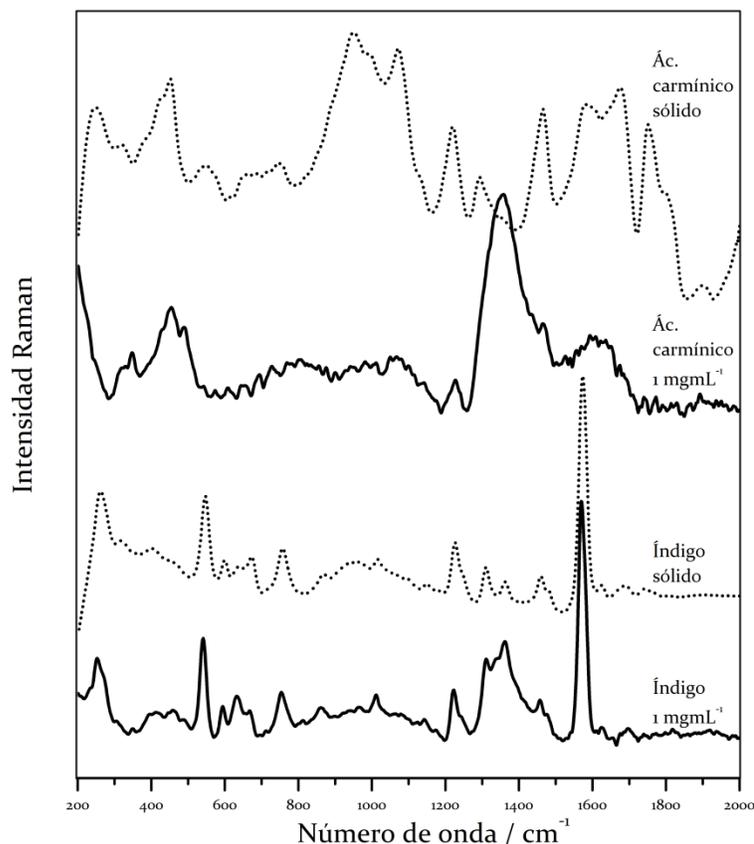
En primera instancia, los colorantes puros estudiados fueron el índigo y el ácido carmínico y los espectros se pueden observar en la Figura 33. Los espectros sin corregir de ambas sustancias presentan una fuerte fluorescencia que enmascara los picos de Raman característicos de cada una de ellas, aunque la interferencia es mucho más importante para el ácido carmínico (Figura 33, B y D). Sin embargo, si se realiza una corrección de línea base se obtiene un espectro de mucha mayor calidad donde pueden identificarse claramente los picos correspondientes a la dispersión Raman de las moléculas (Figura 33, A y C). Esta corrección está incluida en el programa de adquisición del Inspector Raman y se realiza en varios pasos, primero se adquiere el espectro y se le aplica una transformada de Fourier, luego se trunca y se conservan solo las primeras frecuencias, se aplica una transformada inversa y se le restan los datos transformados a los datos originales.<sup>105</sup> De esta manera se logra eliminar gran parte de la interferencia debido a la fluorescencia.

En la Tabla 2 se muestran en detalle los picos de dispersión de Raman observados para el índigo y el ácido carmínico, así como su correspondencia con los espectros de estas moléculas previamente reportados. En el caso del índigo la mayoría de los picos observados coinciden con lo reportado mientras que para el carmínico aumenta el número de picos no reportados y están ligeramente corridos con respecto a los encontrados en la literatura. Además, aunque los picos del espectro Raman del ácido carmínico correspondientes a 663, 744 y 951  $\text{cm}^{-1}$  han sido previamente asignados al citrato de sodio utilizado como agente reductor en la preparación de sustratos para SERS, en la muestra analizada también se encontraron aun cuando se trataba de la sustancia pura.

	Índigo				Ácido carmínico			
	$\text{cm}^{-1}$	Reportado	$\text{cm}^{-1}$	Reportado	$\text{cm}^{-1}$	Reportado	$\text{cm}^{-1}$	Reportado
<i>Tabla 2 Bandas de Raman de índigo y ácido carmínico.</i>	264	No	1150	Sí	246	No	1071	Sí
	320	No	1227	Sí	321	No	1133	No
	403	No	1310	Sí	375	No	1219	Sí
	547	Sí	1361	Sí	426	No	1292	Sí
	599	Sí	1459	Sí	450	Sí	1348	Sí
	635	No	1485	Sí	545	Sí	1464	Sí
	671	Sí	1572	Sí	663	Sí	1578	Sí
	758	Sí	1629	Sí	744	Sí	1675	No
	872	Sí	1686	Sí	951	Sí	1748	Sí
	949	Sí	1742	Sí	966	No	1801	No
	1016	Sí			985	No	1892	No
					998	No		

Es poco probable que en una investigación de un objeto real se encuentren estos colorantes con alto nivel de pureza y a una gran concentración, por lo que se adquirieron los espectros de soluciones acuosas de índigo y ácido carmínico con concentraciones de 1  $\text{mgmL}^{-1}$ , que se muestran en la Figura 34, donde se puede apreciar la menor intensidad y cantidad de los picos obtenidos. A pesar de ello, en el espectro del índigo pueden observarse con claridad varios picos característicos, lo que resulta más difícil para el ácido carmínico, para el que se observan claramente solo algunos picos en la región de 300 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . En ambos casos se aparece un pico ancho alrededor de 1400  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente al agua.

Figura 34  
 Espectros Raman  
 de ácido carmínico  
 e índigo, sólidos y  
 en solución.  
 Inspector Raman,  
 $\lambda = 785 \text{ nm}$ .

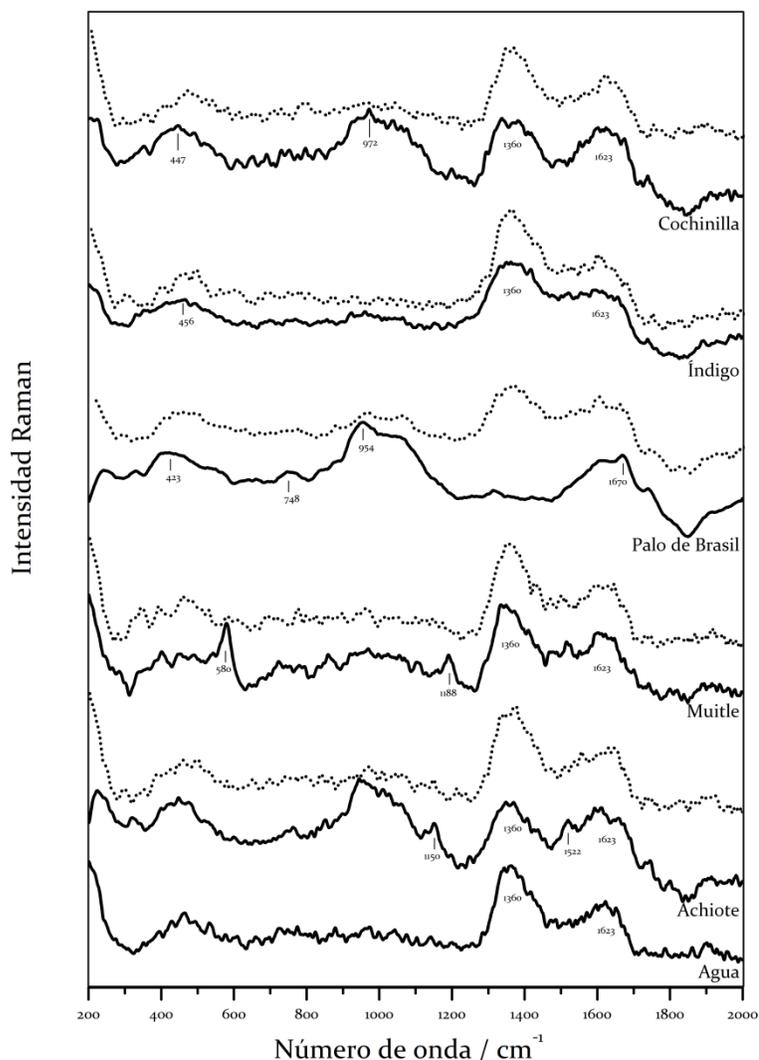


Manteniendo la misma lógica de acercarnos lo más posible a situaciones reales, se estudiaron muestras de cochinilla, índigo, palo de Brasil, muitle y achiote, extraídos de sus fuentes naturales y disueltos en agua a una concentración de  $1 \text{ mgmL}^{-1}$ , así como un espectro de agua tomado como referencia. En la Figura 35 se observa un espectro muy similar en varios de ellos, con una fuerte interferencia del agua.

El espectro de la cochinilla muestra una gran cantidad de picos que lo diferencian del espectro del agua en la zona de  $600 \text{ a } 1200 \text{ cm}^{-1}$ , algo similar ocurre para el achiote y el muitle, este último con un pico claramente diferenciable en  $585 \text{ cm}^{-1}$ . El espectro del palo de Brasil fue el más intenso pero con picos muy anchos, mientras que el del índigo es muy similar al del agua.

Los espectros de estos mismos colorantes a una concentración diez veces menor ( $100 \text{ }\mu\text{gmL}^{-1}$ ) se muestran también en la Figura 35. Las señales características que lograban apreciarse a concentraciones de  $1 \text{ mgmL}^{-1}$  se pierden al diluir la muestra y los espectros observados prácticamente coinciden con el del agua.

Figura 35  
 Espectros Raman de cochinilla, índigo, palo de Brasil, muitle, achiote y agua. Los colorantes están presentes en una concentración de  $1 \text{ mgmL}^{-1}$  (línea sólida) y  $100 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$  (línea punteada). Inspector Raman,  $\lambda = 785 \text{ nm}$ .



Por otra parte, el estudio de las muestras textiles teñidas con colorantes también resulta de interés. En la Figura 36 se muestran los espectros Raman de cochinilla, palo de Brasil, muitle, achiote y cempazúchitl obtenidos a partir de fibras textiles teñidas. En general, todos presentan señales de muy baja intensidad y muy baja relación señal / ruido, por lo que resulta difícil distinguir señales características de los colorantes.

Por último, se estudiaron dos muestras de grana y añil en granos (Figura 37). Pueden observarse señales características del ácido carmínico y el índigo, aunque en el caso de la grana los picos más agudos se aprecian solamente por encima de los  $1600 \text{ cm}^{-1}$  y el resto de las bandas características del ácido carmínico son difíciles de distinguir. En la

muestra de añil pueden apreciarse con mayor claridad las señales alrededor de 600 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes al índigo.

Figura 36  
Espectros Raman de cochinilla, palo de Brasil, muitle, achiote y cempazúchitl obtenidos a partir de fibras textiles teñidas. Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm.

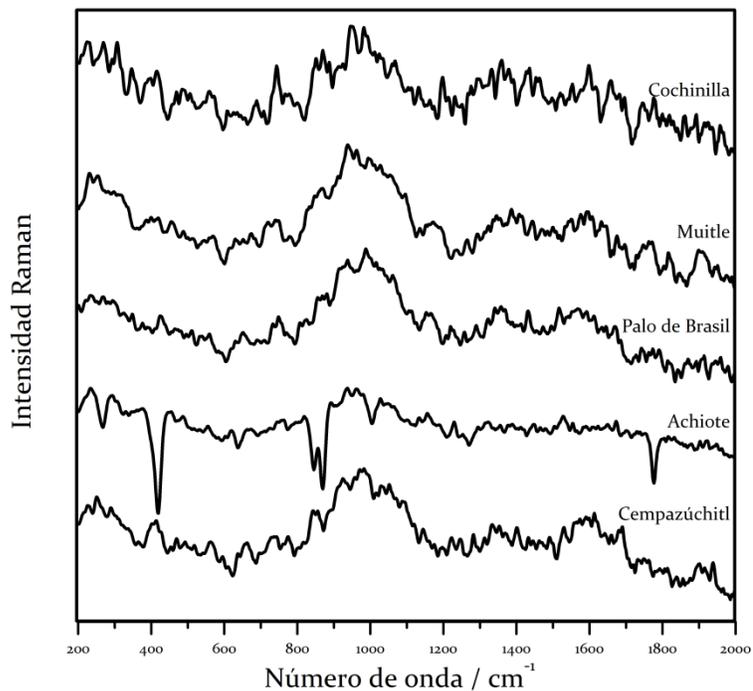
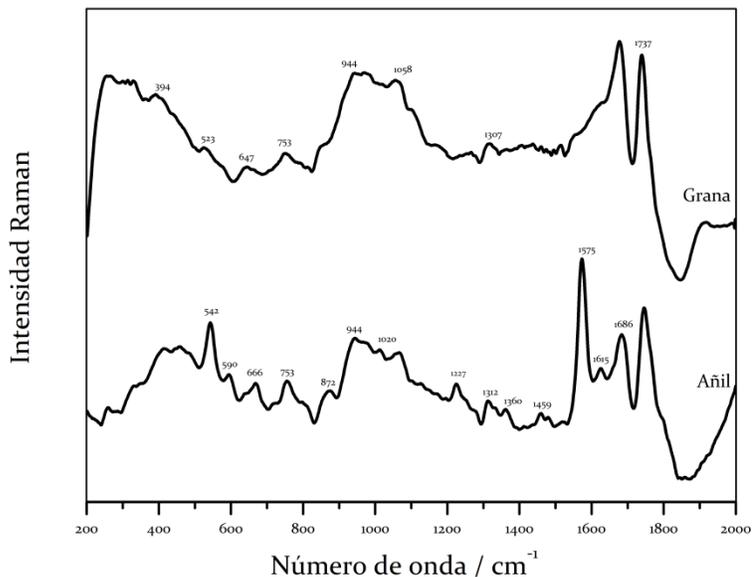


Figura 37  
Espectros Raman de grana y añil. Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm.



En general, si bien fue posible obtener espectros Raman con buena calidad de los colorantes puros sólidos y en solución, no fue posible repetir estos resultados para los colorantes extraídos de sus fuentes naturales y diluidos

a varias concentraciones. Tampoco se obtuvieron buenos resultados al estudiar fibras textiles teñidas por los métodos tradicionales. Se hizo necesario entonces utilizar la Espectroscopía Raman Amplificada en Superficies, para lo que el primer paso es la preparación de los sustratos.

## 4.2 SERS DE COLORANTES

### 4.2.1 COLOIDES DE PLATA Y ORO

Se han reportado muchos métodos para preparar sustratos de SERS (ver epígrafe 2.3) y el número sigue creciendo según se van desarrollando nuevas técnicas o se llevan a la práctica los resultados de estudios de simulación. Sin embargo, los métodos de reducción siguen siendo de los más utilizados, fundamentalmente por su simplicidad y por los buenos resultados que se han alcanzado en la obtención de los espectros SERS de varios tipos de moléculas orgánicas,<sup>26</sup> aun cuando los mismos autores reportan que es difícil preparar diferentes lotes de coloides con la misma actividad SERS, incluso bajo condiciones de reacción cuidadosamente controladas.<sup>33</sup> Para este trabajo, por su simplicidad de preparación y por los buenos resultados reportados generalmente cuando se utilizan como sustratos de SERS, se eligieron los métodos de reducción con citrato de sodio<sup>44</sup> e hidroxilamina.<sup>61</sup>

Los primeros experimentos de síntesis de nanopartículas se realizaron variando el agente reductor, la relación molar agente reductor / metal, el tiempo y la temperatura de reacción, tanto para los coloides de plata como los de oro. Para caracterizarlos se obtuvo el espectro de absorbancia UV-Vis en busca de la presencia del plasmón de superficie, al que se le determinó la longitud de onda del máximo así como el ancho a la mitad de la altura del pico, como una medida de la distribución de tamaños de las partículas. Los espectros de absorbancia se pueden observar en la Figura 38 y la Figura 39.

Como se puede apreciar a partir de los espectros de absorbancia, en el caso de los coloides de plata los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó la hidroxilamina como agente reductor, con picos intensos y relativamente estrechos del plasmón, indicación de una distribución de tamaños de partícula relativamente homogénea. Para el caso de la utilización del citrato de sodio el pico más estrecho para el plasmón de resonancia se obtuvo cuando se llevó a cabo la reacción a 100 °C durante 30 min. En todos los casos mostrados los coloides se mantuvieron estables durante varios meses.

En el caso del oro, aunque se encontró también que es más efectiva la hidroxilamina, lograron obtenerse buenos resultados utilizando citrato, limitando el tiempo de reacción a 5 min. Sin embargo, las suspensiones obtenidas no presentaron la estabilidad mostrada por los coloides de plata y precipitaron luego de aproximadamente una semana de sintetizadas. El ancho de los picos del plasmón indica una mayor dispersión de tamaños de las nanopartículas. Además, en lugar de lograrse una coloración rojo – violácea, como se esperaba, los coloides tomaban un color muy oscuro, casi negro y solo a trasluz podían observarse tonos violetas.

Figura 38  
 Espectros de absorbancia UV-Vis de coloides de plata.  
 AgCt: coloides de plata reducidos con citrato; AgHid: coloide de plata reducidos con hidroxilamina.

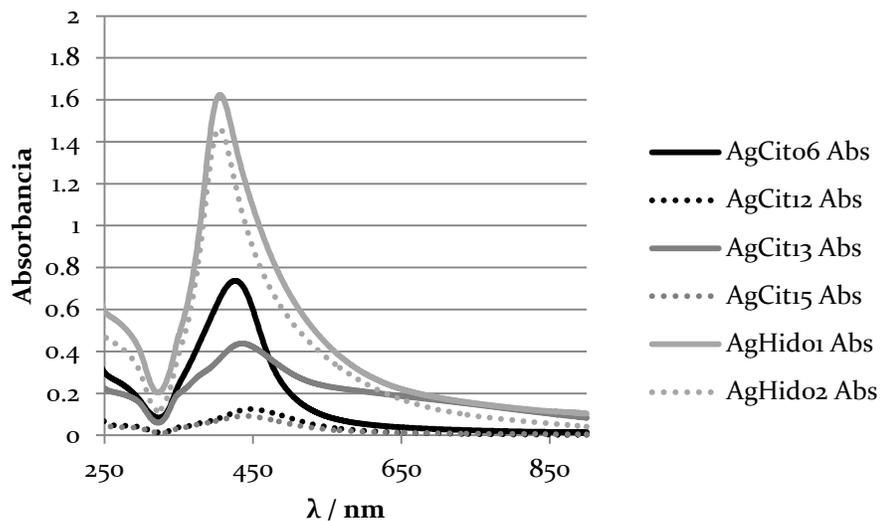
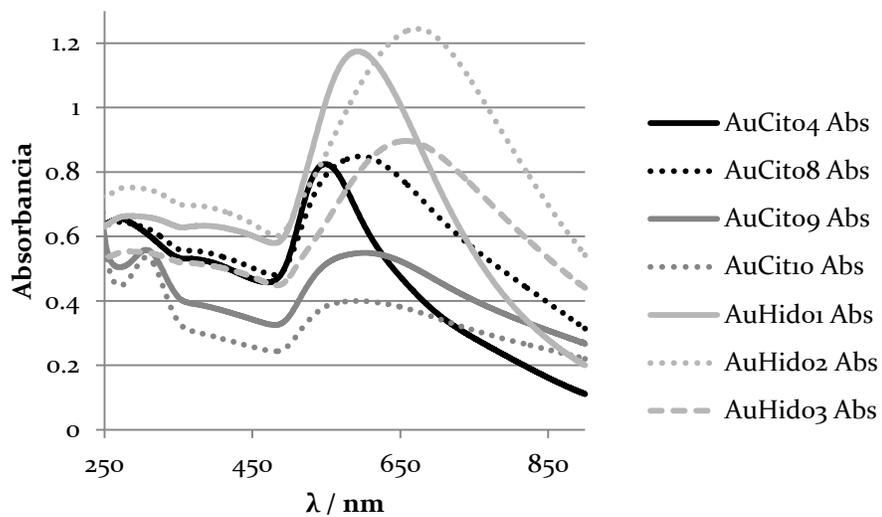


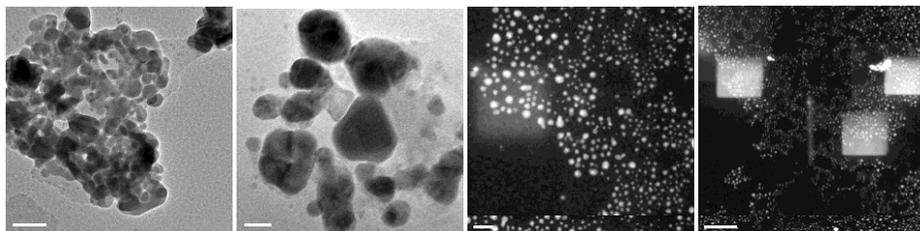
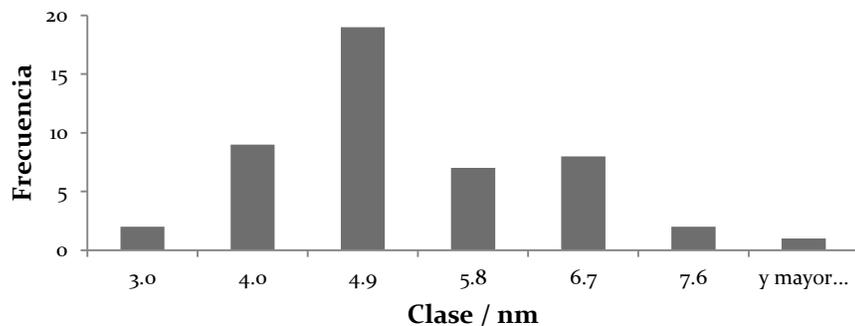
Figura 39  
 Espectros de absorbancia UV-Vis de coloides de oro.  
 AuCt: coloides de oro reducidos con citrato; AuHid: coloide de oro reducidos con hidroxilamina.



A partir de los resultados de la microscopía electrónica, se escogieron los coloides de plata por su estrecha distribución de tamaños, aunque las partículas eran un poco más pequeñas de lo deseado. En un primer ensayo para amplificar la señal de Raman, se utilizó una solución de piridina  $2 \text{ mgmL}^{-1}$ , comúnmente utilizada como patrón en SERS (buscando específicamente la amplificación de las bandas presentes entre  $1000$  y  $1100 \text{ cm}^{-1}$ ) y se obtuvo el espectro Raman de esta solución solamente, así como de las mezclas de piridina, coloide de plata y cloruro de sodio. Se estudió además el efecto del cambio del pH de la solución en la amplificación de la señal. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 43.

Se observó una clara amplificación de la señal de Raman al utilizar los coloides de plata, que comenzó a observarse a pH 3, fue más marcada a pH casi neutro y aunque todavía a pH 10 se observó una fuerte amplificación, ya a pH 12 no se obtiene ninguna señal. Al parecer, en pH cercanos al neutro se favorece una mejor adsorción de la molécula sobre las nanopartículas, al estar el par de electrones no enlazados del nitrógeno más disponible, lo que facilita la interacción del nitrógeno con las nanopartículas. Al pasar a pH más básicos, la presencia de iones hidroxilos podría competir con la piridina y dificultar la adsorción sobre la nanopartícula.

Figura 41  
Distribución de  
tamaños e  
imágenes de  
HRTEM de  
coloides de plata.



En general, la hidroxilamina parece la mejor opción, no solo por las características de los coloides obtenidos, sino también por las condiciones de reacción: temperatura ambiente y reacción instantánea. El alargamiento del tiempo de reacción a 3 y 5 minutos no provocó una diferencia apreciable en el producto final, la mezcla de reacción toma su coloración final a los pocos segundos de añadir el agente reductor y ya no varía en los minutos siguientes. En la Figura 40 se muestran varios de los coloides sintetizados por este método.

La utilización de citrato, por su parte, presenta algunas dificultades cuando se compara con la hidroxilamina, sobre todo para lograr resultados reproducibles. En cualquier caso, es importante controlar las condiciones de temperatura y agitación en la reacción, para evitar la formación de focos de nucleación que provoque la formación de partículas de tamaño no homogéneo. Aún así, los cambios de coloración que indican la formación de las nanopartículas se apreciaron a intervalos de tiempo muy diferentes a pesar de mantener condiciones de reacción similares, y en algunos casos no se apreció la formación del coloide.

*Figura 40 Coloides de plata y oro preparados por reducción con hidroxilamina.*



Sin embargo, los estudios de absorción de luz UV-Vis solo pueden dar una idea aproximada de la distribución de tamaños de las nanopartículas. Para conocer en detalle su forma y tamaño es necesario realizar estudios de microscopía electrónica de transmisión, que se presentan a continuación. A partir de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión se obtuvieron las distribuciones de tamaño de dos muestras de nanopartículas de oro y plata (Figura 41 y Figura 42). En concordancia con lo observado en los espectros de absorbancia, la muestra de plata presenta una menor dispersión en los tamaños y la forma de las partículas, estando la mayoría de ellas en el intervalo de 3 a 6 nm, con el máximo alrededor de 5 nm. Por su parte, la muestra de oro presentó partículas de mayor tamaño y una mayor dispersión en la forma, con una distribución centrada entre los 60 y los 90 nm.

Figura 42  
 Distribución de  
 tamaños e  
 imágenes de  
 HRTEM de  
 coloides de oro.

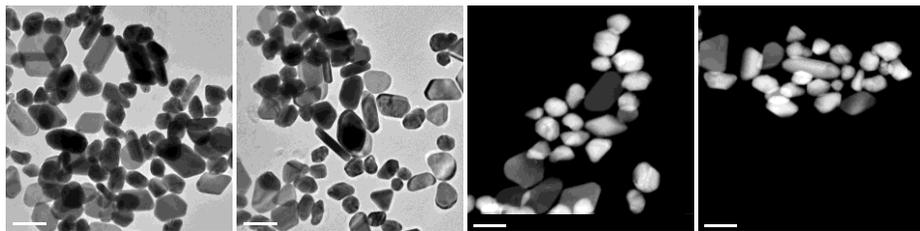
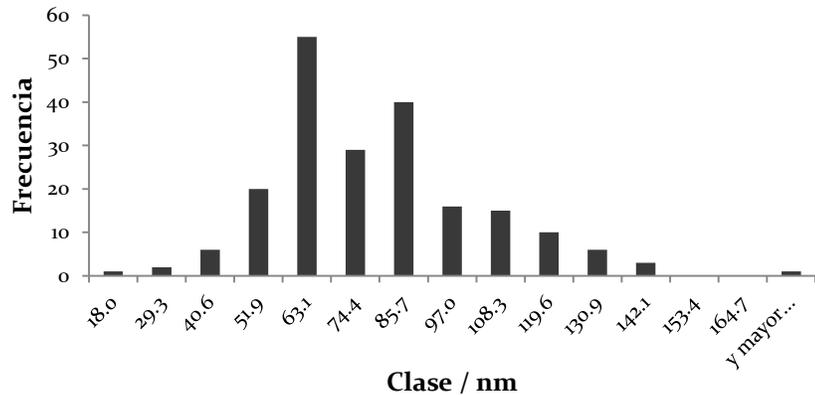
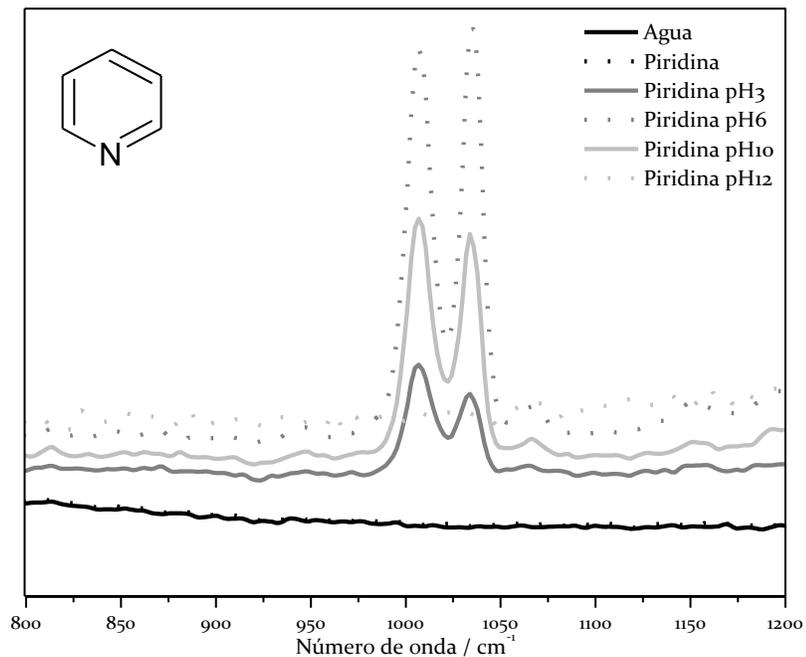


Figura 43  
 Estructura,  
 espectros Raman y  
 SERS de piridina.



A pesar del efecto SERS observado para la piridina, no fue posible obtener estos resultados para ninguno de los colorantes, ya sea puros o sus extractos, por lo que fue necesario preparar nuevos coloides, con la intención de que sus características fueran más apropiadas para amplificar la señal de Raman. Varios aspectos merecen atención: mantener la

distribución de tamaños lo más estrecha posible, logrando partículas por encima de los 10 nm y utilizar agua más pura que la empleada hasta este momento (bidestilada y desionizada).

Estos coloides se prepararon en el Instituto de Estructura de la Materia de Madrid, donde cuentan con una experiencia de más de una década en su preparación y utilización. Se introdujeron pequeños cambios en la preparación: se utilizó agua tipo I, que tiene un contenido total de carbono orgánico de hasta  $5 \mu\text{gL}^{-1}$  y se cambió ligeramente la relación molar y el orden en que se añaden los reactivos. El procedimiento se explica en detalle en 3.2.2.

A simple vista, se observan claras diferencias entre el color y la apariencia de estos coloides y los anteriores, fundamentalmente en los que se prepararon por reducción con citrato. El coloide de plata reducido con citrato presenta una tonalidad más parduzca y es de apariencia turbia, mientras que el coloide de oro tiene un color rojizo y es mucho más transparente (Figura 44).

Figura 44 Coloides de plata preparados por reducción. a) plata / hidroxilamina; b) plata / citrato; c) oro / citrato.



a)

b)

c)

Los coloides fueron igualmente caracterizados por espectroscopía UV – Vis y por microscopía electrónica. En los espectros de absorbancia se estudió además el efecto del cloruro de sodio y el nitrato de potasio utilizados como agregantes (Figura 45, Figura 46 y Figura 47). En la Tabla 3 se presenta un resumen de los espectros de absorción de los tres coloides y de los cambios provocados por los agentes agregantes.

En el primer caso, para el coloide de plata reducido con citrato de sodio, se observa el máximo de absorción del plasmón de resonancia de la plata en 409 nm, con un pico bastante estrecho, mientras que la adición de nitrato de potasio y cloruro de sodio provoca en los dos casos cierto grado de agregación de las partículas, evidenciado en la disminución de la absorción

y un pequeño ensanchamiento del pico. El efecto producido por las dos sales es similar. Por otro lado, para el coloide de plata reducido con hidroxilamina se observa que el máximo del plasmón se corrió ligeramente a menores longitudes de onda, 404 nm, lo que podría indicar menor tamaño de las partículas y presenta un pico mucho más intenso y estrecho que el caso anterior. La adición de NaCl tuvo un ligero efecto de agregación pero el efecto del  $\text{KNO}_3$  fue mucho más drástico, la intensidad del pico bajó notablemente y se ensanchó en poco más de un 40 %. El coloide de oro presentó un máximo de absorción centrado en 518 nm y la adición de los agregantes tuvo, tal como en el primer caso, un pequeño efecto de disminución de la intensidad del pico del plasmón.

	Coloide	Abs <sub>máx</sub>	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	FWHM (nm)
Tabla 3 Máximo y ancho a la mitad de la altura de los espectros de absorción UV - Vis de los coloides.	AgCt	652	409	137
	AgCt + $\text{KNO}_3$	567	409	140
	AgCt + NaCl	555	409	143
	AgHx	991	404	68
	AgHx + $\text{KNO}_3$	895	405	96
	AgHx + NaCl	460	404	71
	AuCt	84	518	114
	AuCt + $\text{KNO}_3$	73	517	110
	AuCt + NaCl	72	520	111

Figura 45  
 Espectros de absorción UV - Vis de coloides de plata preparados por reducción con citrato (AgCt).

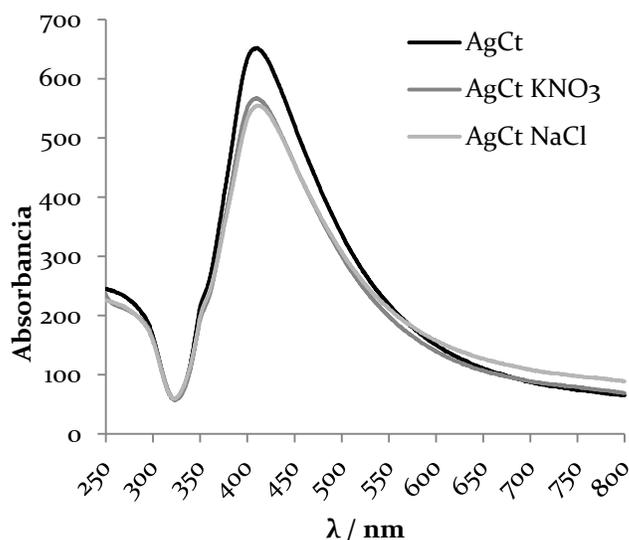


Figura 46  
Espectros de  
absorbancia UV -  
Vis de coloides de  
plata preparados  
por reducción con  
hidroxilamina  
(AgHx).

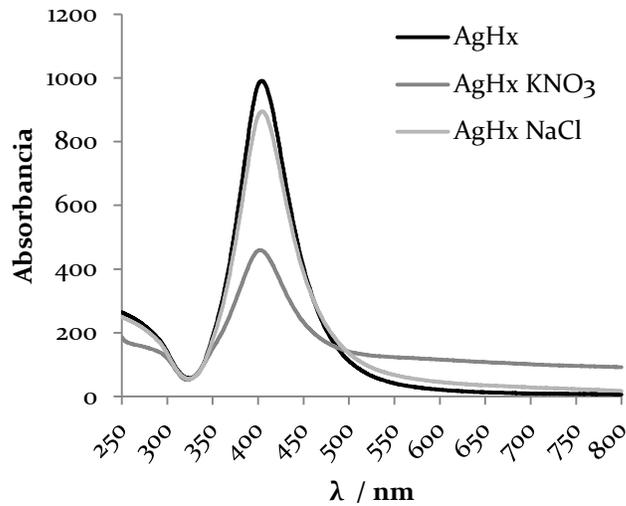
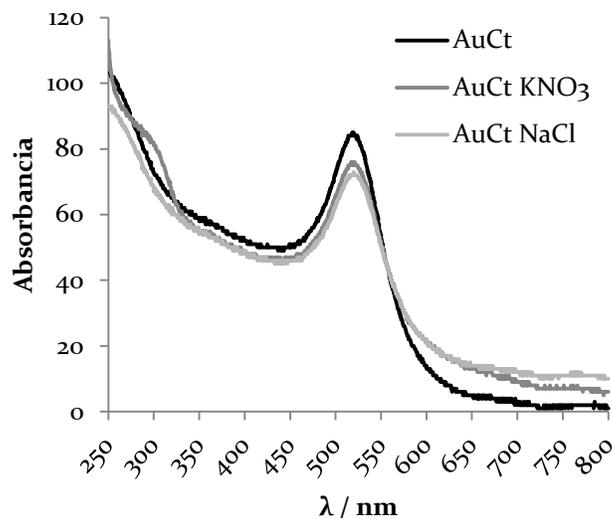


Figura 47  
Espectros de  
absorbancia UV -  
Vis de coloides de  
oro preparados por  
reducción con  
citrato (AuCt).



El análisis de las imágenes de microscopía electrónica mostró una distribución de formas y tamaños muy homogénea para el coloide de plata preparado por reducción con citrato (Figura 48). Las nanopartículas son mayoritariamente esféricas con diámetros centrados en 14 nm. El otro coloide de plata también presentó nanopartículas predominantemente esféricas, como se aprecia en la Figura 49, pero con una distribución de tamaños mucho más amplia, centrada en unos 30 nm de diámetro.

Esta amplia distribución y mayor tamaño de las partículas es de cierta forma contraria a lo que se esperaría a partir del espectro UV - Vis de estos

coloides, con picos más intensos y estrechos que los del otro coloide de plata. Sin embargo, ya Silva<sup>106</sup> había señalado que basarse solamente en la posición, intensidad y ancho del plasmón de resonancia podría llevar a conclusiones erradas con respecto al tamaño de las partículas.

En la Figura 50 se presenta un análisis similar para el coloide de oro. En este caso se observa una gran disparidad en la forma de las nanopartículas, se observan barras, cilindros, esferas, cuadrados, triángulos y muchas otras formas geométricas irregulares. Su tamaño es también dispar, con una distribución muy amplia, centrada alrededor de los 50 nm.

Figura 48  
Distribución de  
tamaños e  
imágenes de  
HRTEM de  
coloides de plata  
reducidos con  
citrato.

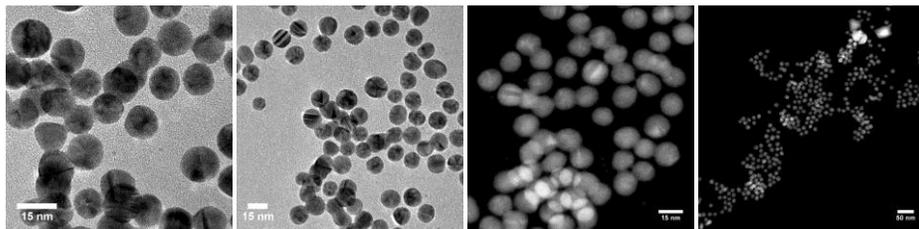
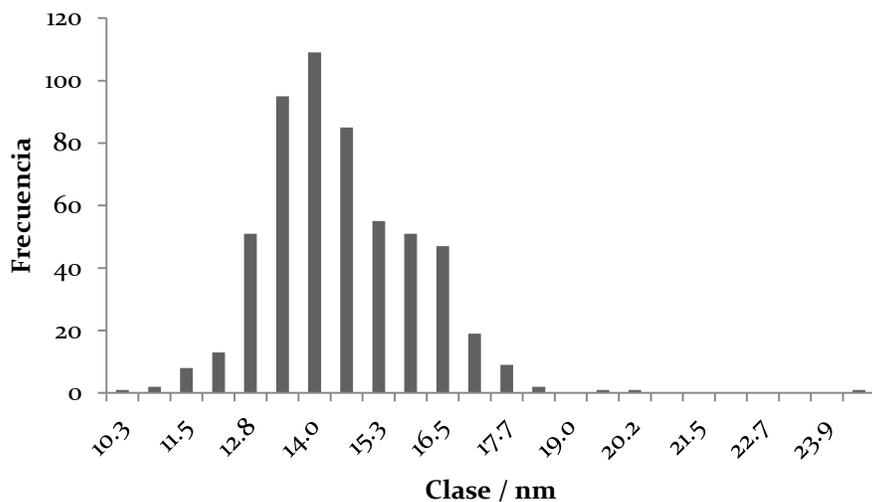


Figura 49  
 Distribución de  
 tamaños e  
 imágenes de  
 HRTEM de  
 coloides de plata  
 reducidos con  
 hidroxilamina.

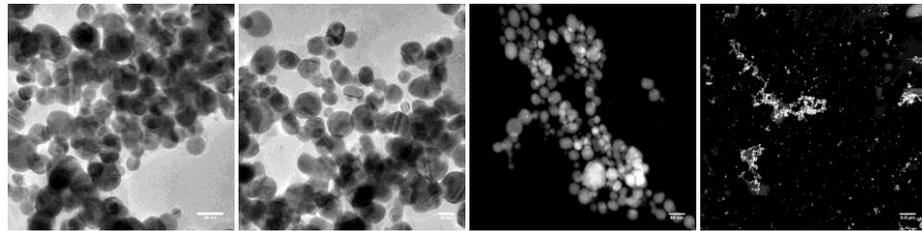
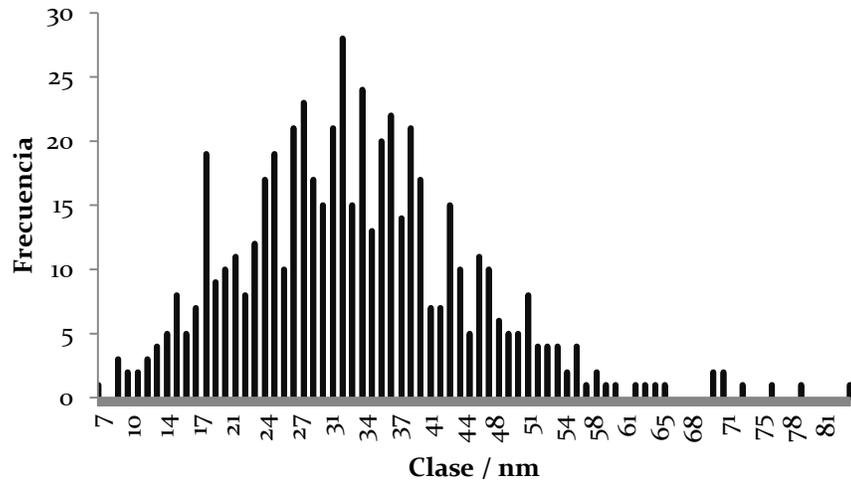
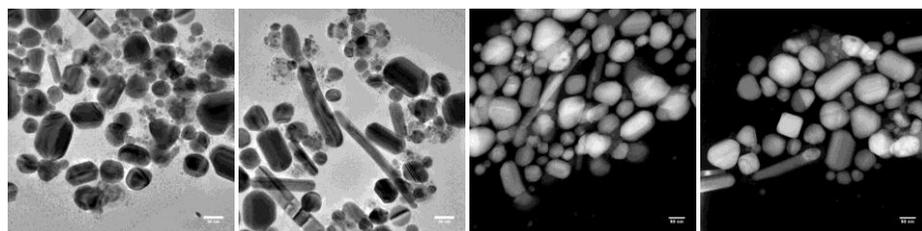
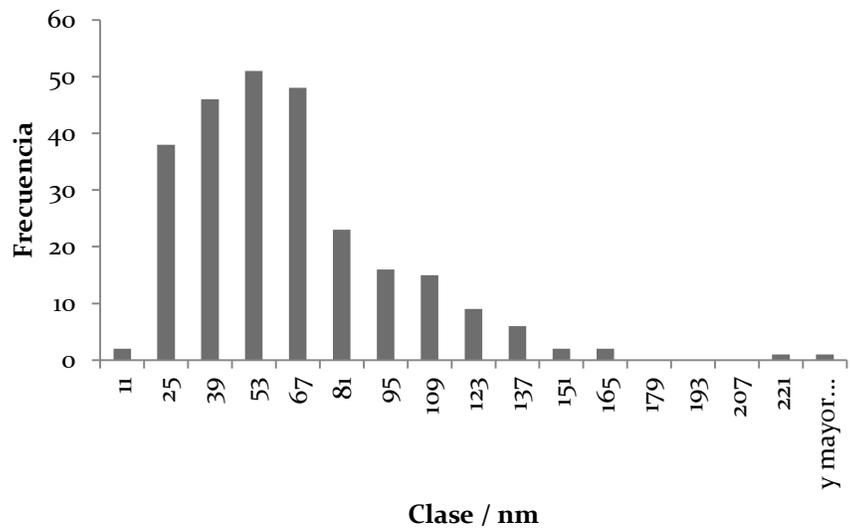


Figura 50  
 Distribución de  
 tamaños e  
 imágenes de  
 HRTEM de  
 coloides de oro  
 reducidos con  
 citrato.



La actividad SERS de los tres coloides se probó utilizando dos longitudes de onda de excitación (514 nm y 785 nm), tres niveles de pH (ácido, básico y neutro) y una solución de  $10^{-2}$  molL<sup>-1</sup> de ácido carmínico. El coloide de plata reducido con citrato (AgCt) produjo buenos resultados para los dos láseres utilizados, mientras que el coloide de plata con hidroxilamina (AgHx) solo presentó actividad SERS a 514 nm. El coloide de oro (AuCt) no presentó actividad SERS a ninguna de las dos longitudes de onda.

En la Figura 51 se muestran los espectros de SERS a tres niveles de pH del ácido carmínico, utilizando el coloide AgCt a 785 nm. Los mejores resultados se obtuvieron a pH ácido, donde pueden observarse las bandas de la antraquinona mezcladas con las del citrato. Al restarle el espectro del coloide al mismo pH (Figura 52) se pueden observar claramente cuatro bandas del colorante.

Utilizando el láser de 514 nm se obtienen también los mejores resultados a pH 4, en este caso se observan una gran cantidad de picos y el espectro es intenso, mientras que la sustracción del espectro del coloide no aporta mucha más información, debido a que no se presentan muchas bandas de la hidroxilamina (Figura 53, Figura 54).

El coloide AgHx solo funcionó, como ya se mencionó, con el láser de 514 nm y los mejores resultados se obtuvieron con pH cercano al neutro (Figura 55). En la Figura 56 se observa el efecto de restar el espectro del coloide, que en este caso presenta muy pocas bandas y de muy baja intensidad.

Estos experimentos se repitieron en el Instituto de Física de la UNAM y se logró reproducir los resultados obtenidos con el coloide AgCt. Lamentablemente, al no presentar actividad SERS a una longitud de onda de excitación de 785 nm, los coloides AgHx y AuCt no pudieron ser utilizados en nuestro laboratorio, donde solo contamos con un espectrómetro Inspector Raman con un láser de 785 nm.

A partir del siguiente epígrafe, solo se reportarán entonces los resultados obtenidos en los estudios de SERS de extractos de colorantes y de fibras teñidas, utilizando las nanopartículas de plata preparadas por reducción con citrato.

Figura 51 Espectro SERS de ácido carmínico. Efecto del pH. Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm, coloide de plata reducido con citrato (AgCt).

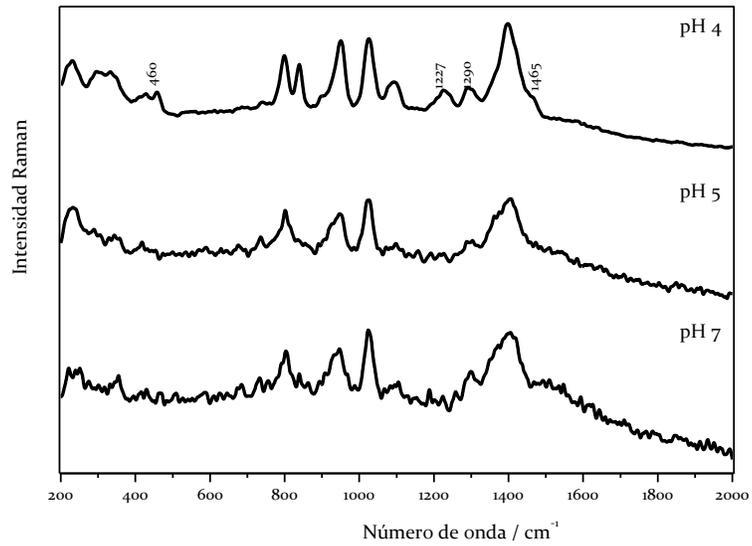


Figura 52 Espectro SERS de ácido carmínico a pH 4. Sustracción del blanco. Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm, coloide de plata reducido con citrato (AgCt).

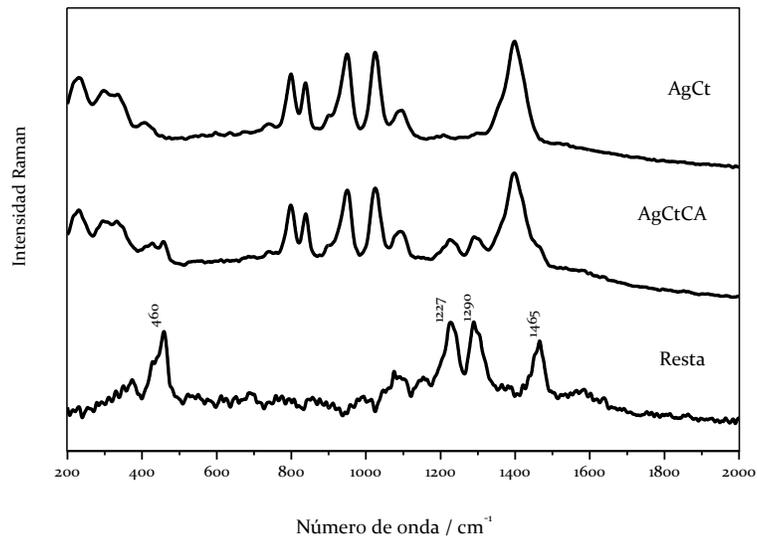


Figura 53 Espectro SERS de ácido carmínico. Efecto del pH. Micro Raman Renishaw RM2000,  $\lambda = 514$  nm, coloide de plata reducido con citrato (AgCt).

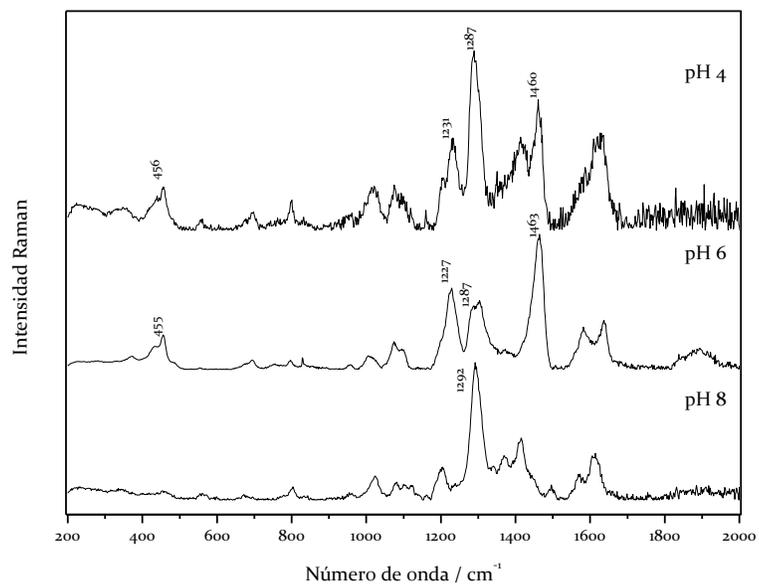


Figura 54 Espectro SERS de ácido carmínico a pH 4. Sustracción del blanco. Micro Raman Renishaw RM2000,  $\lambda = 514$  nm, coloide de plata reducido con citrato (AgCt). Antes de restar se normalizaron las intensidades multiplicando por un coeficiente el espectro AgCtCA.

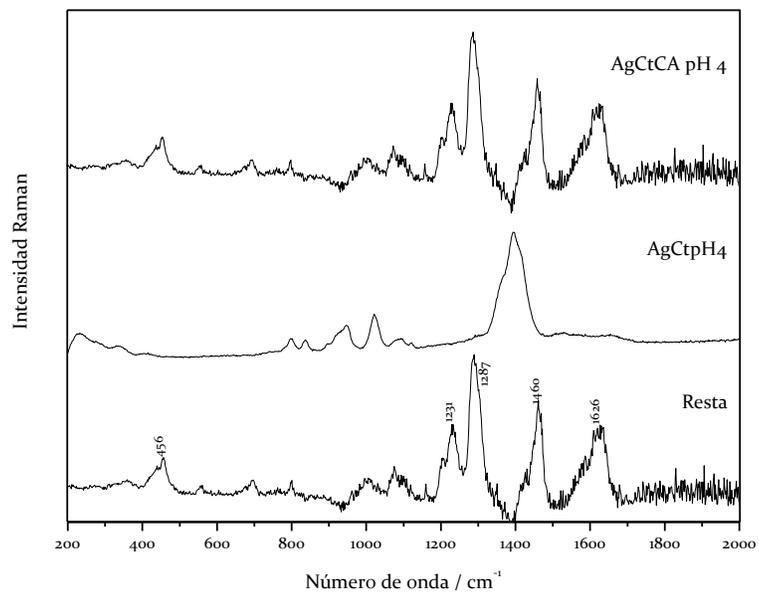


Figura 55 Espectro SERS de ácido carmínico. Efecto del pH. Micro Raman Renishaw RM2000,  $\lambda = 514$  nm, coloide de plata reducido con hidroxilamina (AgHx).

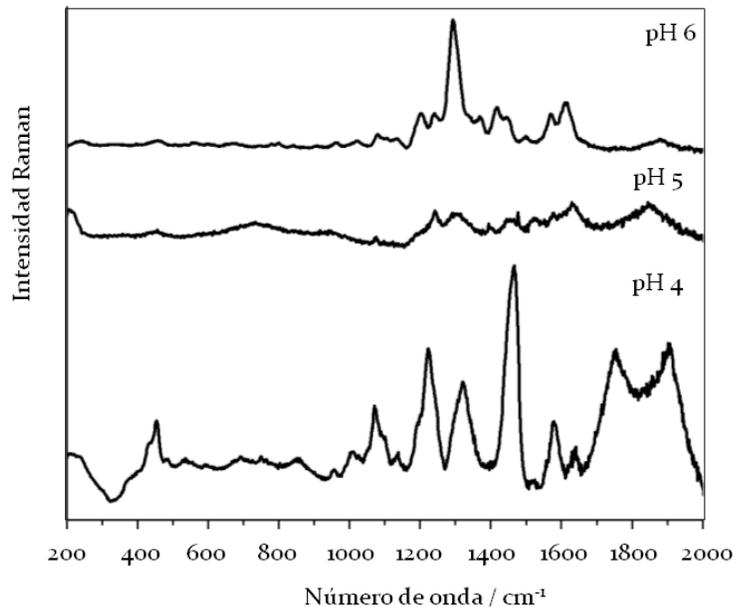
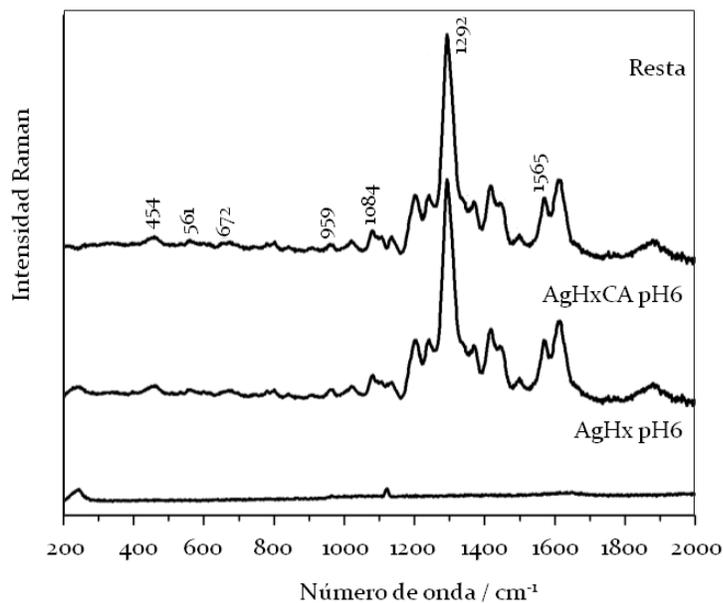


Figura 56 Espectro SERS de ácido carmínico a pH 4. Sustracción del blanco. Micro Raman Renishaw RM2000,  $\lambda = 514$  nm, coloide de plata reducido con hidroxilamina (AgHx).



#### 4.2.2 SERS DE EXTRACTOS DE COLORANTES

Antes de estudiar los extractos de cochinilla, achiote, muitle y zacatlaxcalli, se realizó un estudio más amplio del SERS del ácido carmínico puro a varios niveles de pH, desde dos hasta trece (Figura 57), para determinar las mejores condiciones de adsorción de la antraquinona en la superficie de la nanopartícula y, por tanto, las mejores condiciones

para adquirir el espectro SERS. Para controlar el pH se añadieron pequeñas alícuotas de HCl  $0.1 \text{ molL}^{-1}$  y NaOH  $0.1 \text{ molL}^{-1}$ . La mezcla directa del coloide con el ácido carmínico, sin agregar ácido ni base, presenta un pH de 6.

A pH ácido no se observan bandas específicas de la antraquinona, en su lugar se encuentra una banda muy ancha, centrada en  $900 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  que puede deberse a la fluorescencia del ácido carmínico. Esta intensa fluorescencia puede estar relacionada con una pobre adsorción del colorante sobre las partículas de plata, probablemente debido a la interferencia de los aniones cloruro que se añaden a la mezcla cuando se utiliza HCl para ajustar el pH, lo que será discutido más adelante. En estos experimentos no fue posible utilizar  $\text{HNO}_3$  debido a restricciones impuestas a su adquisición.

Al acercarse a la neutralidad, sobre todo a partir de pH 6, cuando no se añade ni HCl ni NaOH, se observa un cambio drástico en el espectro. De aquí en adelante se utiliza NaOH para lograr condiciones progresivamente más alcalinas y el espectro más intenso del ácido carmínico se obtuvo a pH 7. El espectro presenta una banda muy intensa a  $1290 \text{ cm}^{-1}$ , relacionada con las vibraciones  $\nu(\text{CC})$ ,  $\delta(\text{C}_5\text{OH})$ ,  $\delta(\text{C}_8\text{OH})$  y  $\delta(\text{C}_3\text{OH})$ , así como otras bandas a  $1077 \text{ cm}^{-1}$  y  $462 \text{ cm}^{-1}$ , debidas a las vibraciones del residuo glicosídico y del esqueleto carbonado, respectivamente, según lo reportado por Leona<sup>26</sup> y Cañamares.<sup>107</sup>

Los aumentos subsecuentes del pH llevaron a la adquisición de espectros cada vez menos intensos, con bandas menos definidas. Este resultado está parcialmente de acuerdo con los experimentos previos (4.2.1), así como el trabajo de Cañamares,<sup>107</sup> donde la calidad del espectro se va degradando progresivamente según se hace más alcalino el medio. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido en nuestro caso, se obtienen los mejores espectros en medio ácido.<sup>107</sup> Hay una diferencia crucial, en los dos casos (epígrafe 4.2.1 y referencia 107) se utilizó ácido nítrico y no clorhídrico para lograr condiciones ácidas.

La explicación, como ya se advirtió un par de párrafos atrás, hay que buscarla en adsorción de la molécula de ácido carmínico sobre la nanopartícula de plata. El ácido carmínico es una antraquinona (Figura 58) con varios grupos hidroxilo, dos carbonilos y un grupo carboxílico, para la que se han reportado tres constantes de disociación ácida.<sup>107</sup> Por esta razón, en el rango de pH estudiado, la carga total de la molécula pasa de -1 a pH 2 a -3 a pH 12.

Figura 57 Espectro SERS de ácido carmínico. Efecto del pH (pH2 - 13). Inspector Raman,  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , coloide AgCl.

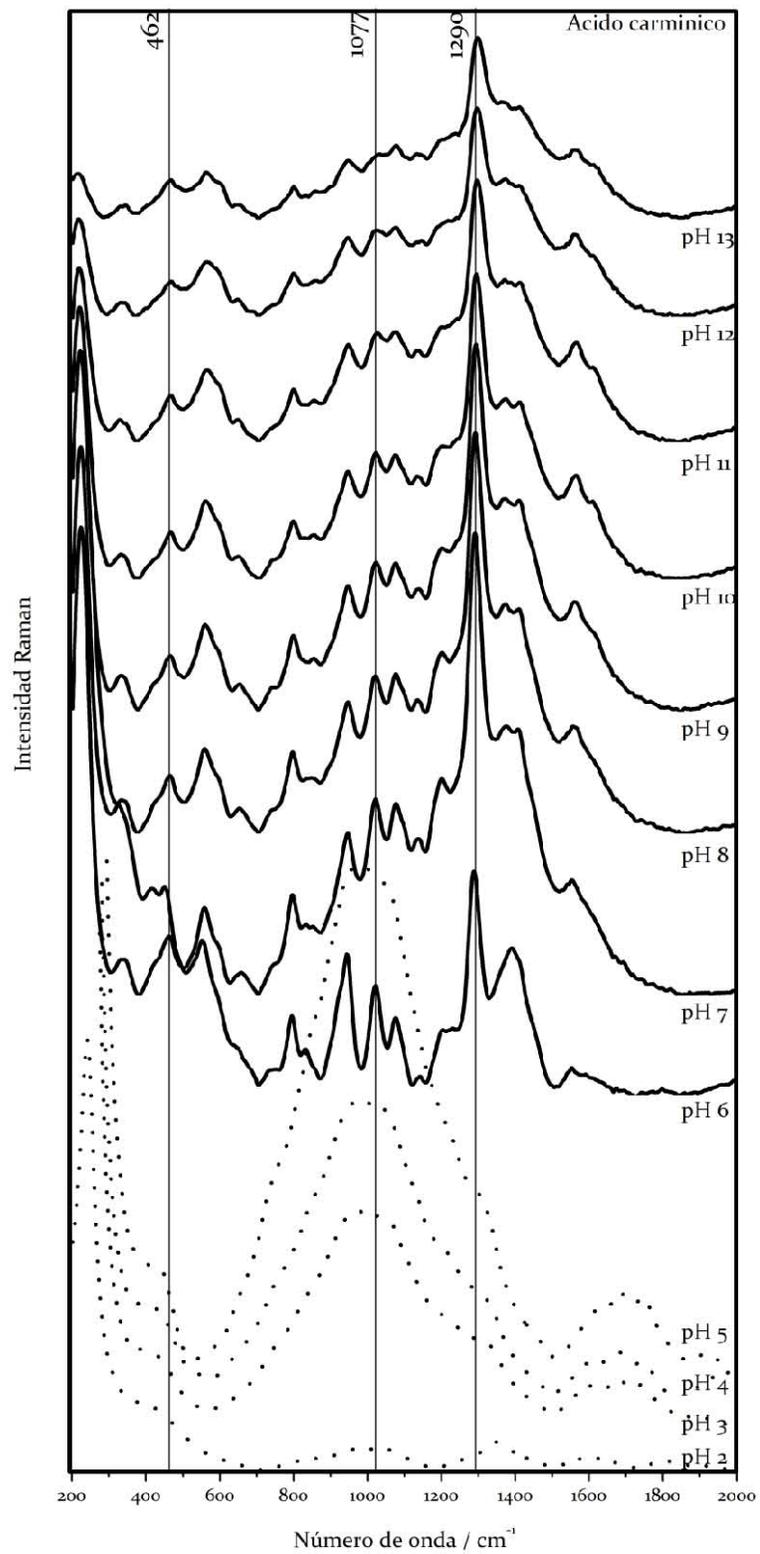
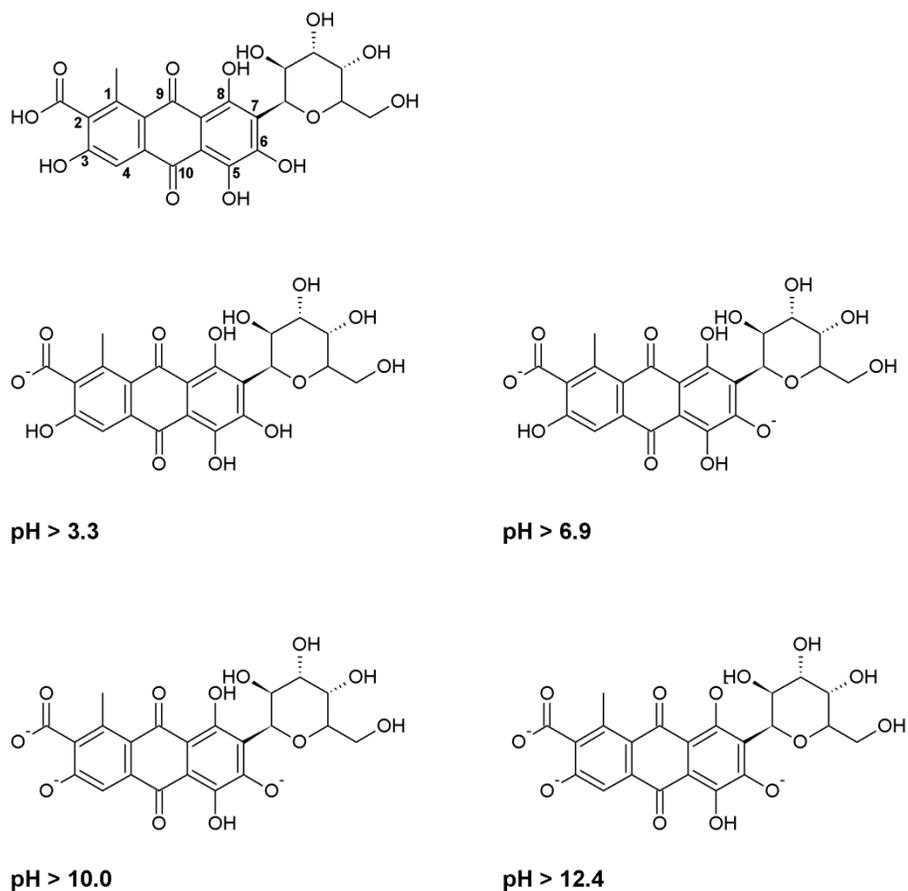


Figura 58  
 Estructura del ácido carmínico y disociación a diferentes niveles de pH.<sup>108</sup>



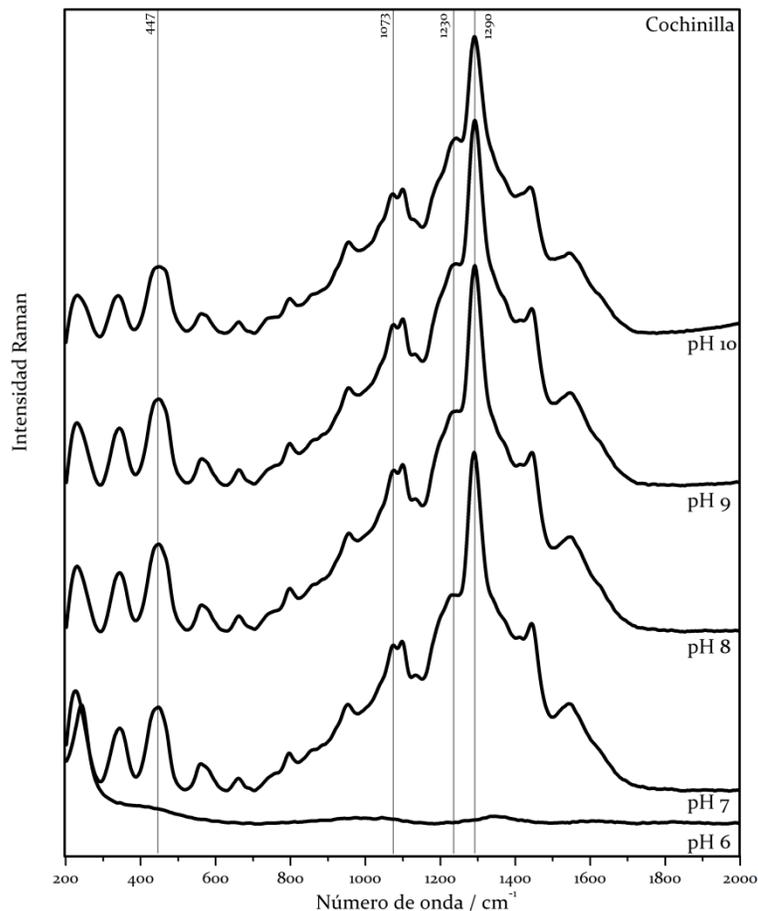
La primera disociación del ácido carmínico ocurre en el grupo carboxílico ubicado en posición 2 (Figura 58) a pH > 3.3, seguida por la pérdida del protón del hidróxilo en posición 6 a valores de pH superiores a 6.9. A partir de pH 10.0 se convierte en un trianión al disociarse el grupo OH en posición 3. En condiciones fuertemente básicas, por encima de pH 12.4, se pierde el protón del hidroxilo ubicado en posición 8 y la molécula es un tetraanión. Estas cargas negativas son estabilizadas mediante la formación de múltiples estructuras resonantes, facilitadas por el sistema aromático de la molécula.

Los coloides de plata utilizados fueron preparados por reducción con citrato de sodio. Los aniones citrato cumplen una doble función, pues permanecen adsorbidos en la superficie de las nanopartículas, manteniendo un ambiente reductor que evita la oxidación de la plata y a la vez le brindan estabilidad al coloide y evitan que precipite. Esta presencia de aniones en su superficie hace que las partículas tengan un potencial zeta altamente negativo<sup>107</sup> y ello favorece la adsorción de moléculas con carga total positiva. Cualquier otra sustancia, para adsorberse en la

superficie metálica, necesita desplazar a los aniones presentes (citrato y posiblemente también aniones nitrato, provenientes del  $\text{AgNO}_3$  de partida y del  $\text{KNO}_3$  utilizado como agente agregante).

Como ya vimos, el ácido carmínico tiene una carga total menos negativa a pH ácido, lo que explica que los mejores resultados se obtengan a pH 3 – 4 (epígrafe 4.2.1 y referencia 107). Sin embargo, al utilizar HCl en lugar de  $\text{HNO}_3$  para controlar el pH o al utilizar NaCl en lugar de  $\text{KNO}_3$  para agregar las nanopartículas, no se logra obtener el espectro del ácido carmínico. Al parecer, los aniones  $\text{Cl}^-$  logran adsorberse con mayor facilidad en la superficie de la plata metálica y no pueden ser desplazados por las moléculas de ácido carmínico. Este hecho es de vital importancia y debe tenerse en cuenta para futuros trabajos de identificación de colorantes por medio de SERS.

Figura 59 Espectro SERS del extracto de cochinilla. Efecto del pH (pH 6 – 10). Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm, coloide AgCt.



A partir de estos resultados, los espectros SERS restantes fueron adquiridos a pH neutro o alcalino, comenzando por el espectro del extracto de cochinilla, en una solución acuosa de  $10 \text{ mgmL}^{-1}$ . En la Figura

59 se observa que el mejor espectro se obtuvo a pH 7, donde se encontraron las mismas bandas previamente observadas para el ácido carmínico. Al igual que en el caso del colorante puro, la calidad del espectro se va degradando al pasar a condiciones más alcalinas, evidenciado fundamentalmente con una disminución de la intensidad de los picos de la antraquinona.

El achiote es un colorante que se obtiene a partir de las semillas de *Bixa orellana* y es usado extensamente como colorante alimentario en México, principalmente en la península de Yucatán y en el Caribe. Su colorante principal es la bixina, un carotenoide que produce tonalidades desde el amarillo hasta el rojo. En 1997 se publicó uno de los pocos artículos<sup>43</sup> relacionados con el espectro Raman de esta molécula, donde a partir de cálculos teóricos y resultados experimentales se encontraron y asignaron cuatro bandas de Raman [1007:  $\delta(\text{CH}_3)$ ; 1153:  $\nu(\text{C-C})$ ; 1183:  $\delta(\text{C-H})$ ; 1528:  $\nu(\text{C=C})$ ]. En el espectro de un extracto de achiote disuelto en agua a una concentración de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  se observan estas mismas bandas y otras cuatro que no se encontraron en el estudio de Oliveira.

Para el extracto de achiote fueron necesarias condiciones fuertemente alcalinas para obtener un espectro con bandas intensas y bien definidas (Figura 60). A pH entre 6 y 8 se pueden observar las bandas reportadas para la bixina,<sup>43</sup> pero se trata de picos anchos y de baja intensidad. A partir de pH 11, en cambio, se observan bandas muy intensas a 1007, 1153, 1183 y  $1528 \text{ cm}^{-1}$ .

La bixina tiene una estructura lineal (Figura 61), con dobles enlaces conjugados, un grupo ester en un extremo y un grupo carboxilo en el otro. Estos grupos de los extremos deben ser los responsables de la adsorción de la molécula sobre las nanopartículas metálicas. En medio ácido debe ser más fácil la adsorción pues al ser un ácido débil -  $\text{pK}_a = 4.768$ , cercana a los ácidos fórmico y acético - la molécula debe tener una carga total más positiva en esas condiciones. El espectro obtenido en condiciones fuertemente alcalinas debe estar relacionado con un mecanismo distinto, que involucre algo más que la carga total de la molécula.

Figura 6o Espectro SERS del extracto de achiote. Efecto del pH (pH 6 - 13). Inspector Raman,  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , coloide AgCt.

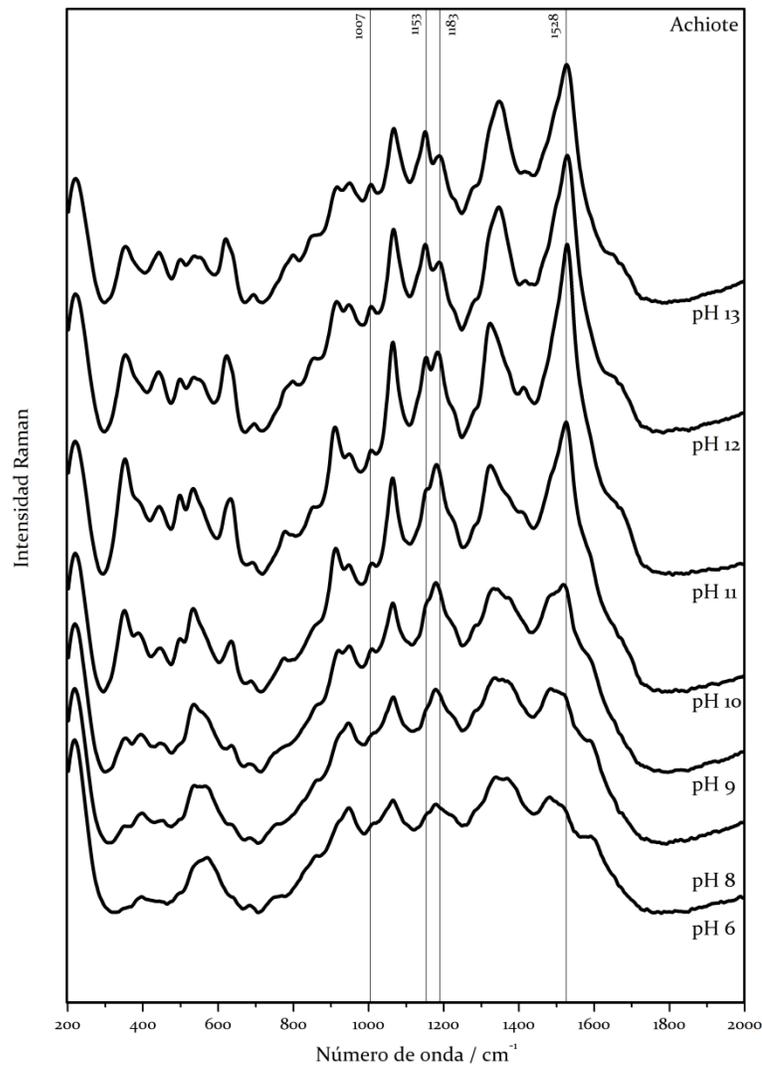
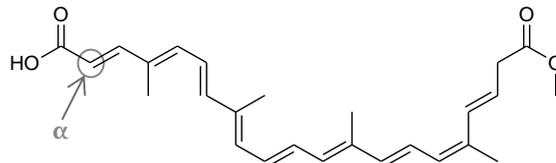


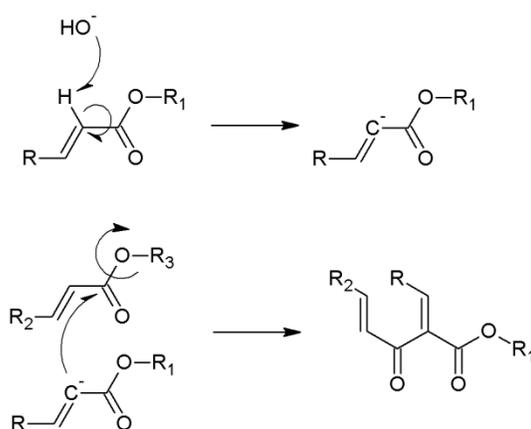
Figura 61 Estructura química de la bixina.



Una pista proviene de la relación de intensidades de las bandas a 1153 y 1183  $\text{cm}^{-1}$ , que se invierte de pH 9 a pH 13. El pico a 1183  $\text{cm}^{-1}$  está relacionado con las vibraciones del enlace C-H y su intensidad disminuye a medida que aumenta la del pico a 1153  $\text{cm}^{-1}$ , relacionado con las vibraciones del enlace C-C, lo que podría indicar la ocurrencia de reacciones de sustitución nucleofílica en medio fuertemente básico y en este caso podría tratarse de un tipo de condensación aldólica (Figura 62).<sup>109</sup> Estas

reacciones son posibles por el carácter ácido que adquieren los hidrógenos que están situados en posición  $\alpha$  con respecto al grupo carboxílico, lo que permite que en presencia de una base fuerte se pierda este hidrógeno y se forme un carbanión, estabilizado por la resonancia de los dobles enlaces cercanos. Este carbanión puede realizar un ataque nucleofílico a un carbono de un grupo carbonilo de otra molécula de bixina, que debido a la electronegatividad del oxígeno (que atrae los electrones del doble enlace) presenta una densidad de carga positiva. De ocurrir este tipo de reacción entre dos moléculas de bixina podría aumentar el número de grupos donores disponibles y eso facilitaría la adsorción sobre la nanopartícula.

Figura 62  
 Condensación  
 aldólica.



El muitle y el zacatlaxcalli han sido poco estudiados y se llegaron a presentar controversias sobre la estructura del colorante principal en cada caso. Sobre muitle se propuso que su colorante era el índigo, aunque recientemente estudios realizados en la Universidad Autónoma de Campeche indicaron que podía tratarse de un flavonoide. Lo mismo se afirma en artículos de 2005<sup>110</sup> y 2011,<sup>111</sup> sin explicar su estructura. Un trabajo poco conocido, publicado en 1982,<sup>90</sup> propone que el colorante presente en las hojas de *Justicia spicigera* es la antocianina kaempferitrina (Figura 63). Los autores aislaron la molécula a partir de las hojas de muitle y su pertenencia a la familia de las antocianinas – que producen una gama de colores desde el rojo hasta el púrpura, en dependencia del pH – concuerda con los tonos obtenidos al utilizar el muitle como colorante.

Por otra parte, se había sugerido que el colorante en el zacatlaxcalli podía ser un beta caroteno o un flavonoide. Resultados recientes y aún no publicados de Esquivel *et. al.* demuestran que se trata del flavonoide quercetina, cuya estructura se muestra en la Figura 64.

Figura 63  
Estructura  
química de la  
kaempferitrina.

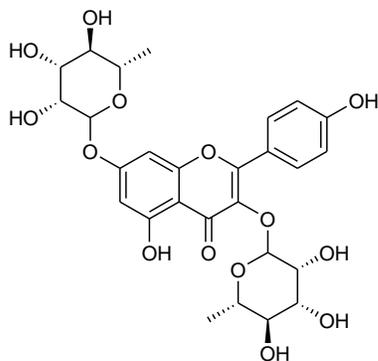
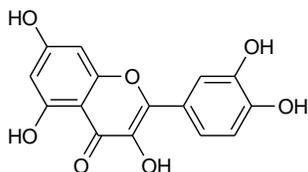


Figura 64  
Estructura  
química de la  
quercetina.



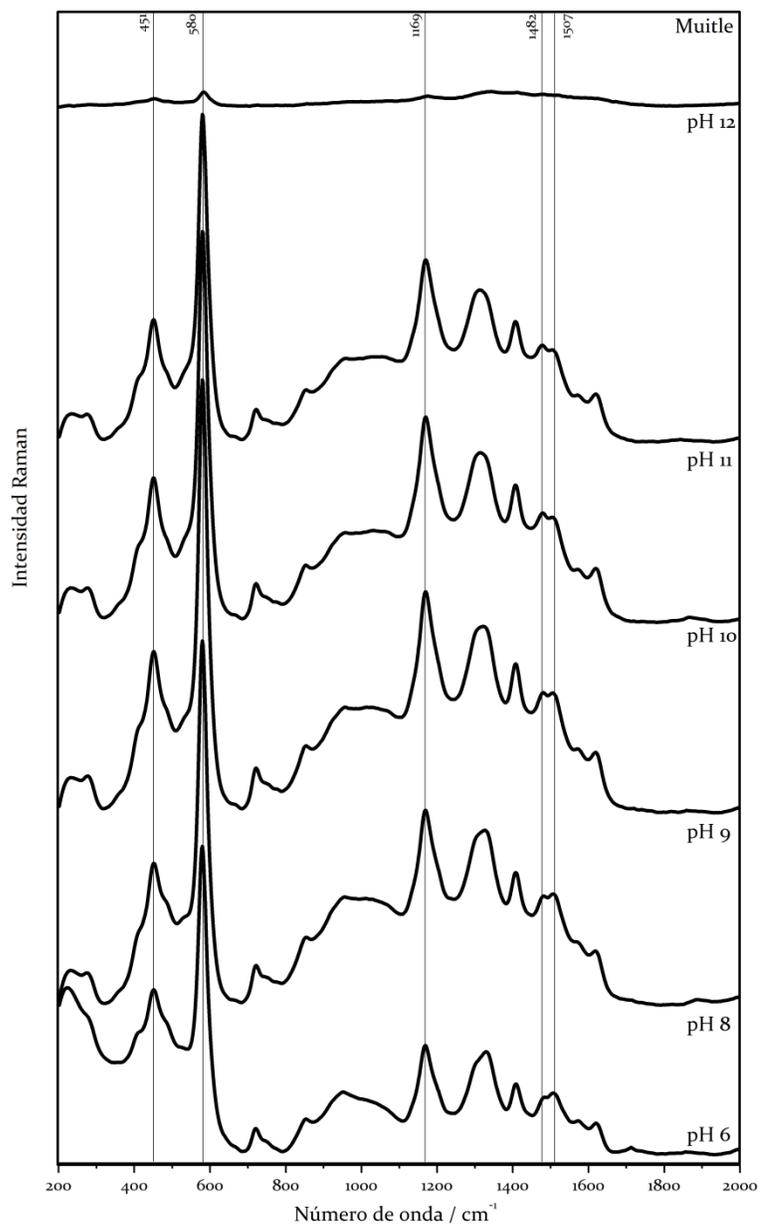
Los espectros de SERS de estos colorantes fueron adquiridos por primera vez en el curso de este trabajo. Para las dos moléculas, los mejores espectros se obtuvieron a pH cercano al neutro y la intensidad de los espectros disminuye con el aumento del pH, como se aprecia en la Figura 65 y la Figura 66. En el caso del zacatlaxcalli algunas bandas se hacen más anchas y menos definidas. Teniendo en cuenta la estructura de ambas moléculas, es de esperar que la mejor adsorción sobre la superficie de las nanopartículas ocurra en medio ácido, al igual que para el ácido carmínico.

La antocianina kaempferitrina es el glicósido del kaempferol, una antocianidina. Dos trabajos de Merlin *et. al.*, publicados en 1985<sup>112</sup> y 1994,<sup>113</sup> analizan el espectro Raman de las antocianinas, centrándose en el efecto de los sustituyentes glicosídicos. En ambos artículos se encontraron pocas diferencias entre los espectros de las antocianidinas y las antocianinas estudiadas, aunque se encontraron algunos cambios en las regiones cercanas a  $1645\text{ cm}^{-1}$  y  $1350\text{ cm}^{-1}$ , así como desde  $500\text{ cm}^{-1}$  hasta  $900\text{ cm}^{-1}$ . Estos resultados concuerdan con el trabajo de Euler *et. al.*<sup>90</sup> sobre la composición química de la *Justicia spicigera*.

Ese parece ser nuestro caso, porque aunque no se observan picos en la región de  $1645\text{ cm}^{-1}$ , se aprecian algunas diferencias en el corrimiento y ensanchamiento de la banda cercana a  $1330\text{ cm}^{-1}$  (Figura 65), que se encuentra alrededor de los  $1320\text{ cm}^{-1}$  en dos espectros reportados del kaempferol.<sup>114, 115</sup> Hay también evidencia de glicosilación en el rango

espectral bajo, las bandas están corridas y las intensidades son marcadamente diferentes, con un pico muy intenso a  $580\text{ cm}^{-1}$ . Este pico no se observa en el espectro Raman del kaempferol reportado por Žuk *et. al.*<sup>115</sup> y está presente con baja intensidad en los espectros Raman y SERS publicados por Jurasekova en 2006.<sup>114</sup>

Figura 65 Espectro SERS del extracto de muitle. Efecto del pH (pH 6 - 12). Inspector Raman,  $\lambda = 785\text{ nm}$ , coloide AgCt.



Además, las bandas intensas en la region de  $400 - 600\text{ cm}^{-1}$  ya fueron observadas en un estudio previo de los espectros Raman y SERS de la quercetina<sup>116</sup> y fueron atribuidas a la interacción del grupo catecol del flavonoide con las nanopartículas, formando un dímero quercetina -

nanopartícula – quercetina, porque estas bandas estaban ausentes en el espectro Raman de la quercetina en solución etanólica.

Se observa una gran similitud entre el espectro de la quercetina reportado en este último artículo y el espectro de zacatlaxcalli obtenido en este trabajo (Figura 66), no solo por los corrimientos de las bandas, muy pequeños, sino también por las intensidades relativas de los picos. Esto apoya los resultados mencionados anteriormente, de Esquivel y colaboradores, que aislaron la quercetina en muestras de *Cuscuta americana*.

Los espectros SERS de muitle y zacatlaxcalli son muy parecidos, mostrando picos muy intensos en la zona de  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  y varios picos más entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ , lo que era de esperar dado que ambas moléculas comparten al ion flavilio como su estructura principal. Sin embargo, es necesario un estudio más detallado que permita adquirir y comparar los espectros Raman y SERS de los extractos, el colorante purificado y un estándar de referencia. La influencia de los diferentes sustituyentes en el espectro podría entonces ser apreciada más claramente.

Figura 66 Espectro SERS del extracto de zacatlaxcalli. Efecto del pH (pH 6 – 10). Inspector Raman,  $\lambda = 785\text{ nm}$ , coloide AgCt.

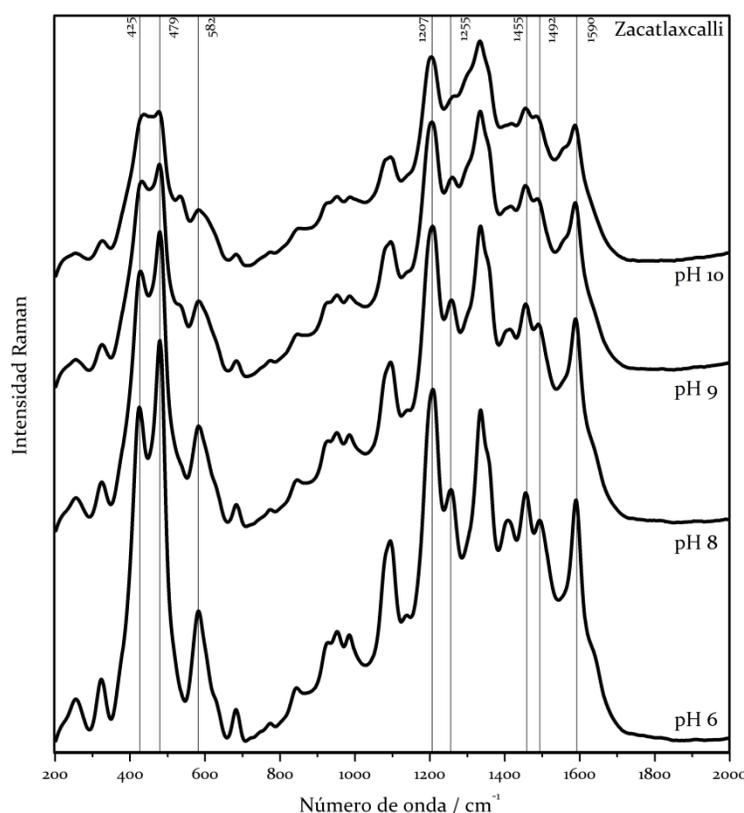
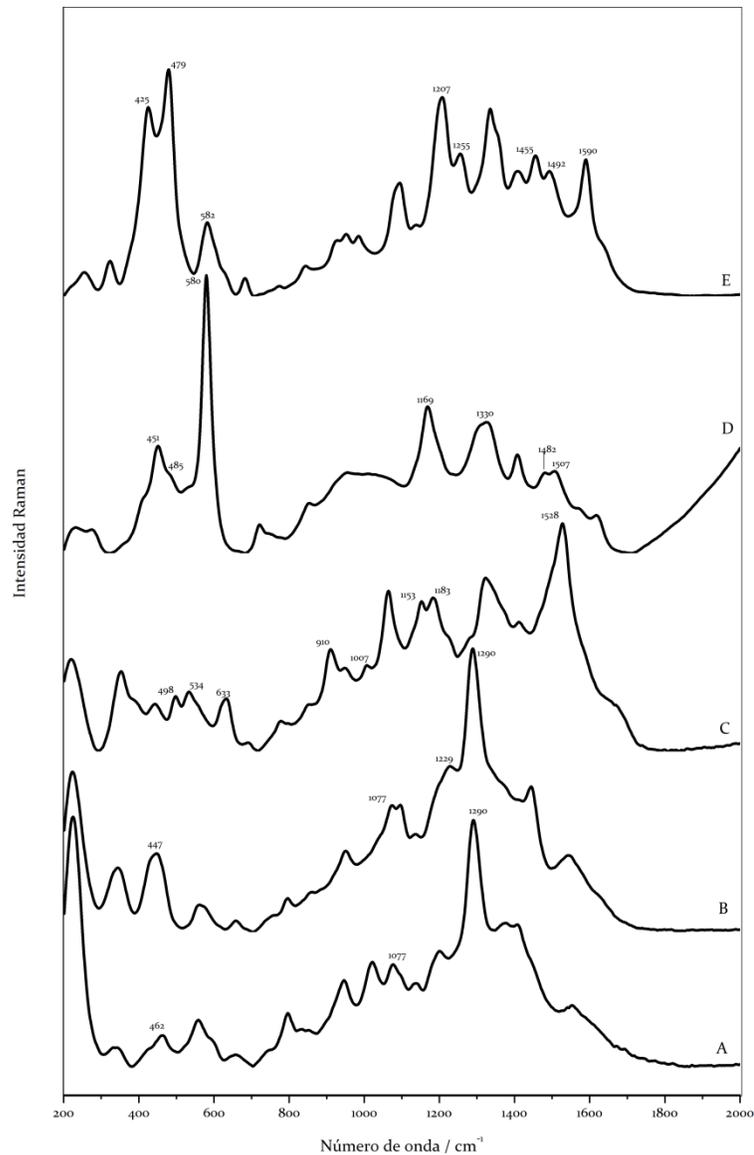


Figura 67  
Espectros SERS de  
los colorantes  
estudiados.  
A) Ácido  
carmínico  $10^{-2}$   
 $\text{molL}^{-1}$   
B) Cochinilla  $10$   
 $\text{mgmL}^{-1}$   
C) Achiote  $10$   
 $\text{mgmL}^{-1}$   
D) Muñile  $10$   
 $\text{mgmL}^{-1}$   
E) Zacatlaxcalli  $10$   
 $\text{mgmL}^{-1}$ . Inspector  
Raman,  $\lambda = 785$   
 $\text{nm}$ , coloide AgCt.



Por último, los espectros del extracto de palo de Brasil no brindaron información relevante, pues no se encontraron las bandas de la brasilina y la brasileína, reportadas previamente por Leona<sup>26</sup> y Oliveira,<sup>94</sup> quizás por la presencia de otras sustancias en el extracto que interfirieron en la adquisición del espectro. A pesar de ello, sí se obtuvieron buenos resultados para el palo de Brasil en el análisis por SERS de fibras de lana teñidas, que se discuten en el epígrafe 4.2.3.2.

Los espectros de SERS obtenidos, mostrados a manera de resumen en la Figura 67, pueden servir de referencia en trabajos futuros de identificación de colorantes en obras de arte u objetos de interés histórico y en otras áreas del conocimiento.

### 4.2.3 SERS DE FIBRAS TEÑIDAS

#### 4.2.3.1 FOTORREDUCCIÓN *IN SITU*

La fotorreducción *in situ* se realizó con el Renishaw RM2000, en el IEM de Madrid. Se analizaron fibras teñidas con cochinilla, palo de Brasil, achiote, muitle y cempazúchitl. Las fibras, de aproximadamente un centímetro de longitud, se fijaron en un cubreobjetos y se pusieron en contacto con una solución de  $\text{AgNO}_3$   $10^{-3}$  molL $^{-1}$ .

Se ha reportado<sup>68, 117</sup> que por este método las nanopartículas se forman en la interfase por la reducción de los cationes  $\text{Ag}^+$  ( $E^\circ(\text{Ag}^+/\text{Ag}^0(\text{aq}))=-1.8$  V) por medio de los  $e_{ac}^-$  y los radicales  $\cdot H$  que se producen por la fotólisis del agua. Esta fotólisis puede ocurrir en el volumen de reacción debido a la gran cantidad de energía depositada por el láser en esa zona.

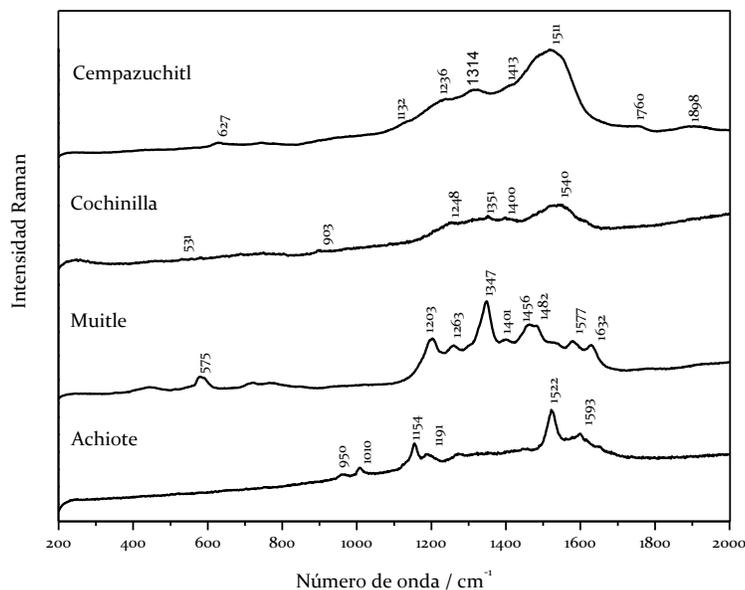
En nuestro caso, se lograron obtener los espectros del achiote y el muitle en fibras de lana (Figura 68), pero para las fibras teñidas con cochinilla y cempazúchitl solo se observó el espectro del carbono, con dos bandas anchas centradas en 1300 y 1500  $\text{cm}^{-1}$ , sin que se pudieran apreciar con claridad los picos de los colorantes. Esta presencia de carbono puede estar relacionada con problemas de enfoque o con pérdida de líquido, al formarse una burbuja de aire dentro de la zona de trabajo.

Lamentablemente, el poco tiempo de equipo disponible no permitió repetir estos experimentos para refinar las condiciones.

En general, las nanopartículas comienzan a formarse a los pocos minutos de irradiación y la señal de SERS se observa con claridad luego de unos 20 minutos, aunque en algunos casos los experimentos se alargaron hasta una hora, sin que se apreciaran cambios significativos después de los primeros 20 – 30 min.

Estos experimentos se repitieron sin éxito en el Instituto de Física de la UNAM, utilizando el espectrómetro DXR Raman Microscope, pero tampoco se pudieron adquirir los espectros de los colorantes y solo se observaron las bandas de carbono. Dos aspectos técnicos influyeron en estos malos resultados. El primero fue la poca estabilidad de la platina del microscopio, lo que no permitía mantener el haz enfocado en la interfase fibra – solución. El segundo problema fue que al contar solamente con un objetivo de 50 x el volumen de irradiación fue demasiado grande y no se logró formar las nanopartículas.

Figura 68  
 Espectros SERS  
 fibras teñidas  
 obtenidos por  
 fotorreducción in  
 situ.  
 Renishaw RM2000,  
 $\lambda = 514 \text{ nm}$ .



Comoquiera que estos dos aspectos constituyen limitaciones intrínsecas del equipo, no fue posible reproducir ni mejorar los resultados de la fotorreducción obtenidos en los primeros intentos en Madrid, por lo que se abandonó esta línea de investigación hasta contar con un equipo más adecuado.

Otros dos métodos fueron probados para adquirir los espectros de los colorantes en fibras de lana teñida. El primero de ellos fue depositar plata sobre la fibra por evaporación al vacío. Esta técnica resultó ser de difícil implementación y los resultados muy pobres, por lo que se pasó a la aplicación directa del coloide de plata sobre la fibra, cuyos resultados se discuten en el siguiente epígrafe.

#### 4.2.3.2 APLICACIÓN DIRECTA DE NANOPARTÍCULAS

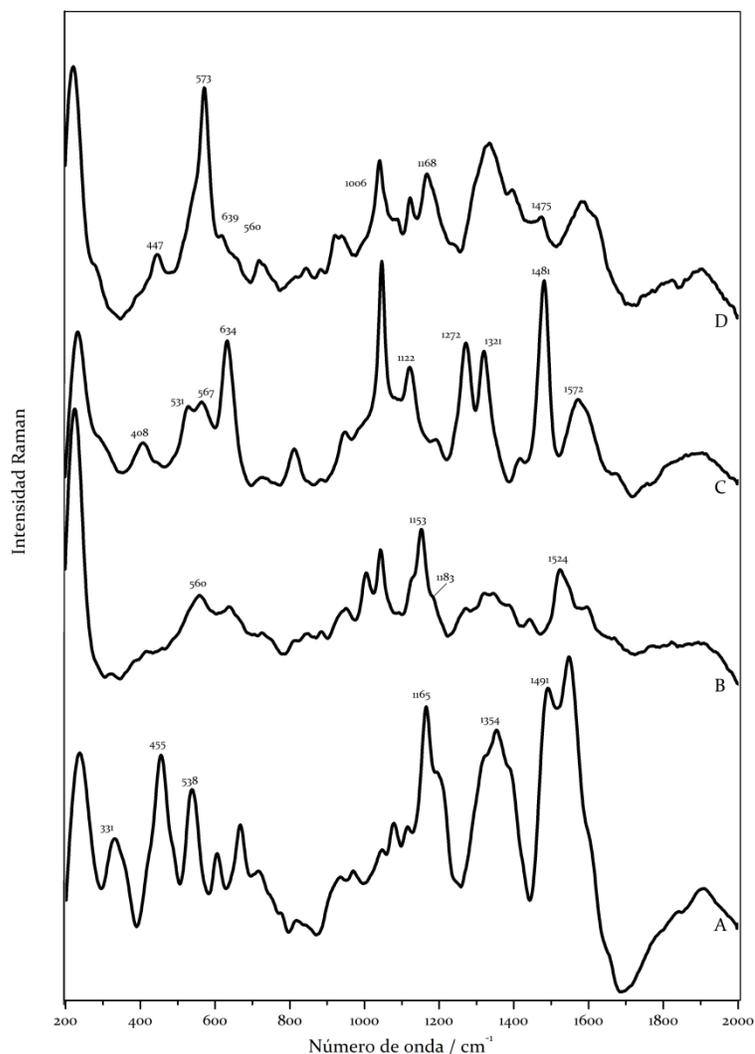
La aplicación directa de nanopartículas coloidales sobre fibras teñidas fue reportada en 2009 por Brosseau *et. al.*<sup>35</sup> sobre fibras de lana mordentadas y teñidas con purpurina, ácido carmínico, granza y amarillo de jazmín.

En nuestro caso, se depositó una alícuota del coloide sobre una hebra de la fibra de lana teñida con achiote, cempazúchitl, muitle o palo de Brasil y se adquirieron inmediatamente varios espectros, mientras estaba húmeda la fibra y luego de secarse la gota del coloide.

En la Figura 36 se pueden observar los espectros Raman de estas fibras, en los que no se encuentran las bandas características de los colorantes. Al

utilizar las nanopartículas, sin embargo, la señal Raman de los colorantes es amplificada grandemente y se pueden observar las bandas específicas de varios de ellos (Figura 69).

Figura 69 SERS de fibras teñidas. A) Palo de Brasil, B) Achiote, C) Cempazúchitl, D) Muñile. Inspector Raman,  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , coloide AgCt.



Las bandas características de palo de Brasil y achiote se aprecian fácilmente y en ambos casos coinciden con las reportadas por Oliveira en dos artículos separados.<sup>43, 94</sup> El espectro SERS de la fibra teñida con achiote muestra las mismas bandas que ya se habían observado en el espectro del extracto, con pequeños cambios en los números de onda en algunos casos y sin cambios en otros (Tabla 4 y Figura 70 C, D). Sin embargo, sí cambia la intensidad relativa de las bandas; la banda que aparece en la zona de  $1525 - 1530 \text{ cm}^{-1}$ , asignada a la vibración en el plano del doble enlace C=C, es mucho menos intensa en el espectro de la fibra teñida, probablemente

porque estos enlaces están involucrados en la fijación del colorante a la fibra.

Figura 70 SERS de extractos y fibras teñidas. A) Fibra de muitle; B) Extracto de muitle; C) Fibra de achiote; D) Extracto de achiote. Inspector Raman,  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , coloide AgCl.

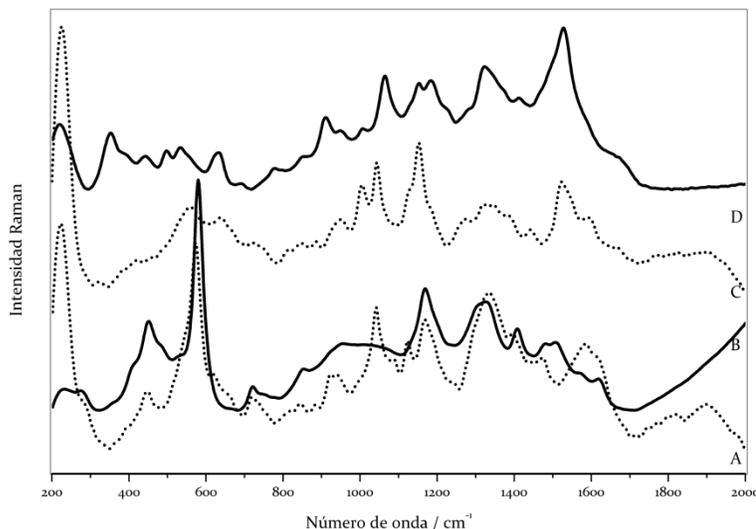
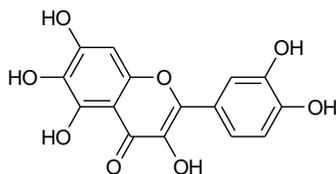


Tabla 4 Bandas coincidentes en el SERS de extractos y fibras teñidas de achiote y muitle.

	Achiote				Muitle			
Extracto (FWHM)	1007 (24)	1153 (34)	1183 (40)	1528 (27)	451 (35)	580 (29)	1169 (50)	1482 (30)
Fibra (FWHM)	1006 (29)	1153 (29)	1183 (34)	1524 (53)	447 (38)	573 (35)	1168 (52)	1475 (26)

También se obtuvieron espectros SERS específicos para las fibras restantes, teñidas con muitle y cempazúchitl. La estructura química del colorante presente en la “Flor de muertos” está claramente determinada y se trata de la quercetagetina, un flavonoide muy similar a la quercetina. Tanto la quercetagetina como la quercetina presentan un grupo catecol y la única diferencia entre las dos moléculas es la presencia de un sustituyente hidroxilo en la posición C6 de la quercetagetina.

Figura 71 Estructura química de la quercetagetina.



Aunque esta correspondencia estructural debería llevar a espectros SERS muy similares, este no es el caso. Tal como ocurre para el zacatlaxcalli, las bandas más intensas del cempazúchitl están agrupadas en dos regiones

( $400\text{ cm}^{-1}$  a  $650\text{ cm}^{-1}$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ ), la posición y la intensidad relativa de los picos en ambas zonas son muy diferentes.

En el intervalo bajo, la banda más intensa del cempazúchitl se encuentra en los  $634\text{ cm}^{-1}$ , con algunas bandas menos intensas a  $408\text{ cm}^{-1}$ ,  $531\text{ cm}^{-1}$  y  $567\text{ cm}^{-1}$ , mientras que para el zacatlaxcalli las bandas intensas aparecen a  $425\text{ cm}^{-1}$  y  $479\text{ cm}^{-1}$ . Lo mismo se observa en la segunda zona, donde la posición y la intensidad relativa de los picos de ambos flavonoides son muy diferentes, el cempazúchitl muestra un pico estrecho y muy intenso a  $1481\text{ cm}^{-1}$  y para el zacatlaxcalli la banda más intensa aparece en  $1207\text{ cm}^{-1}$  y solo una banda de poca intensidad puede observarse cerca de los  $1481\text{ cm}^{-1}$ , más precisamente a  $1492\text{ cm}^{-1}$ .

Estas diferencias eran esperadas, de cierta forma, porque el espectro del zacatlaxcalli se obtuvo a partir de una solución acuosa del extracto de la planta mientras que el cempazúchitl se fijó a la fibra de lana a través de un mordiente. La presencia del alumbre ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) puede afectar el espectro Raman de la molécula de quercetina, así como interferir en la adsorción del flavonoide sobre la superficie de las nanopartículas de plata.

Para asignar claramente los picos observados a las vibraciones de la molécula de quercetina serían necesarios el estudio de un estándar de referencia y una simulación teórica de la molécula. No contamos con el estándar necesario y la simulación no es parte de los objetivos de este trabajo. Sin embargo, sí se prevé continuar los estudios de esta molécula, utilizando estándares y purificando extractos de cempazúchitl, junto con estudios teóricos.

Como ya se mencionó, el muiltle es un colorante menos estudiado, aunque se ha reportado la presencia de la antocianina kaempferitrina en sus hojas.<sup>90</sup> Tal como se hizo con el achiote, los espectros del extracto y de la fibra teñida se compararon y los resultados se muestran en la Tabla 4 y la Figura 70, A y B. las bandas presentan corrimientos pequeños, de entre  $1$  y  $7\text{ cm}^{-1}$ , pero las intensidades relativas y el ancho de los picos permanece igual, a pesar de la menor concentración del colorante en la fibra, lo que produce una señal menos intensa y una mayor interferencia de las bandas de la lana y el citrato y provoca una peor relación señal / ruido.

Teniendo en cuenta las dificultades relacionadas con la identificación precisa de las moléculas presentes en las plantas, entre ellas las responsables del color, el método comparativo presentado hasta aquí puede ser una manera efectiva de relacionar los colores presentes en los objetos patrimoniales con aquellos que son extraídos directamente de sus fuentes naturales y los que se fijan en fibras animales.

Los espectros SERS de los colorantes estudiados pueden servir para su identificación en estudios de patrimonio cultural u otros campos. Los coloides de plata preparados por reducción con citrato demostraron ser un sustrato de SERS estable y efectivo por más de un año. En el caso del muitle, el zacatlaxcalli y el cempazúchitl estos son probablemente los primeros espectros de SERS reportados y esta metodología abre la puerta al estudio de otros colorantes mexicanos y fibras teñidas con ellos.

#### 4.3 RAMAN ENFRIADO CON HELIO

La mayoría de los materiales pueden ser analizados por espectroscopía Raman sin que sufran daños, pero en algunos casos la superficie donde incide el láser se quema debido a la energía depositada por el haz. Aunque esas quemaduras son difíciles de apreciar a simple vista, constituyen una alteración del material original y deben ser evitadas siempre que se trabaje con obras de arte.

Se probaron varias muestras de pigmentos y pinturas, buscando identificar los materiales que pueden sufrir con mayor facilidad quemaduras por la incidencia del láser. Muchas de las muestras consistieron en pintura sobre madera, preparadas de acuerdo a los métodos utilizados en el siglo XVI, para semejar las condiciones que hemos de encontrar al analizar pinturas de ese período.<sup>5</sup> Las muestras restantes consistieron en pigmentos sintéticos modernos, vertidos en pequeños contenedores y dejados secar por varios días. Estos pigmentos estaban incluidos en la paleta de artistas modernos como David Alfaro Siqueiros,<sup>103, 104</sup> por lo que se decidió probar su sensibilidad al láser en vistas a estudios futuros sobre obras del siglo XX y así poder establecer las mejores condiciones para su análisis.

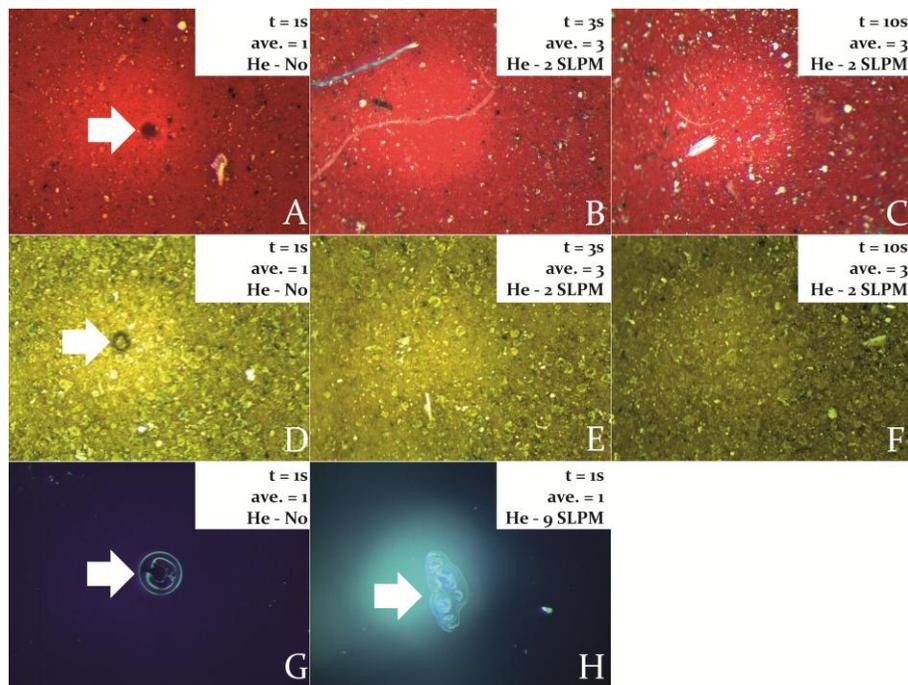
##### 4.3.1 MUESTRAS DE PINTURA

Se analizaron más de 50 muestras, de las que la piroxilina azul y muestras aplicadas sobre madera de bermellón y ocre mostraron signos claros de deterioro después de adquirido el espectro Raman. Las imágenes de microscopía óptica muestran pequeñas quemaduras en las tres muestras luego de adquirir los espectros promediando en cada caso tres adquisiciones de un segundo de duración (Figura 72, A, D, G). La muestra de piroxilina fue la más dañada, pues este pigmento es tan sensible al láser que incluso con la menor potencia y el tiempo de adquisición más corto posibles, 20 mW y 1 s, se observa inmediatamente una pequeña columna de humo blanco y se percibe el olor a quemado.

Usualmente, los espectrómetros Raman portátiles no permiten bajar la potencia del láser y el tiempo de adquisición más allá de ciertos niveles y ese es el caso del Inspector Raman, por lo que fue necesaria otra solución.

Una posibilidad es utilizar un filtro neutro, pero puede resultar difícil acoplarlo al espectrómetro (lo que constituye un problema menor) y sobre todo, atenúa la radiación en las dos direcciones, por lo que la señal que se recibe es extremadamente débil y no es fácil identificar bandas específicas de los compuestos presentes en los materiales analizados. Otra vía es enfriar la superficie que se estudia, lo que logramos con un flujo de helio que incide en la misma zona que el láser. Para lograr esto, se diseñó y construyó un colimador *pinhole* conectado a una línea de He y acoplado a la lente del espectrómetro (Figura 30).

Figura 72  
 Imágenes de microscopía óptica de bermellón (A, B, C), ocre (D, E, F) y piroxilina azul (G, H), después de adquirir espectros con el Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm, potencia mínima (20 mW).



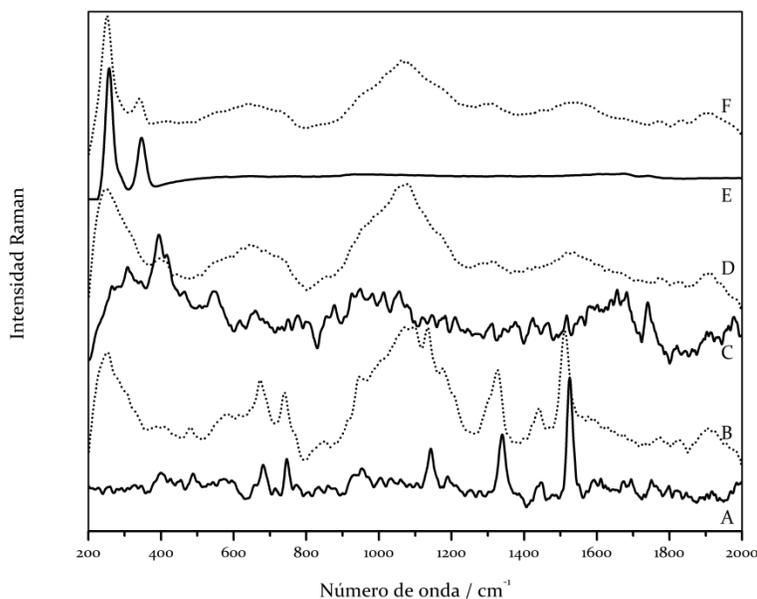
Para el bermellón y el ocre, un flujo de helio de 2 litros estándar por minuto (SLPM, siglas en inglés) fue suficiente para evitar los daños en la superficie. Inicialmente, los espectros se tomaron promediando tres adquisiciones de tres segundos cada una y no se observaron daños en la superficie (Figura 72, B y E). Luego se aumentó el tiempo a 10 s, promediando también tres espectros y tampoco se apreciaron señales de deterioro (Figura 72, C y F).

La piroxilina presentó síntomas de daños incluso a un flujo de helio de 9 SLPM, aunque al comparar las dos imágenes parece haber menos ablación al utilizar el helio y solo las capas más externas presentan cambios, menos dramáticos que cuando no se usa el helio (Figura 72, G y H). El tiempo de adquisición se mantuvo en el mínimo (1 s) y no se hicieron intentos de aumentarlo.

En la Figura 73 se observan las claras diferencias entre el espectro tomado con y sin helio. Para el bermellón, se observan sin helio las bandas características del HgS a  $282$  y  $346$   $\text{cm}^{-1}$ , pero con un fondo bastante alto, fundamentalmente debido a dos bandas anchas centradas en  $640$   $\text{cm}^{-1}$  y  $1060$   $\text{cm}^{-1}$ , probablemente debidas a fluorescencia, así como a las bandas D y G del carbono (alrededor de  $1315$  y  $1550$   $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>118</sup> Un flujo de helio de solo 2 SLPM fue suficiente para que desapareciera el ruido y las bandas del carbono, observándose solo las bandas del HgS (Figura 73, E y F).

Lo mismo ocurre con la muestra de ocre (Figura 73, C y D), sin el helio no se observa ninguna de las bandas características de los óxidos de hierro y solo están presentes varias bandas anchas e intensas, centradas en  $250$ ,  $650$  y  $1070$   $\text{cm}^{-1}$ , así como las bandas D y G del carbono. Al utilizar el helio a 2 SLPM, aunque la intensidad de la señal disminuye considerablemente, se pueden observar tres bandas características de la goetita en  $307$ ,  $393$  y  $549$   $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 73  
Espectros Raman de piroxilina azul (A, B), ocre (C, D) y bermellón (E, F). Las líneas grises corresponden a espectros de Raman normal y las negras a Raman enfriado con helio. Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm.



Como ya se discutió, la piroxilina es mucho más sensible al láser, pero las imágenes de microscopía óptica sugieren que el uso de helio permite disminuir el daño al pigmento. En la Figura 73, A y B, se aprecia que también mejora considerablemente la calidad del espectro al utilizar la corriente de helio. En el espectro de Raman normal, los picos de la piroxilina aparecen superpuestos sobre el intenso ruido del fondo (Figura 73, A), un fondo que presenta las mismas bandas ya observadas en los espectros de bermellón y ocre. Al utilizar un flujo de helio de 9 SLPM se logró eliminar el fondo y no se observan bandas de carbono en el espectro,

aunque, como ya se dijo, todavía se aprecia cierto grado de deterioro en las imágenes microscópicas. Es necesario optimizar el dispositivo experimental para disminuir el daño al pigmento.

Este efecto del helio está relacionado no solo con el enfriamiento de la superficie, sino también con la creación de una atmósfera inerte en la zona estudiada y se evitan así los procesos que llevan al deterioro del material estudiado. Como ya se vio en 2.5, estos fenómenos pueden incluir procesos de oxidación – reducción y de combustión, que llevan a la transformación de los pigmentos o de sus productos de degradación química.<sup>72, 73</sup> Es interesante que para el índigo se reporta la formación de una sustancia blanquecina, el leucoíndigo, lo que ha sido observado también en algunos estudios de campo realizados con el Inspector Raman. El principal efecto medido por De Santis<sup>73</sup> es el aumento de la temperatura localmente a valores de varios cientos de Kelvin (entre 400 K y 1200 K, en dependencia del compuesto estudiado), lo que apoya la hipótesis del efecto de enfriamiento provocado por el flujo de helio.

#### 4.3.2 EL MARTIRIO DE SAN PONCIANO

El método se aplicó al estudio de “El martirio de San Ponciano”, una pintura de gran relevancia, realizada en 1605 por Baltasar de Echave Orio, que se conserva en el Museo Nacional de Arte en la Ciudad de México y que se muestra en la Figura 74. Echave Orio es considerado uno de los fundadores de la escuela de pintura novohispana, al romper con la costumbre de imitar la pintura europea. Según las fuentes históricas, era conocido también por la amplia paleta de colores que utilizaba. Estas características nos llevaron a estudiar esta obra de principios del siglo XVII, pintada sobre tablas de madera.

Una pintura es un objeto muy complejo, su estudio requiere de técnicas imagenológicas para llevar a cabo la prospección de la obra y determinar las regiones más relevantes para el subsiguiente análisis instrumental utilizando diversas técnicas, como XRF, FTIR y Raman. Tras este estudio, realizado por el Laboratorio de Diagnóstico de Obras de Arte (LDOA) del Instituto de Investigaciones Estéticas (IIE) de la UNAM, se determinaron las regiones a analizar con espectroscopía Raman. Posteriormente se toma un número mínimo de muestras para el análisis microscópico de la sección transversal.

Los resultados de estudios previos con espectroscopía Raman de otras pinturas realizadas con técnica similar sugerían que la obra podía sufrir deterioro por efecto del láser, por lo que de manera preventiva todos los espectros se adquirieron utilizando el enfriamiento por helio. Se utilizó un

flujo de helio de 2 a 5 SLPM y se promediaron en cada punto tres espectros con un tiempo de adquisición de tres segundos cada uno. Al utilizar el colimador *pinhole* no es posible capturar imágenes microscópicas de la zona estudiada, pero una inspección visual realizada al culminar la adquisición de los espectros no reveló señales de deterioro en la obra.

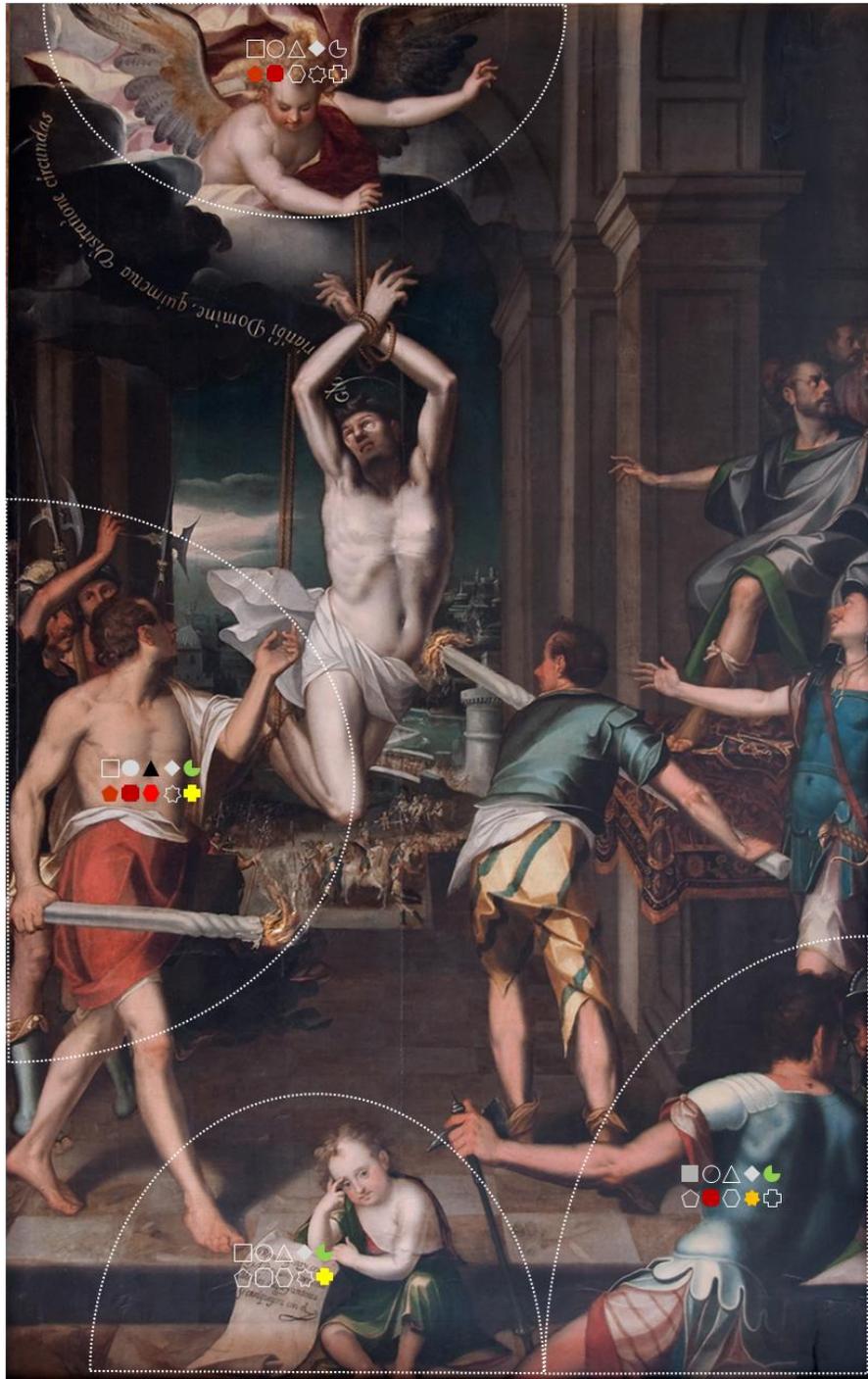
La pintura está cubierta por una gruesa capa de barniz, lo que hace difícil la obtención de un espectro claro de la capa pictórica y provocó que en la mayoría de los casos se observara una fuerte fluorescencia. Sin embargo, fue posible identificar algunos pigmentos y colorantes, así como algunos componentes de la capa de preparación.

En las áreas rojas y en las encarnaciones se encontró bermellón y palo de Brasil, en estas últimas mezclados con blanco de plomo, mientras que en las zonas de color pardo – grisáceo se observaron bandas de ocre. En las zonas blancas, además del blanco de plomo, se encontraron evidencias del uso de yeso. Con menor certeza se pudo identificar la presencia de verdigris y negro de carbón. Por último, en tres puntos se encontró un compuesto con bandas estrechas e intensas ubicadas en 419, 866 y 1266  $\text{cm}^{-1}$ , que no pueden ser asignadas con claridad pero que pueden estar relacionadas con un aceite, dado que estos compuestos presentan habitualmente bandas muy fuertes alrededor de 800 y 1240  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>119</sup> Algunos de los espectros adquiridos se muestran en la Figura 75, mientras que un resumen de los compuestos identificados en cada zona de la obra estudiada se encuentra en la Tabla 5.

La espectroscopía Raman permitió obtener información complementaria a la obtenida por otras técnicas analíticas. Si bien Raman tiene una profundidad de análisis menor que el FTIR o la fluorescencia de rayos X, fue factible identificar algunos materiales orgánicos como la laca de palo de Brasil, lo cual es relevante para determinar la paleta del pintor.

Los resultados obtenidos demuestran que la paleta de Echave Orio en esta obra es muy usual y más bien reducida, con respecto a lo que se podría esperar dada su fama de gran colorista. Lo anterior implica que el pintor sí tenía una técnica notable, usaba y combinaba con gran maestría los pigmentos que tenía disponibles y no lograba los efectos pictóricos con un gran número de pigmentos.

Figura 74 "El martirio de San Ponciano", Baltasar de Echave Orio, 1605, Museo Nacional de Arte, Ciudad de México. Las figuras coloreadas muestran las sustancias identificadas en cada zona.



- |                    |             |                  |                   |                     |
|--------------------|-------------|------------------|-------------------|---------------------|
| ■ Calcita          | ● Yeso      | ▲ Carbón         | ◆ Blanco de plomo | ◐ Verdigris         |
| ◈ Óxidos de hierro | ■ Bermellón | ● Palo de Brasil | ★ Aceite          | ✦ Amarillo de Pb-Sn |

Figura 75  
 Espectros Raman  
 adquiridos en “El  
 martirio de San  
 Ponciano”.  
 Inspector Raman,  
 $\lambda = 785 \text{ nm}$ .

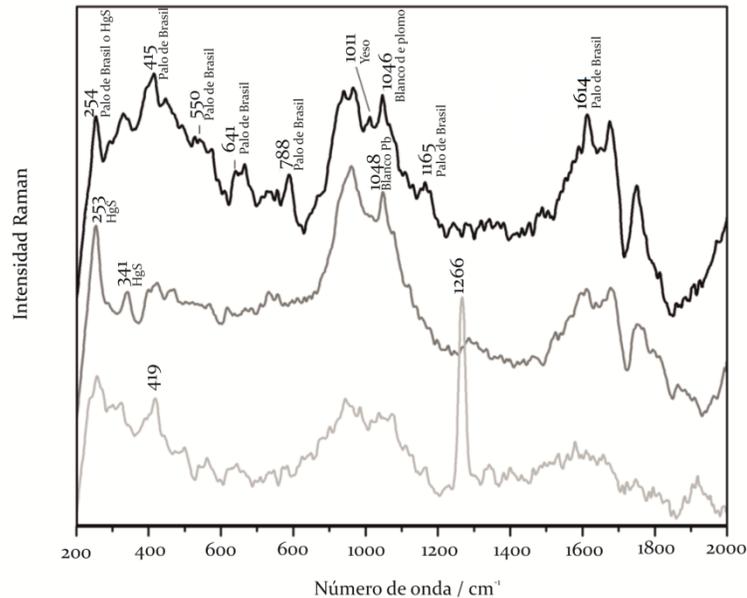


Tabla 5  
 Compuestos  
 identificados en  
 “El martirio de San  
 Ponciano”,  
 Baltasar de Echave  
 Orio, 1605, Museo  
 Nacional de Arte,  
 Ciudad de México.

Punto	Región	Color	Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
018	Ángel	Encarnación rosada	254, 341	Bermellón
			1047	Blanco de plomo
019		Pardo	354, 537	Óxidos de hierro
027		Pardo	397, 541	Óxidos de hierro
028		Amarillo	1052	Blanco de plomo
042	Esquina inferior derecha	Verde	1083	Calcita
			936	Verdigris
045		Blanco	1083	Calcita
046			1266	Aceite
047		Encarnación rosada	252, 343	Bermellón
			1052	Blanco de plomo
048		Blanco	1052	Blanco de plomo
057		Rosado	255	Bermellón
060		Rojo	255, 344	Bermellón
061		Encarnación rosada	255, 344	Bermellón
			1046	Blanco de plomo
063	Medio - izquierda	Amarillo	396	Óxidos de hierro
			1002	Yeso
			1049	Blanco de plomo
064		Rojo	251, 340	Bermellón
066		Encarnación rosada	258	Bermellón
			395	Óxidos de hierro
			1048	Blanco de plomo
			938	Verdigris
073		Encarnación rosada	255	Bermellón
			398	Óxidos de hierro
			1048	Blanco de plomo
			1610	Palo de Brasil

Punto	Región	Color	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
075		Encarnación rosada	255	Bermellón
			1046	Blanco de plomo
			414, 1011	Yeso
			254, 330, 415, 541, 641, 788, 940, 1165, 1614	Palo de Brasil
076		Encarnación rosada	256, 345	Bermellón
			1050	Blanco de plomo
			1002, 415	Yeso
			415, 942, 1610	Palo de Brasil
078		Pardo	391	Óxidos de hierro
			1333	Carbón
079		Pardo	1266	Aceite
080		Azul	1266, 866, 419	Aceite
083		Encarnación rosada	253, 344	Bermellón
			1045	Blanco de plomo
			253, 408, 538, 783, 941, 1619	Palo de Brasil
086		Blanco	1050	Blanco de plomo
088		Blanco	1050	Blanco de plomo
099		Pardo	553, 409	Óxidos de hierro
101		Blanco	1048	Blanco de plomo
104		Amarillo	1051	Blanco de plomo
107		Blanco	1050	Blanco de plomo
108		Negro	1333, 1580	Carbón
			935	Verdigris
119	Niño en la parte inferior	Encarnación rosada	1048	Blanco de plomo
125		Pardo	1050	Blanco de plomo
			456	Amarillo de Pb-Sn
126		Verde	944, 1437	Verdigris
129		Rosado	1046	Blanco de plomo
			944	Verdigris

#### 4.4 RAMAN DE PINTURA MURAL

A mediados del siglo XVI, la orden agustina comenzó la construcción de una serie de templos y conventos en el estado de Hidalgo. Varias de estas construcciones fueron profusamente decoradas con pinturas murales, algunas de ellas, como las que adornan el cubo de la escalera del ex-convento de San Nicolás de Tolentino en Actopan, son consideradas entre las mejores muestras del arte sacro novohispano.

Como parte de esta investigación, realizada en colaboración con el Laboratorio de Diagnóstico de Obras de Arte del Instituto de Investigaciones Estéticas de la UNAM, se estudiaron los murales de los templos y ex-conventos de San Nicolás de Tolentino, San Andrés Apóstol y San Miguel Arcángel, ubicados en Actopan, Epazoyucan e Ixmiquilpan,

respectivamente. En total, se adquirieron 441 espectros de Raman y SERS, que en su gran mayoría permitieron identificar los compuestos presentes en los murales.

Una muestra de los espectros Raman obtenidos se presenta en la Figura 76. En muchos puntos se encontró una fuerte fluorescencia que no pudo ser completamente eliminada utilizando la corrección de línea base del programa de adquisición de los espectros, pero casi siempre pudieron identificarse bandas específicas de varios pigmentos y algunos colorantes. En la Figura 77 se resumen los pigmentos y colorantes encontrados en los tres lugares, agrupados por color, mientras que la información completa de las bandas identificadas y su asignación, punto por punto, se puede encontrar en las tablas de los anexos.

Se observó la presencia de calcita en un enorme porcentaje de los puntos estudiados. Esto se debe tanto a su utilización para lograr tonos blancos como a la historia de los murales, que durante años estuvieron cubiertos por varias capas de cal. El proceso de eliminación de estas capas, mediante raspado, permitió recuperar los murales pero deja restos del encalado que pueden encontrarse en todas las zonas de los murales.

En menor medida, pero también presentes en todos los colores estudiados, se identificó la presencia de yeso y carbón. El yeso parece haber sido utilizado también extensamente, no solo para lograr colores blancos y tonos claros, sino probablemente como parte de la preparación de la superficie pintada. Las bandas de carbón, claramente observables en los colores negros y en menor medida en muchos de los espectros adquiridos, se debe a su uso para lograr tonos oscuros y probablemente también a pequeñas quemaduras en la superficie estudiada, provocadas por la energía depositada por el láser. Otro punto interesante es la presencia de bandas que parecen corresponder con algún aceite – que no pudo ser identificado del todo – según lo reportado por Vandenabeele en su estudio sobre los aceites utilizados en obras de arte mexicanas.<sup>119</sup> Estas bandas estaban presentes en todas las locaciones estudiadas y prácticamente en todos los colores, con excepción del verde y el amarillo.

Figura 76  
Espectros Raman  
adquiridos en las  
pinturas murales  
de los templos y  
ex-conventos  
agustinos de  
Actopan,  
Epazoyucan e  
Ixmiquilpan.  
Inspector Raman,  
 $\lambda = 785 \text{ nm}$ .

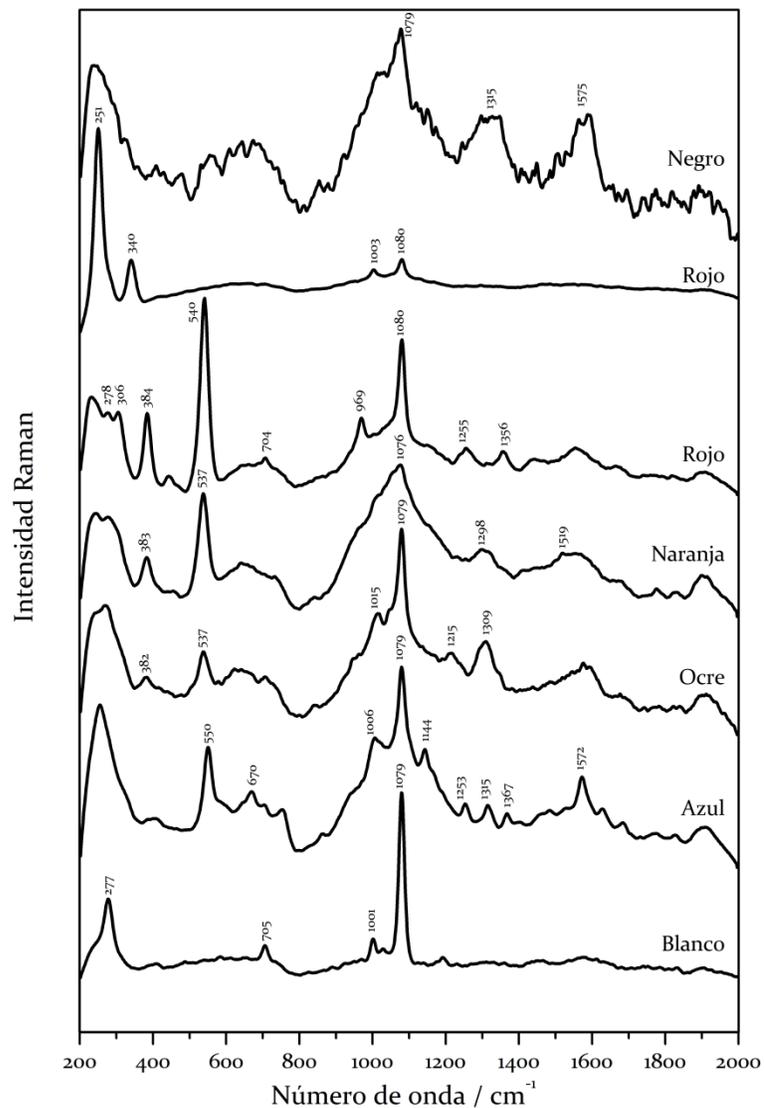
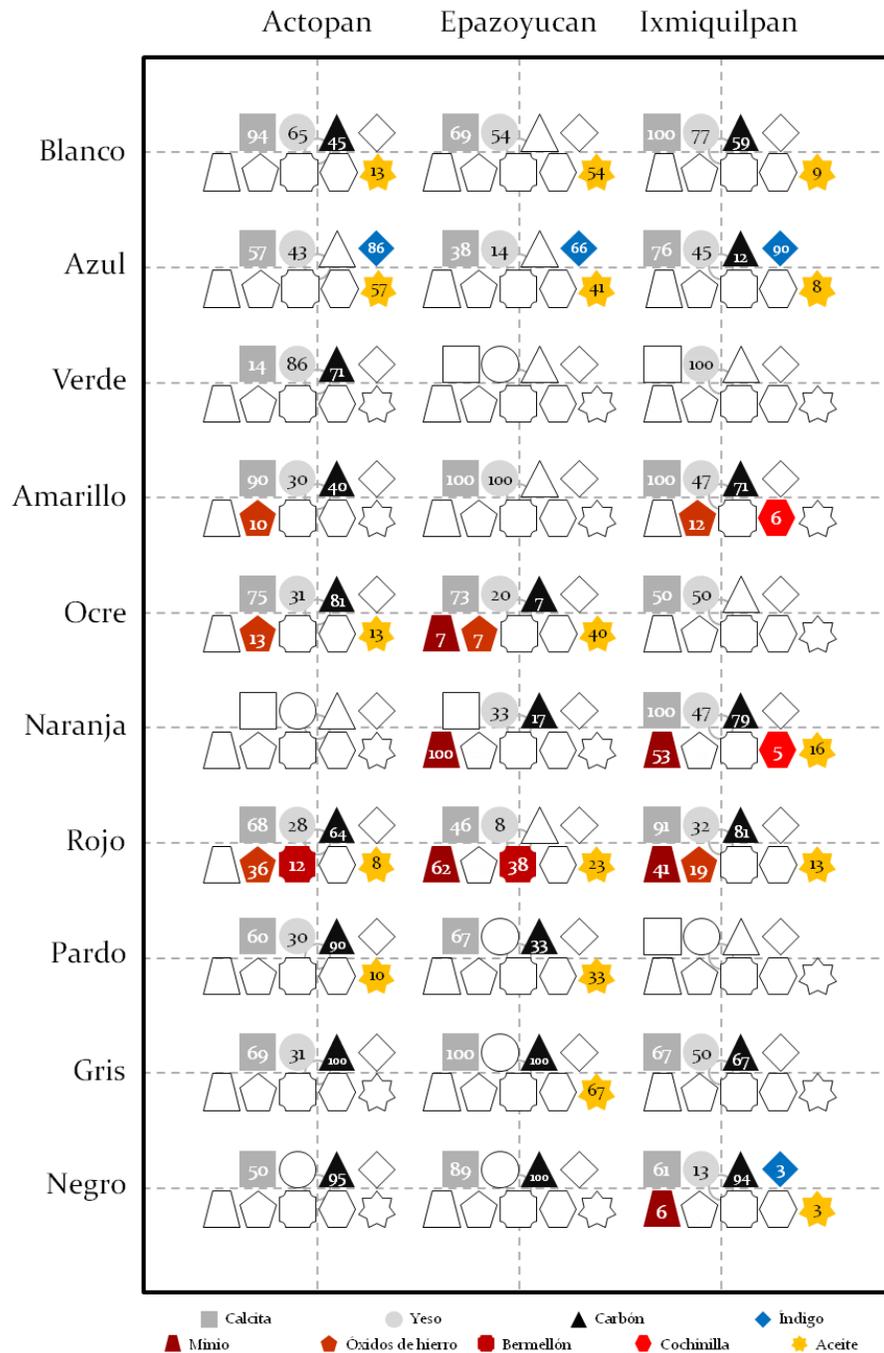


Figura 77  
 Pigmentos y colorantes identificados en las pinturas murales de los templos y ex-conventos agustinos de Actopan, Epazoyucan e Ixmiquilpan. Los números indican el porcentaje de aparición de cada compuesto en muestras de un mismo color, en cada lugar estudiado.



En todos los murales estudiados se identificó la presencia de índigo en los azules, muchas veces acompañado de calcita y yeso. A pesar de la fuerte fluorescencia que acompaña los espectros adquiridos en zonas azules, casi siempre fue posible observar los picos estrechos e intensos del índigo, principalmente las bandas cercanas a  $545\text{ cm}^{-1}$  y  $1570\text{ cm}^{-1}$ . Además, una gran parte de estos espectros presentaban las bandas de yeso y calcita.

En particular la presencia de índigo en el convento de Epazoyucan es de gran relevancia, pues se conoce que la pintura fue policromada a principios del siglo pasado. La coincidencia del azul de Prusia, de esta época (identificado mediante XRF), y el índigo – del período colonial – permite inferir que la policromía aplicada siguió en cierta medida la original del período novohispano.

Llamó la atención el uso de diferentes pigmentos rojos, pues se encontraron evidencias del uso de óxidos de hierro, minio y bermellón (HgS) en algunas zonas rojas. Sin embargo, no se utilizaron de igual manera en los tres lugares, lo que indica que existen diferencias en las técnicas pictóricas. Los rojos de Actopan se lograron utilizando óxidos de hierro y bermellón, si bien este último se empleó preferentemente en los labios de las figuras y en zonas donde se buscaba un tono de rojo más oscuro. El minio ( $Pb_3O_4$ ) se encontró fundamentalmente en los rojos y naranjas de Epazoyucan e Ixmiquilpan, aunque también fue identificado en algunos ocre de Epazoyucan (en estos ocre además se encontraron óxidos de hierro). Los rojos de este último convento también contenían bermellón, utilizado de la misma forma que en Actopan, mientras que en ninguno de los tonos rojos de Ixmiquilpan se obtuvo evidencia de la presencia de HgS. La presencia de estos pigmentos rojos fue confirmada paralelamente mediante fluorescencia de rayos X, incluso fueron identificados en algunos puntos en los que los espectros de Raman no aportaron información útil.

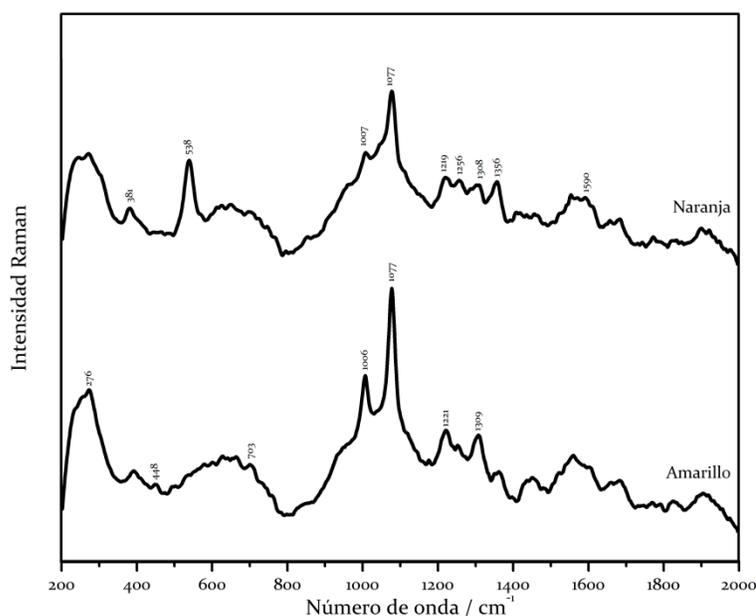
Otra particularidad de los murales del templo de San Miguel Arcángel en Ixmiquilpan es la presencia de índigo y de minio en tres zonas negras independientes. La última y quizás más interesante diferencia es la presencia de bandas atribuibles a la cochinilla en una zona naranja y otra amarilla, como se puede apreciar en los espectros que se muestran en la Figura 78. En el punto naranja, además de los picos de minio en  $381\text{ cm}^{-1}$  y  $538\text{ cm}^{-1}$ , se observan dos bandas comúnmente presentes en los espectros de cochinilla, en  $1219\text{ cm}^{-1}$  y  $1308\text{ cm}^{-1}$ , además de un pico en  $1590\text{ cm}^{-1}$ , este último difícil de observar pues se confunde dentro de la banda G del carbono. En la zona amarilla se observan con mayor intensidad las bandas en  $1219\text{ cm}^{-1}$  y  $1309\text{ cm}^{-1}$ , unidas a una banda débil en  $448\text{ cm}^{-1}$ .

Es necesario aclarar que esta identificación de cochinilla no está exenta de dudas y dificultades, primero porque la banda que aparece alrededor de  $1308\text{ cm}^{-1}$  está corrida con respecto a la que se encuentra en los espectros de ácido carmínico puro, donde aparece en la zona de  $1292\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, en pruebas realizadas con muestras de grana y lacas de cochinilla preparadas con esta grana, se observó el mismo corrimiento y la

banda apareció cercana a los  $1310\text{ cm}^{-1}$ . Otro elemento de duda es la presencia de bandas muy intensas en esa zona en varios de los espectros adquiridos en el ex-convento de San Andrés Apostol en Epazoyucan, y que fueron atribuidos a la presencia de aceites. No obstante, las bandas atribuidas a aceites en Ixmiquilpan aparecieron alrededor de  $1250\text{ cm}^{-1}$  y  $1350\text{ cm}^{-1}$ , por lo que no coincidirían con las bandas de cochinilla. De hecho, estas bandas de aceite aparecen junto a las de cochinilla en el espectro del punto naranja de la Figura 78.

La identificación de la paleta en estas pinturas murales aporta nuevos datos e información más precisa para el estudio de este patrimonio, que no había sido analizado de esta manera.

Figura 78  
 Espectros Raman  
 que sugieren la  
 presencia de  
 cochinilla. Templo  
 de San Miguel  
 Arcángel,  
 Ixmiquilpan.  
 Inspector Raman,  
 $\lambda = 785\text{ nm}$ .



#### 4.4.1 SERS EN PINTURAS MURALES

El estudio de los murales del templo de San Miguel Arcángel de Ixmiquilpan constituyó una oportunidad única de adquirir espectros de SERS directamente en los murales, seguramente por primera vez en México. De los 212 puntos analizados en este templo, en unos 20 se aplicaron además alícuotas de  $5\ \mu\text{L}$  de coloide agregado con  $\text{KNO}_3$ , utilizado como substrato de SERS en esta investigación. Una muestra de los espectros obtenidos, junto con los espectros de Raman normal correspondientes al mismo punto, se muestran en la Figura 79.

La amplificación de la señal de Raman no es del orden de la reportada comúnmente en la mayoría de los artículos sobre el tema,<sup>20, 26, 29</sup> pero en

casi todos los casos se observa una disminución de la fluorescencia y una mejor definición de los picos. Este efecto SERS tan discreto no es del todo inesperado, teniendo en cuenta la heterogeneidad de los murales y las condiciones reales en que se encuentran, cubiertos de polvo y otros contaminantes como excrementos de paloma, lo que obstaculiza la interacción de las nanopartículas de plata con los pigmentos y colorantes presentes en la superficie.

De los espectros que se muestran en la Figura 79, solo en el punto rojo no se observa una mejoría apreciable al utilizar la plata. En la zona azul se definen mejor los picos del yeso y la calcita, además de aparecer nuevos picos del índigo y de aceite en el espectro de SERS. Una banda de yeso, ausente en el espectro de Raman del amarillo, es claramente observable al utilizar SERS, mientras que se observa una gran disminución de la fluorescencia en el espectro del negro. Por último, en el naranja además de disminuir la fluorescencia pudieron observarse los picos de minio, ausentes en el espectro de Raman.

Este punto naranja y otro azul atrajeron nuestra atención al adquirir los espectros de SERS. En ambos casos los espectros de Raman mostraron una fluorescencia muy intensa y no permitieron identificar el pigmento o colorante utilizados. Al aplicar los coloides de plata se pudieron observar las bandas de minio en el naranja y de índigo en el azul. En la Figura 80 y la Figura 81 se muestran ampliaciones de la zona baja de estos espectros, donde se puede apreciar fácilmente el efecto SERS producido por las nanopartículas de plata. Si bien, como ya se dijo, no se trata de una gran amplificación, para el propósito de identificar los pigmentos y colorantes utilizados sí marca una gran diferencia, pues pasamos de no poder discernir la presencia de bandas específicas de ninguno de ellos, a identificar sin dudas la presencia de índigo y minio.

Aunque el método de SERS debe ser perfeccionado para su aplicación directa en obras patrimoniales, sin comprometer la integridad del objeto de estudio ni dejar residuos de los coloides utilizados, esta investigación constituye un primer paso en la introducción de una herramienta más en el análisis de obras de arte y objetos de interés histórico, que complementa otras técnicas ya establecidas y utilizadas con muy buenos resultados durante varios años.

Al mismo tiempo, nuevos métodos de aplicación de SERS deben ser desarrollados y probados en condiciones de laboratorio y de campo. De estos, dos de los más interesantes son el TERS<sup>54, 55, 56, 57</sup> y el uso de geles con nanopartículas<sup>120</sup> de plata, que en ambos casos permiten amplificar la señal

de Raman de las muestras sin alterarlas y sin dejar residuos en la zona estudiada.

Figura 79  
Espectros de Raman y SERS de pintura mural. Templo de San Miguel Arcángel, Ixmiquilpan. Línea sólida gris: Raman; línea sólida negra: SERS. Inspector Raman,  $\lambda = 785$  nm, coloide AgCt.

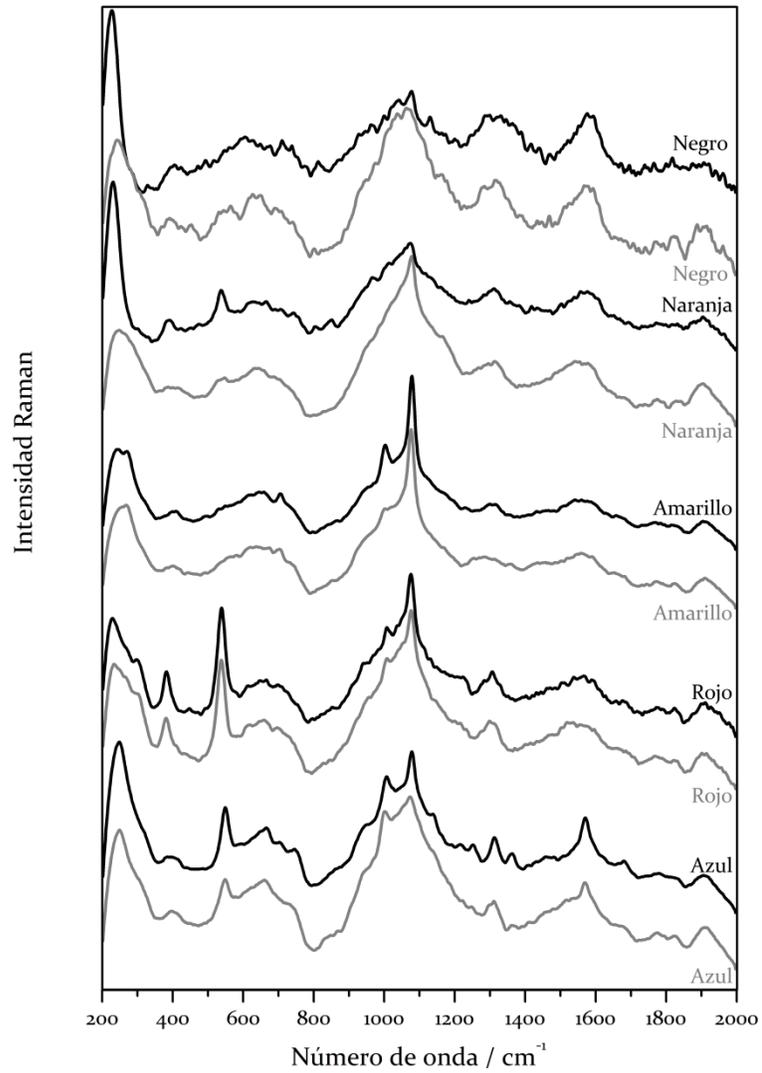


Figura 8o  
Intensificación  
SERS en una zona  
azul. Pintura  
mural en el  
templo de San  
Miguel Arcángel,  
Ixmiquilpan.  
Inspector Raman,  
 $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  
coloide AgCt.

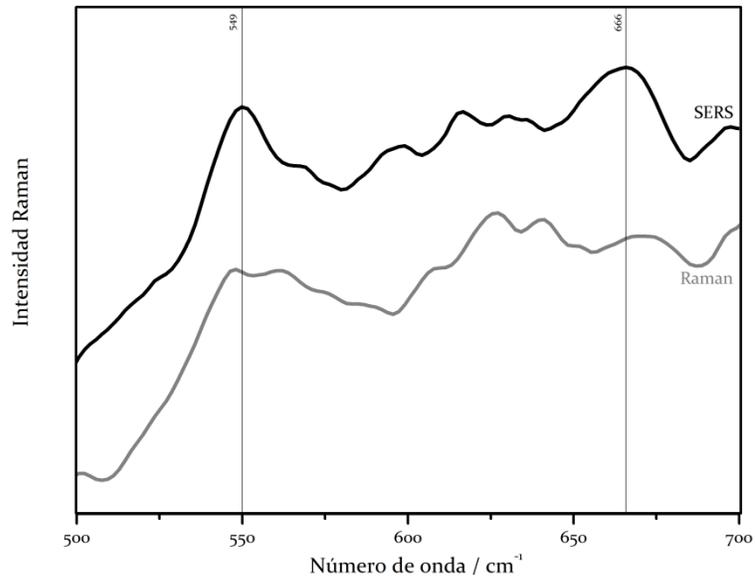
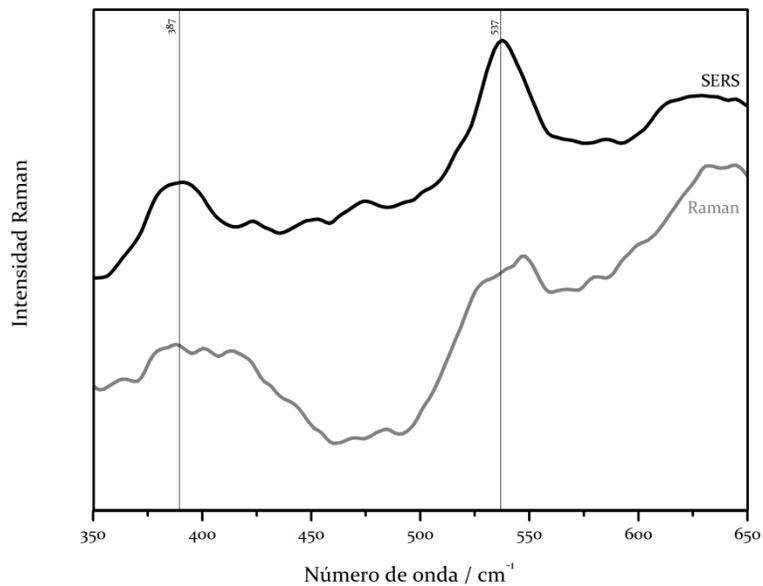


Figura 8i  
Intensificación  
SERS en una zona  
naranja. Pintura  
mural en el  
templo de San  
Miguel Arcángel,  
Ixmiquilpan.  
Inspector Raman,  
 $\lambda = 785 \text{ nm}$ ,  
coloide AgCt.



# 5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

---

Esta tesis constituye una investigación pionera en la aplicación de las espectroscopías Raman y SERS al estudio del patrimonio cultural mexicano y aporta nuevos métodos de estudio e identificación de los materiales presentes en los bienes culturales, fundamentalmente los pigmentos y colorantes. Estos métodos complementan otras técnicas ya establecidas previamente, como la imagenología ultravioleta e infrarroja, la fluorescencia de rayos X, la espectroscopía infrarroja y los estudios mediante aceleradores de partículas, que permiten la caracterización no destructiva de estos objetos.

Como resultado de este trabajo, se prepararon nanopartículas de plata y oro en suspensión coloidal y se caracterizaron por espectroscopía ultravioleta – visible y por microscopía electrónica de transmisión. Aunque no todos los coloides de plata y oro mostraron actividad SERS, los coloides de plata preparados por reducción con citrato de sodio fueron útiles para amplificar la señal de Raman y se mantuvieron estables durante más de un año, con lo que se sobrepasó ampliamente el tiempo de vida útil de estos materiales, comúnmente aceptado como tres meses.

Los colorantes orgánicos utilizados en México constituyen un interesante objeto de estudio, por su diversidad y por ser poco conocidos, si se exceptúa un pequeño grupo encabezado por el índigo y la cochinilla. Esta investigación permitió la adquisición de espectros SERS de extractos de colorantes mexicanos y de fibras de lana teñidas. Los espectros obtenidos

de muiltle, zacatlaxcalli y cempazúchitl son probablemente los primeros adquiridos mediante esta técnica y, junto con los del resto de los colorantes estudiados, constituyen una referencia para estudios posteriores.

La espectroscopía Raman no está exenta de riesgos y la energía depositada por el láser puede provocar pequeños daños a los objetos analizados. Una parte de este trabajo estuvo dedicado a buscar una solución a este problema y se diseñó y construyó un colimador que permite acoplar el espectrómetro Raman a un flujo de helio, lo que minimiza y en muchos casos evita por completo el deterioro de la superficie. Estos flujos de helio ya habían sido utilizados previamente en análisis mediante haz externo en aceleradores de partículas, pero es la primera vez que se utiliza en espectroscopía Raman. Se obtuvieron espectros Raman mediante enfriamiento por helio de muestras sensibles al láser, en condiciones de laboratorio y luego la técnica se aplicó con éxito en un caso de estudio: el análisis de “El martirio de San Ponciano”, de Baltasar de Echave Orio.

La experiencia adquirida en el laboratorio fue aplicada al análisis de un buen número de bienes patrimoniales, entre los que destacan las pinturas murales de los templos y ex-conventos agustinos de Actopan, Epazoyucan e Ixmiquilpan. Estos murales fueron estudiados mediante espectroscopías Raman y SERS, lo que permitió obtener resultados relevantes como la presencia de índigo en los azules – que sugiere que la policromía de los murales data del período colonial – y la identificación de diferentes pigmentos y colorantes en la paleta, signo de la aplicación de diversas técnicas pictóricas. Además, este estudio de SERS constituye la primera aplicación de este método al análisis de pinturas murales en México.

Aunque se cumplieron los objetivos propuestos, esta investigación presentó algunas limitaciones que a su vez indican las líneas a seguir para profundizar y mejorar estos estudios. En primer lugar, son necesarias nuevas investigaciones para crear una base de datos amplia de los colorantes y pigmentos utilizados en México, comenzando por su identificación a partir de las fuentes históricas y etnográficas disponibles, la identificación de sus fuentes y la determinación de su composición. Paralelamente, estos compuestos deben ser caracterizados para contar con el espectro de la sustancia pura y de los extractos y lacas preparados con ellos. Estas bases de información han de permitir una mejor interpretación de los resultados obtenidos en el estudio de bienes culturales mediante técnicas no invasivas.

Además, es necesario mejorar la técnica del Raman enfriado con helio, de forma tal que su aplicación sea aún más segura y permita la utilización simultánea del microscopio, asegurando así un enfoque correcto en la zona de interés. Paralelamente, debe estudiarse la utilización de filtros neutros, acoplados al extremo del microscopio y debe valorarse en qué casos es más factible la utilización de uno u otro método.

Por último, aunque los coloides de plata demostraron ser un substrato de SERS muy efectivo, su aplicación directa a muestras reales está limitada por ser invasiva, por lo que es necesario desarrollar y aplicar técnicas de SERS que permitan su empleo en los análisis de bienes culturales, sin provocar alteraciones ni generar residuos. Resulta interesante, en este sentido, estudiar la aplicación del TERS y de los geles con coloides de plata.

# 6 ANEXOS

**Tabla 6**  
*Compuestos identificados en la pintura mural del ex-convento de San Nicolás de Tolentino, Actopan.*

Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )		Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
ACT101	Pardo	Carbón	1305	1544	ACT303	Ocre	Calcita	1078	
ACT102	Pardo	Carbón	1312	1538			Carbón	1311	1547
ACT103	Pardo	Carbón	1291	1584	ACT304	Ocre	Carbón	1292	1538
		Calcita	1078		ACT305	Blanco	Yeso	1004	
		Yeso	1000				Calcita	1082	
ACT104	Pardo	Carbón	1298	1562			Carbón	1310	1537
		Calcita	1076		ACT306	Blanco	Calcita	1082	
		Yeso	1002				Carbón	1552	
ACT105	Rojo	Carbón	1312	1547	ACT307	Blanco	Yeso	1006	
ACT106	Rojo	Bermellón	245				Calcita	1083	
		Óxidos de hierro	282	402			Carbón	1295	1537
		Yeso	1009		ACT308	Blanco	Yeso	1007	
		Calcita	1073				Calcita	1084	
		Carbón	1296	1566			Carbón	1586	
ACT107	Negro	Carbón	1319	1564	ACT309	Blanco	Calcita	1083	
ACT108	Blanco	Calcita	1076				Carbón	1304	1550
		Yeso	1008		ACT310	Blanco	Calcita	1084	
		Carbón	1310	1566			Carbón	1314	1525
ACT109	Negro	Carbón	1315	1537	ACT311	Blanco	Yeso	1004	
ACT110	Rojo	Óxidos de hierro	286	396			Calcita	1082	
		Yeso	1005				Carbón	1528	
		Calcita	1074		ACT312	Blanco	Yeso	1005	
		Carbón	1308	1562			Calcita	1082	
ACT111	Pardo	Carbón	1313	1577			Carbón	1289	1560
		Yeso	1001		ACT313	Negro	Calcita	1082	
		Calcita	1078	705			Carbón	1326	1571
ACT112	Gris	Carbón	1313	1576	ACT314	Negro	Calcita	1080	
		Yeso	1006				Carbón	1295	1563
ACT113	Negro	Carbón	1295	1576	ACT315	Blanco	Yeso	1013	
		Calcita	1076				Aceite	1224	1310
ACT114	Ocre	Calcita	1078		ACT316	Blanco	Yeso	1009	
		Aceite	1259	1357	1444		Calcita	1079	
ACT115	Ocre	Carbón	1307	1536			Aceite	1308	
		Calcita	1078		ACT317	Amarillo	Calcita	1076	
ACT116	Blanco	Calcita	1078				Carbón	1557	
		Yeso	1004		ACT318	Amarillo	Yeso	999	
ACT117	Negro	Carbón	1312	1547			Calcita	1077	
ACT118	Gris	Carbón	1309	1559			Carbón	1297	1555
		Yeso	1012		ACT319	Rojo	Calcita	1074	
ACT119	Amarillo	Óxidos de hierro	389				Carbón	1282	1547
		Calcita	1076		ACT320	Rojo	Carbón	1307	1528
		Carbón	1298	1556	ACT321	Rojo	Calcita	1077	
ACT120	Amarillo	Carbón	1302	1544			Carbón	1568	
ACT121	Blanco	Yeso	1007				Aceite	1259	1358
		Calcita	1078		ACT322	Rojo	Calcita	1075	
		Carbón	1319	1539			Carbón	1549	
ACT122	Negro	Carbón	1310	1552			Aceite	1256	1356
ACT123	Rojo	Carbón	1305	1547	ACT323	Rojo	Calcita	1077	
ACT124	Pardo	Carbón	1297	1565			Carbón	1539	
ACT125	Blanco	Yeso	1001		ACT324	Rojo	Calcita	1076	
		Calcita	1078				Carbón	1293	1529
		Carbón	1542		ACT325	Rojo	Calcita	1077	

Espectroscopías Raman y SERS en el estudio del patrimonio cultural mexicano  
ANEXOS

Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )
ACT126	Blanco	Yeso	1009	ACT326	Rojo	Calcita	1077
		Calcita	1078	ACT327	Rojo	Óxidos de hierro	272 398
		Carbón	1555			Calcita	100
		Aceite	1120 1216 1308			Yeso	1077
ACT127	Gris	Yeso	1009	ACT328	Rojo	Yeso	998
		Calcita	1077			Calcita	1076
		Carbón	1309 1572			Carbón	1314 1594
ACT128	Gris	Yeso	1012	ACT329	Ocre	Carbón	1296 1532
		Calcita	1078	ACT330	Pardo	Calcita	1078
		Carbón	1311 1567			Carbón	1318 1525
		Carbón	1310 1538			ACT331	Pardo
ACT129	Gris	Carbón	1310 1538	ACT332	Ocre	Carbón	1568
		Óxidos de hierro	402			Aceite	1259 1358
		Calcita	1079			Yeso	1000
ACT130	Rojo	Carbón	1302 1558	ACT333	Ocre	Calcita	1077
		Óxidos de hierro	405			Carbón	1296 1540
		Calcita	1079			ACT334	Ocre
ACT131	Rojo	Carbón	1298 1530	ACT335	Ocre	Carbón	1296 1548
		Óxidos de hierro	226 287 402			Calcita	1076
		Carbón	1317 1536			Carbón	1298 1581
ACT132	Rojo	Bermellón	246 336	ACT336	Blanco	Calcita	1078
ACT133	Rojo	Bermellón	251 341	ACT337	Negro	Yeso	1005
ACT134	Rojo	Bermellón	251 341			Carbón	1317 1574
ACT135	Negro	Carbón	1312 1544	ACT338	Blanco	Calcita	1075
ACT136	Negro	Carbón	1317 1554	ACT339	Gris	Calcita	1074
ACT201	Negro	Carbón	1287 1572	ACT340	Blanco	Carbón	1576
		Calcita	1076			Calcita	1076
ACT202	Azul	Indigo	546 1311 1569	ACT341	Negro	Calcita	1076
		Aceite	1247	ACT342	Negro	Carbón	1292 1578
		Indigo	544 1308 1569			Calcita	1076
ACT203	Azul	Calcita	1075	ACT343	Blanco	Carbón	1292 1578
		Aceite	1247			Yeso	1000
		Yeso	1000			Calcita	702 1077
ACT204	Ocre	Calcita	1075 1568	ACT344	Negro	Calcita	1076
		Carbón	1300 1568			Carbón	1323 1543
		Yeso	1000			ACT345	Negro
ACT205	Blanco	Calcita	1077	ACT346	Gris	Calcita	1076
ACT206	Rojo	Yeso	1000	ACT347	Gris	Carbón	1552
		Calcita	1077			Calcita	1076
ACT207	Amarillo	Calcita	703 1077	ACT348	Blanco	Carbón	1571
ACT208	Amarillo	Calcita	704 1078			Yeso	1002
ACT209	Blanco	Yeso	1002	ACT349	Gris	Calcita	1077
ACT210	Blanco	Calcita	705 1079			Carbón	1573
		Calcita	704 1078			ACT350	Negro
ACT211	Amarillo	Yeso	1001	ACT351	Gris	Carbón	1316 1576
ACT212	Amarillo	Calcita	1079			Calcita	1076
		Yeso	1002	Carbón	1302 1575		
ACT213	Negro	Calcita	1079	ACT352	Blanco	Calcita	1076
ACT214	Blanco	Yeso	1000	ACT353	Gris	Carbón	1309 1576
		Calcita	1077			Calcita	1076
		Aceite	1256 1353			Carbón	1309 1576
ACT215	Pardo	Calcita	1075	ACT354	Blanco		
		Carbón	1292 1540	ACT355	Ocre		
ACT216	Azul	Indigo	548 1313 1569	ACT401	Rojo	Óxidos de hierro	400
ACT217	Azul	Yeso	1006	ACT402	Rojo	Yeso	997
		Calcita	1076			Calcita	1075
		Aceite	1249			Óxidos de hierro	400 998
		Yeso	1010	Yeso	998		
ACT218	Verde	Carbón	1319 1537	ACT403	Blanco	Calcita	1076
		Yeso	1006			Yeso	999
		Calcita	1077			Carbón	1312 1566
ACT219	Verde	Carbón	1320 1553	ACT404	Negro	Carbón	1312 1566
		Yeso	1007	ACT405	Blanco	Yeso	998
ACT220	Verde	Carbón	1327 1518	ACT406	Blanco	Calcita	1076
		Yeso	1006			Calcita	703 1077
ACT221	Verde	Carbón	1335 1570	ACT407	Negro	Carbón	1559
		Calcita	1307 1537	Calcita	1075		
ACT222	Verde	Carbón	1307 1537	ACT501	Azul	Indigo	550 1566
		Indigo	548 1312 1570			Calcita	1076
		Yeso	1008			Yeso	995
		Calcita	1077			Aceite	1254 1357
ACT224	Verde	Yeso	1002	ACT502	Azul		
ACT225	Verde	Yeso	1000	ACT503	Amarillo	Calcita	1077
ACT226	Ocre	Óxidos de hierro	393	ACT504	Pardo		
		Yeso	1005	ACT505	Blanco	Calcita	1075
		Calcita	1075	ACT506	Negro	Calcita	1077
		Carbón	1293 1550	Carbón	1593		
ACT227	Ocre	Óxidos de hierro	392	ACT507	Rojo	Óxidos de hierro	287 402 488
		Yeso	1001	ACT601	Rojo		
		Calcita	1077	ACT602	Amarillo	Calcita	1077
		Carbón	1287 1581	ACT603	Gris	Calcita	1074
ACT228	Blanco	Yeso	1000	ACT604	Gris	Carbón	1295 1553
		Calcita	1078			Calcita	1075
ACT229	Ocre	Yeso	1003	ACT605	Rojo	Carbón	1295 1564
		Calcita	1077			Calcita	1076
ACT301	Ocre	Carbón	1288 1533	Carbón	1538		
ACT302	Ocre	Calcita	1078				
		Carbón	1557				
		Aceite	1254 1355				

Tabla 7  
Compuestos  
identificados en la  
pintura mural del  
ex-convento de  
San Andrés  
Apóstol,  
Epazoyucan.

Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )		Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	
EPA01	Azul				EPA53	Azul	Indigo	547	1579
EPA02	Azul	Indigo Calcita	548 1081	1574			Calcita Aceite	1078 1313	
EPA03	Azul	Aceite	586	1029 1192	EPA54	Azul	Indigo Calcita	547 1079	1571
EPA04	Pardo	Calcita	1081		EPA55	Azul	Indigo Calcita	549 1077	1313 1571
EPA05	Pardo				EPA56	Blanco	Calcita	1079	
EPA06	Rojo	Aceite	586	1029 1192	EPA57	Blanco	Yeso Calcita Aceite	1001 1079 1258	1355 1444
EPA07	Azul	Aceite	586	1029 1192				1559 1673	
EPA08	Azul	Aceite	586	1029 1192	EPA58	Azul	Indigo	545	1572
EPA09	Blanco	Aceite	586	1029 1192	EPA59	Blanco	Calcita Yeso	705 1001	1079
EPA10	Blanco	Aceite	586	1029 1192	EPA60	Naranja	Minio	378	534
EPA11	Negro	Calcita Carbón	1081 1321	1584	EPA61	Azul	Indigo Aceite	547 1219	1573 1308
EPA12		Aceite	586	1029 1192	EPA62	Blanco	Yeso Calcita	1001 1078	
EPA13		Aceite	586	1029 1192	EPA63	Rojo	Minio Calcita Aceite	306 278 969	384 704 1255
EPA14	Azul							1356	
EPA15	Azul				EPA64	Rojo	Bermellón Calcita	246 1077	334
EPA16	Azul				EPA65	Ocre			
EPA17	Azul	Aceite	586	1029 1192	EPA66	Ocre	Yeso Calcita Aceite	1005 1079 1218	1308
EPA18	Rojo	Bermellón	246	337	EPA67	Ocre	Minio Yeso Calcita Aceite	382 1015 1079 1215	537 1309
EPA19	Rojo	Minio	385	541	EPA68	Blanco	Yeso Calcita Aceite	1007 1079 1221	1308 1601
EPA20	Rojo	Minio	381	535	EPA69	Blanco	Yeso Aceite	1007 1194	1224 1314
EPA21	Rojo	Minio	383	535				1602 1688	
		Aceite	1030	1190	EPA70	Ocre	Calcita Aceite	1078 1306	
EPA22	Rojo	Minio	384	538	EPA71	Ocre	Yeso Calcita Aceite	1007 1079 1221	1308 1596
EPA23	Ocre	Calcita	1079					1687	
EPA24	Rojo	Minio	383	538	EPA72	Ocre	Calcita	1079	
EPA25	Rojo	Bermellón Yeso Calcita	251 1003 1080	340	EPA73	Ocre	Calcita	1079	
EPA26	Azul	Indigo Calcita	550 1080	1570	EPA74	Ocre	Calcita Carbón	1079 1309	1590
EPA27	Azul				EPA75	Ocre			
EPA28	Ocre	Calcita Óxidos de hierro	1076 389	539	EPA76	Azul	Indigo	551	1315 1572
EPA29	Ocre				EPA77	Azul	Indigo Calcita	553 1077	1316 1573
EPA30	Ocre	Aceite	967	1028 1192	EPA78	Azul	Indigo	549	1313 1571
EPA31	Azul	Aceite	968	1029 1193	EPA79	Naranja	Minio	393	543
EPA32	Ocre	Calcita	1080		EPA80	Naranja	Minio	387	541
EPA33	Ocre	Calcita Aceite	1078 1223	1308	EPA81	Naranja	Minio	384	543
EPA34	Negro	Calcita Carbón	1079 1316	1575	EPA82	Naranja	Minio Yeso Carbón	385 1004 1310	543 1543
EPA35	Negro	Calcita Carbón	1079 1315	1575	EPA83	Naranja	Minio Carbón	385 1311	541 1544
EPA36	Azul	Calcita Indigo	1079 547	1573	EPA84	Negro	Carbón Calcita	1292 1081	1585
EPA37	Azul	Calcita Indigo	1076 547	667 748	EPA85	Negro	Carbón Calcita	1319 1080	1586
			1019 1569	1311 1358	EPA86	Pardo	Calcita Carbón Aceite	709 1568 1265	1082 1359
EPA38	Azul	Indigo Aceite	542 968	1571 1028 1192	EPA87	Gris	Carbón Calcita	1310 1080	1576
			1309		EPA88	Negro	Carbón Calcita	1321 1082	1578
EPA39	Azul	Indigo Yeso Aceite	551 1006 1222	1573	EPA89	Negro	Carbón Calcita	1292 1080	1585
EPA40	Azul	Indigo Yeso Aceite	550 1005 1222	1310 1690	EPA90	Gris	Carbón Calcita Aceite	1562 1083 1260	1359
			1605 1688	1467	EPA91	Gris	Carbón Calcita Aceite	1572 1083 1357	1421
EPA41	Azul	Indigo Calcita Yeso	551 1079 1004	1315 1572	EPA92	Blanco	Carbón Calcita Aceite	1565 709 1260	1082 1357 1437
EPA42	Azul	Indigo	550	670 1315	EPA93	Negro	Carbón	1306	1591
			1572		EPA94	Negro	Carbón Calcita	1311 1080	1585
		Calcita Yeso Aceite	1079 1006 1253	1144 1367					
EPA43	Azul	Indigo Calcita	547 1076	1311 1570					
EPA44	Azul								
EPA45	Rojo	Bermellón Calcita	243 1076	332					
EPA46	Rojo	Minio Calcita	381 1077	538					
EPA47	Blanco	Calcita	1078						
EPA48	Blanco								
EPA49	Rojo	Bermellón Óxidos de hierro Calcita	247 383 1078	335 539					
EPA50	Blanco	Yeso Calcita Aceite	1001 1080 1319						
EPA51	Blanco	Yeso Calcita	1001 1080						
EPA52	Amarillo	Yeso Calcita	1001 1080						

Tabla 8  
Compuestos  
identificados en la  
pintura mural del  
templo de San  
Miguel Arcángel,  
Ixmiquilpan.

Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )			Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )		
IXM001	Amarillo	Calcita	1076			IXM151	Azul	Indigo	547	660	1312
		Yeso	1002					1570			
		Carbón	1286	1558				1077			
IXM001S	Amarillo	Calcita	1078			IXM152	Naranja	Minio	381	538	
		Yeso	1002					Yeso	1009		
IXM002	Azul	Indigo	548	1311	1569			Calcita	1076		
		Calcita	1073					Carbón	1553		
		Yeso	1001								
IXM002S	Azul	Indigo	549	666	1312	IXM153	Negro	Carbón	1315	1566	
		Yeso	1363	1570		IXM154	Negro	Carbón	1315	1537	
		Yeso	1007	1138	1078		Minio	397	537		
IXM003	Negro	Carbón	1305	1544	IXM201	Blanco	Calcita	703	1076		
IXM004	Negro	Carbón	1296	1570				Yeso	998		
		Calcita	1075								
IXM005	Negro	Carbón	1303	1567	IXM202	Rojo	Minio	379	535		
IXM005S	Negro	Carbón	1332	1561			Calcita	1077			
IXM006	Negro	Carbón	1300	1560	IXM203	Azul	Indigo	547	664	1312	
IXM007	Negro	Carbón	1313	1556				Yeso	1005		
		Calcita	1076						Calcita	1077	
IXM008	Negro	Carbón	1315	1568	IXM204	Blanco	Yeso	999			
IXM008S	Negro	Carbón	1327	1581			Calcita	703	1077		
		Calcita	1077								
IXM009	Azul	Indigo	547	1314	1569	IXM205	Rojo	Minio	385	539	
		Calcita	1077				Calcita	703	1077		
IXM009S	Azul	Indigo	548	663	1314	IXM206	Rojo	Minio	381	537	
		Yeso	1369	1460	1571			Calcita	704	1077	
		Calcita	1079					Carbón	1293	1564	
IXM010	Negro	Yeso	1140			IXM208	Negro	Carbón	1313	1569	
		Carbón	1560				Calcita	705	1076		
		Calcita	1075			IXM209	Naranja	Calcita	703	1077	
IXM011	Naranja	Calcita	1076					Carbón	1314	1572	
		Carbón	1292	1573							
IXM012	Azul	Carbón	1305	1532	IXM210	Naranja	Calcita	702	1077		
IXM013	Azul	Indigo	545					Carbón	1297	1581	
		Carbón	1304	1555							
IXM014	Rojo	Minio	380	537		IXM211	Naranja	Calcita	704	1078	
		Calcita	703	1078				Carbón	1319	1578	
		Carbón	1310	1557							
IXM014S	Rojo	Minio	547			IXM212	Naranja	Calcita	703	1077	
		Calcita	1078					Carbón	1313	1550	
		Carbón	1566								
IXM015	Rojo	Yeso	1254	1355		IXM213	Negro	Carbón	1296	1567	
		Minio	383	538				Calcita	1079		
		Calcita	1077								
IXM016	Naranja	Carbón	1310	1543		IXM214	Blanco	Calcita	704	1078	
		Yeso	1005					Yeso	1000		
		Calcita	704	1078					Acetate	1259	1349
IXM016S	Naranja	Carbón	1308	1584		IXM215	Azul	Indigo	546	665	1312
		Yeso	1004					Yeso	1570		
		Calcita	1078						Calcita	703	1078
IXM017	Naranja	Carbón	1320	1555		IXM216	Rojo	Oxidos de hierro	383	536	
		Calcita	1078					Calcita	1076		
		Carbón	1313	1577					Carbón	1311	1576
IXM017S	Naranja	Minio	390	537		IXM217	Amarillo	Calcita	703	1078	
		Yeso	1012					Carbón	1312	1576	
		Calcita	1074						Yeso	706	1079
IXM018	Rojo	Carbón	1311	1557		IXM217S	Amarillo	Calcita	1258	1356	
		Carbón	1562					Acetate	1258	1356	
		Acetate	1254	1353							
IXM018S	Rojo	Calcita	1078			IXM218	Azul	Indigo	549	666	744
		Carbón	1311	1567				Yeso	1313	1571	
IXM019	Rojo	Oxidos de hierro	391	545						Calcita	1078
		Carbón	1297	1547							
		Calcita	1078			IXM219	Azul	Indigo	547	1310	1569
IXM019S	Rojo	Carbón	1296	1541				Calcita	1078		
		Calcita	1077								
		Carbón	1295	1543		IXM220	Blanco	Yeso	1000		
IXM020	Rojo	Calcita	1077					Calcita	705	1078	
		Carbón	1301	1539							
		Yeso	110			IXM221	Azul	Indigo	547	664	1312
IXM021	Naranja	Minio	383	539				Yeso	1571		
		Calcita	1078						Calcita	1078	
		Carbón	1304	1535		IXM222	Azul	Indigo	549	665	744
IXM022	Blanco	Calcita	704	1078				Yeso	1314	1571	
		Yeso	1006						Calcita	703	1078
		Carbón	1302	1592				Yeso	1004	1142	
IXM023	Blanco	Calcita	703	1078		IXM223	Naranja	Oxidos de hierro	388	539	
		Yeso	1007					Calcita	705	1078	
		Carbón	1314	1575					Carbón	1305	1567
IXM024	Azul	Carbón	1307	1530				Acetate	1256	1348	
		Indigo	546	659	744						
IXM025	Azul	Indigo	1312	1564		IXM224	Rojo	Minio	387	538	
		Carbón	1293	1556				Calcita	703	1078	
		Calcita	1078						Carbón	1296	1567
IXM026	Negro	Carbón	1293	1556		IXM225	Amarillo	Calcita	1077		
		Calcita	1078					Carbón	1295	1561	
		Yeso	110								
IXM027	Azul	Indigo	545	658	1302	IXM226	Negro	Carbón	1310	1572	
		Yeso	1567					Calcita	1081		
		Calcita	1074								
IXM028	Azul	Indigo	542	1308	1568	IXM227	Blanco	Calcita	704	1078	
		Carbón	1290	1525				Carbón	1294	1573	
IXM029	Negro	Carbón	1290	1525						Yeso	1000
		Calcita	1075								
		Yeso	1567			IXM228	Azul	Indigo	551	661	1316
IXM030	Azul	Indigo	545	659	1310			Yeso	1572		
		Calcita	1075						Yeso	705	1079
IXM101	Azul	Indigo	545	659	1312	IXM229	Azul	Indigo	547	665	742
		Yeso	1569					Yeso	1311	1570	
		Calcita	1077						Calcita	1079	
IXM102	Amarillo	Yeso	1012					Acetate	1250	1357	
		Calcita	1077								
		Carbón	1290	1525		IXM230	Amarillo	Calcita	705	1078	
IXM30	Azul	Indigo	545	659	1310			Carbón	1317	1549	
		Calcita	1075								
		Yeso	1567			IXM231	Amarillo	Calcita	1078		
IXM101	Azul	Indigo	545	659	1312			Carbón	1313	1564	
		Yeso	1569								
		Calcita	1075			IXM231S	Amarillo	Calcita	275	705	1079
IXM102	Amarillo	Yeso	1012					Calcita	276	702	1078
		Calcita	1077								
		Carbón	1290	1525		IXM232	Amarillo	Yeso	1001		
IXM101	Azul	Indigo	545	659	1312			Carbón	1333	1590	
		Yeso	1569						Calcita	1078	
		Calcita	1077			IXM233	Negro	Carbón	1333	1590	
IXM102	Amarillo	Yeso	1012					Calcita	1078		
		Calcita	1077								
		Carbón	1290	1525		IXM234	Azul	Indigo	548	1569	

Espectroscopías Raman y SERS en el estudio del patrimonio cultural mexicano  
ANEXOS

Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )		Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )		
IXM103	Rojo	Carbón	1293	1570	IXM234S	Azul	Calcita	1078		
		Carbón	1293	1552			Yeso	1259	1359	
		Calcita	1075				Indigo	547	1309	1571
IXM104	Pardo	Calcita	1077		IXM235	Azul	Indigo	548	655	
		Carbón	1290	1578			Calcita	1077		
IXM105	Azul	Indigo	546	660	1312	IXM236	Azul	Indigo	547	657
		Yeso	1569		Yeso			999		
IXM106	Rojo	Yeso	1011		IXM237	Azul	Indigo	547	657	
		Calcita	704	1078			Yeso	1571	1312	
IXM107	Amarillo	Calcita	1077		IXM238	Amarillo	Calcita	1074		
		Carbón	1313	1577			Yeso	1005		
IXM108	Amarillo	Yeso	110		IXM239	Amarillo	Calcita	272	701	
		Calcita	1077				Carbón	1285	1526	
IXM109	Amarillo	Carbón	1570		IXM240	Blanco	Calcita	270	700	
		Aceite	1255	1354			Yeso	1005	1076	
IXM110	Naranja	Minio	383	537	IXM241	Rojo	Carbón	1298	1559	
		Calcita	1076				Carbón	1297	1557	
IXM111	Azul	Carbón	1298	1519	IXM242	Negro	Calcita	1075		
		Yeso	1076				Calcita	274	702	
IXM112	Rojo	Indigo	548	667	1314	IXM243	Blanco	Calcita	274	702
		Yeso	1571		Yeso			999	1076	
IXM113	Azul	Calcita	1077		IXM244	Blanco	Calcita	272	699	
		Carbón	1078	1553			Calcita	1076		
IXM114	Azul	Aceite	1255	1360	IXM245	Blanco	Calcita	1076		
		Indigo	549	666			Yeso	999		
IXM115	Negro	Carbón	1301	1567	IXM246	Negro	Carbón	1317	1566	
		Calcita	1076				Calcita	1073		
IXM116	Blanco	Calcita	1077		IXM247	Ocre	Calcita	273	703	
		Yeso	1571				Carbón	1316	1569	
IXM117	Negro	Carbón	1317	1572	IXM248	Ocre	Desconocido	1428		
		Calcita	1079				IXM249	Rojo	Calcita	1076
IXM118	Negro	Indigo	548	665	1315	IXM250			Azul	Indigo
		Yeso	1571		Calcita		1074			
IXM119	Rojo	Calcita	1078		IXM251	Azul	Indigo	545	666	
		Yeso	1012	1140			Calcita	1313	1570	
IXM120	Azul	Aceite	1253	1356	IXM252	Blanco	Calcita	1077		
		Carbón	1301	1567			Yeso	1014	1138	
IXM121	Blanco	Calcita	1076		IXM253	Negro	Carbón	273	703	
		Yeso	1007	1078			Yeso	1003	1077	
IXM122	Azul	Aceite	1224	1309	IXM254	Naranja	Calcita	1313	1577	
		Carbón	1574				Carbón	1077		
IXM123	Azul	Calcita	1078		IXM255	Naranja	Calcita	1005		
		Yeso	1571				Carbón	1543		
IXM124	Negro	Carbón	1317	1572	IXM256	Azul	Minio	383	539	
		Calcita	1078				Calcita	274	704	
IXM125	Blanco	Carbón	1311	1555	IXM301	Blanco	Calcita	1001		
		Yeso	1004				Carbón	1074	1540	
IXM126	Rojo	Oxidos de hierro	383	537	IXM302	Negro	Calcita	1075		
		Calcita	1075				Indigo	548	1309	
IXM127	Blanco	Carbón	1285	1544	IXM303	Azul	Indigo	546	658	
		Calcita	703	1077			Calcita	1567	1308	
IXM128	Blanco	Yeso	1009		IXM303S	Azul	Indigo	547	658	
		Calcita	1078				Calcita	1074		
IXM129	Blanco	Carbón	1300	1567	IXM304	Negro	Carbón	1314	1569	
		Yeso	1000				Calcita	1077		
IXM130	Azul	Calcita	702	1078	IXM304S	Negro	Yeso	1000		
		Indigo	544	659			1308	Carbón	1315	1574
IXM131	Azul	Yeso	110		IXM305	Rojo	Calcita	703	1076	
		Calcita	702	1077			Yeso	1000		
IXM132	Negro	Indigo	546	662	1312	IXM305S	Rojo	Minio	381	538
		Yeso	1570		Yeso			1007		
IXM133	Naranja	Carbón	1293	1541	IXM306	Rojo	Calcita	1076		
		Yeso	1007				Carbón	1299	1555	
IXM134	Azul	Calcita	703	1078	IXM306S	Rojo	Minio	298	382	
		Carbón	1311	1555			Yeso	1007		
IXM135	Azul	Yeso	1007		IXM307	Gris	Calcita	1314	1569	
		Calcita	702	1078			Yeso	1000		
IXM136	Azul	Oxidos de hierro	383	537	IXM308	Azul	Carbón	1317	1552	
		Calcita	1075				Calcita	1073		
IXM137	Blanco	Carbón	1285	1544	IXM308S	Azul	Indigo	1301	1562	
		Calcita	703	1077			Calcita	702	1076	
IXM138	Blanco	Yeso	1009		IXM309	Verde	Yeso	1006		
		Calcita	1078				IXM310	Blanco	Yeso	1006
IXM139	Azul	Carbón	1300	1567	IXM310	Blanco			Yeso	1006
		Yeso	1000							
IXM140	Azul	Calcita	702	1078						
		Indigo	544	659	1309					
IXM141	Azul	Yeso	110							
		Calcita	702	1077						
IXM142	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM143	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM144	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM145	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM146	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM147	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM148	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM149	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM150	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM151	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM152	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM153	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM154	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM155	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM156	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM157	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM158	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM159	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM160	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM161	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM162	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM163	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM164	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM165	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM166	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM167	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM168	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM169	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM170	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM171	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM172	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM173	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM174	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM175	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM176	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM177	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM178	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM179	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							
IXM180	Azul	Indigo	546	660	1312					
		Yeso	1569							

Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )			Punto	Color	Asignación	Bandas (cm <sup>-1</sup> )				
IXM136	Azul	Indigo	548	660	749	IXM311	Rojo	Calcita	1076				
		Yeso	1313	1569				Carbón	1294	1539			
		Calcita	1003					Yeso	1005				
IXM137	Azul	Calcita	1077			IXM312	Rojo	Calcita	1075				
		Carbón	1302	1568				Carbón	1275	1539			
IXM138	Blanco	Calcita	1077			IXM313	Negro	Calcita	701	1075			
		Carbón	1537					Carbón	1298	1552			
IXM140	Blanco	Yeso	1008			IXM314	Gris	Calcita	1309	1546			
		Calcita	1076					IXM315	Gris	Calcita	1074		
		Carbón	1296	1532									
IXM141	Azul	Indigo	547	659	1567	IXM316	Rojo	Óxidos de hierro	283	398	601		
		Calcita	1077					Yeso	1000				
		Aceite	1256	1354				Calcita	1076				
IXM142	Azul				IXM317	Rojo	Óxidos de hierro	279	396	600			
IXM143	Naranja	Minio	386	538		IXM319	Rojo	Óxidos de hierro	277	399			
		Yeso	1006					Yeso	1000				
		Calcita	1077					Calcita	1077				
		Carbón	1568					IXM320	Gris	Carbón	1295	1538	
		Aceite	1254	1354						Calcita	1077		
IXM144	Naranja	Minio	381	538		IXM321	Gris	Yeso	1007				
		Cochinilla	1219	1308	1590			IXM322	Gris	Carbón	1294	1555	
		Yeso	1007							Calcita	1075		
		Calcita	1077							Yeso	1005		
		Aceite	1256	1356				IXM323	Rojo	Carbón	1298	1549	
				Calcita	1077								
IXM145	Cera				Yeso	1007							
IXM146	Naranja	Minio	375	534		IXM324	Rojo	Óxidos de hierro	278	396			
		Calcita	1077					Calcita	1077				
IXM147	Negro				IXM324	Rojo	Óxidos de hierro	398					
IXM148	Amarillo	Cochinilla	448	1221			1307	Calcita	699	1077			
		Yeso	1006				Yeso	1001					
		Calcita	276	703			1077						
IXM149	Amarillo	Calcita	1078										
		Desconocido	1427										
IXM150	Azul	Indigo	544	660	1311								
			1568										
		Calcita	1076										

## 7 REFERENCIAS

- 
- [1] M. Mantler, M. Schreiner, *X-Ray Spectrom.* **2000**; 29, 3.
- [2] J.C Dran, J. Salomon, T. Calligaro, P. Walter, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2004**; 219, 7.
- [3] B. Blümich, F. Casanova, J. Perlo, F. Presciutti, C. Anselmi, B. Doherty, *Acc. Chem. Res.* **2010**; 43, 761.
- [4] S. Zetina, J.L. Ruvalcaba, T. Falcón, E. Hernández, C. González, E. Arroyo, *Painting Syncretism: a Non Destructive Analysis of the Badiano Codex*. 9<sup>th</sup> International Conference on NDT of Art, ART2008 Jerusalem, Israel.  
<http://www.ndt.net/search/docs.php3?MainSource=65>
- [5] E. Arroyo, T. Falcón, E. Hernández, S. Zetina, A. Nieto, J.L. Ruvalcaba, *XVI Century Colonial Panel Paintings from New Spain: Material Reference Standards and Non Destructive Analysis for Mexican Retablos*. 9<sup>th</sup> International Conference on NDT of Art, ART2008 Jerusalem, Israel.  
<http://www.ndt.net/search/docs.php3?MainSource=65>
- [6] S. Zetina, J.L. Ruvalcaba, M. López Cáceres, T. Falcón, E. Hernández, C. González, E. Arroyo, *Non destructive in situ study of Mexican codices: methodology and first results of materials analysis for the Colombino and Azoyu codices*. Proceedings of the 37th International Symposium on Archaeometry, 13th - 16th May 2008, Siena, Italy. I. Turbanti-Memmi ed., Springer, XLV, **2011**, 349-354.
- [7] S. Zetina, E. Arroyo, T. Falcón, E. Hernández, J.L. Ruvalcaba, M. E. Espinosa, V. Aguilar, D. Ramirez, V. Santos, F. Riquelme, *The Mobility of*

- Imitation: An Analysis of 18th Century Chinese Style Furniture with IR-UV Imaging, Portable XRF and SEM*, 2nd Latin-American Symposium on Physical and Chemical Methods in Archaeology, Art and Cultural Heritage Conservation (LASMAC 2009). Selected Papers. J.L. Ruvalcaba Sil, J. Reyes, J.A. Arenas, A. Velázquez, eds. Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma de Campeche, Instituto Nacional de Antropología e Historia, México, **2010**, pp. 15-23.
- [8] E. Rosenberg, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**; 391, 33.
- [9] E. de Rijke, P. Out, W.M.A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr., A* **2006**; 1112, 31.
- [10] X. Zhang, R. Boytner, J.L. Cabrera, R. Laursen, *Anal. Chem.* **2007**; 79, 1575.
- [11] S.P. Best, R.J.H. Clark, R. Withnall, *Endeavour* **1992**; 16, 66.
- [12] R.J.H. Clark, *J. Mol. Struct.* **1995**; 347, 417.
- [13] A. Adriaens, *Spectrochim. Acta, Part B* **2005**; 60, 1503.
- [14] I.M. Bell, R.J.H. Clark, P.J. Gibbs, *Spectrochim. Acta, Part A* **1997**; 53, 2159.
- [15] R.J.H. Clark, *J. Mol. Struct.* **2007**; 834, 74.
- [16] P. Vandenabeele, S. Bodé, A. Alonso, L. Moens, *Spectrochim. Acta, Part A* **2005**; 61, 2349.
- [17] V. Aguilar-Melo, J.L. Ruvalcaba-Sil, O. Escamilla-Gonzalez, L. Milan, D. Ramírez-Miranda, Ma.C. León-García, *Non-destructive Analysis of Handwriting and Colored Drawings of the Printed Book Divina Proportione (1509)*. 2<sup>nd</sup> Latin-American Symposium on Physical and Chemical Methods in Archaeology, Art and Cultural Heritage Conservation (LASMAC 2009). Selected Papers. J.L. Ruvalcaba Sil, J. Reyes Trujeque, J.A. Arenas Alatorre, A. Velázquez Castro, eds., Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma de Campeche, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Mexico, **2010**, pp. 86-92.
- [18] J.L. Ruvalcaba Sil, M. Grediaga, C. González-Tirado, E. Hernández-Vázquez, V. Aguilar-Melo, D. Ramírez-Miranda, M. Espinosa-Pesqueira, *Non-Destructive Study of the Independence Act of the Mexican Empire of 1821*. Materials Issues in Art and Archaeology IX. P. Vandiver, W. Li, J.L. Ruvalcaba-Sil, Ch. Reedy, L. Frame eds., Materials Research Society Vol 1319, Cambridge University Press, Nueva York, **2011**, pp. 249-264
- [19] J.L. Ruvalcaba-Sil, L. Filloy, M. Vaggi, L.H. Tapia-Gálvez, R. Sánchez-Becerra, *Estudio no destructivo in situ de la Máscara de Malinaltepec en La Máscara de Malinaltepec*, S. Martínez del Campo coord., CONACULTA-INAH, México, **2010**, pp. 153-168.
- [20] M. Moskovits, *J. Raman Spectrosc.* **2005**; 36, 485.
- [21] F. Rosi, M. Paolantoni, C. Clementi, B. Doherty, C. Miliani, B.G. Brunetti, A. Sgamellotti, *J. Raman Spectrosc.* **2010**; 41, 452.

- [22] S.E.J. Bell, *Case Study: Chinese Scrolls and other Fluorescent Samples*, chapter 18 in *Raman Spectroscopy in Archaeology and Art History*, edited by H.G.M Edwards y J.M. Chalmers, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2005**
- [23] M. Fleishmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**; 26, 163.
- [24] K. Chen, M. Leona, K.C. Vo-Dinh, F. Yan, M.B. Wabuleye, T. Vo-Dinh, *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37, 520.
- [25] M. Leona, *Proc. SPIE* **2005**; 5993, 127.
- [26] M. Leona, J. Stenger, E. Ferloni, *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37, 981.
- [27] A.V. Whitney, R.P. Van Duyne, F. Casadio, *Proc. SPIE* **2005**; 5993, 117.
- [28] A.V. Whitney, R.P. Van Duyne, F. Casadio, *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37, 993.
- [29] K. Chen, M. Leona, T. Vo-Dinh, *Sens. Rev.* **2007**; 27, 109.
- [30] J.F. Li, Y.F. Huang, Y. Ding, Z.L. Yang, S.B. Li, X.S. Zhou, F.R. Fan, W. Zhang, Z.Y. Zhou, D.Y. Wu, B. Ren, Z.L. Wang, Z.Q. Tian, *Nature*, **2010**, 64, 392.
- [31] B. Guineau, V. Guichard; *ICOM Committee for Conservation: 8<sup>th</sup> Triennial Meeting, vol 2*. The Getty Conservation Institute, Sidney, Marina del Rey, CA, **1987**, 659, pp. 6-11
- [32] B.H. Berrie, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**; 106, 15095.
- [33] M. Leona, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**; 106, 14757.
- [34] N. Peica, W. Kiefer, *J. Raman Spectrosc.* **2008**; 39, 47.
- [35] C.L. Brousseau, A. Gambardella, F. Casadio, C.M. Grzywacz, J. Wouters, R.P. Van Duyne, *Anal. Chem.* **2009**; 81, 3056.
- [36] M.V. Cañamares, M. Leona, M. Bouchard, C.M. Grzywacz, J. Wouters, K. Trentelman, *J. Raman Spectrosc.* **2009**; 41, 391.
- [37] S.A. Centeno, J. Shamir, *J. Mol. Struct.* **2008**; 873, 149.
- [38] C.L. Brousseau, K.S. Rayner, F. Casadio, C.M. Grzywacz, R.P. Van Duyne, *Anal. Chem.* **2009**; 81, 7443.
- [39] K.L. Wustholz, C.L. Brousseau, F. Casadio, R.P. Van Duyne, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**; 11, 7350.
- [40] S. Bruni, V. Guglielmi, F. Pozzi; *J. Raman Spectrosc.* **2010**; 41, 175.
- [41] Z. Jurasekova, E. del Puerto, G. Bruno, J.V. García-Ramos, S. Sanchez-Cortes, C. Domingo, *J. Raman Spectrosc.* **2010**; 41, 1165
- [42] . Geiman, M. Leona, J.R., Lombardi, *J. Forensic Sci.* **2009**; 54, 947.
- [43] L.F.C. de Oliveira, S.O. Dantas, E.S. Velozo, P.S. Santos, M.C.C. Ribeiro, *J. Mol. Struct.* **1997**; 435, 101.
- [44] P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **1982**; 86, 3391.

- [45] P. Vandenabeele, K. Castro, M. Hargreaves, L. Moens, J.M. Madariaga, H.G.M. Edwards, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 588, 108.
- [46] L. Bellot-Gurlet, S. Pagès-Camagna, C. Coupry, *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37, 962.
- [47] C.V. Raman, K.S. Krishnan, *Indian J. Phys.* **1928**; 2, 387.
- [48] G. Landsberg, L. Mandelstam, *Naturwissenschaften*, **1928**; 16, 557.
- [49] R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, **2006**
- [50] L.G. Thygesen, M.M. Løkkey, E. Micklander, S.B. Engelsen, *Trends Food Sci. Technol.* **2003**; 14, 50.
- [51] D. Graham, R. Goodacre, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 883
- [52] C. Douketis, T.L. Hasslet, Z. Wang, M. Moskovits, S. Iannota, *J. Chem. Phys.* **2000**; 113, 11315.
- [53] M. Moskovits, D.H. Jeong, *Chem. Phys. Lett.* **2004**; 397, 91.
- [54] D.L. Stokes, Z.H. Chi, T. Vo-Dinh, *App. Spectr.* **2004**; 58, 292.
- [55] D.L. Stokes, T. Vo-Dinh, *Sens. Actuators, B* **2000**; 69, 28.
- [56] S.J. Jia, S.P. Xu, X.L. Zheng, B. Zhao, W.Q. Xu, *Chemical Journal of Chinese Universities* **2006**; 27, 523.
- [57] E. Polwart, R.L. Keir, C.M. Davidson, W.E. Smith, D.A. Sadler, *Appl. Spectrosc.* **2000**; 52, 522.
- [58] K. Cottingham, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7128.
- [59] L. Rivas, S. Sánchez-Cortés, J.V. García-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir* **2001**; 17, 574
- [60] Z. Wang, S. Pan, T.D. Krauss, H. Du, L.J. Rothberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**; 100, 8638.
- [61] N. Leopold, B. Lendl, *J. Phys. Chem. B.* **2003**; 107, 5723.
- [62] R.F. Aroca, R.A. Alvarez-Puebla, N. Pieczonka, S. Sanchez-Cortez, J.V. Garcia-Ramos, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2005**; 116, 45.
- [63] C.J. Murphy, T.K. Sau, A.M. Cole, C.J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S.E. Hunyadi, T. Li, *J. Phys. Chem. B* **2005**; 109, 13857.
- [64] K. Chen, K.C. Vo-Dinh, F. Yan, M.B. Wabuyele, T. Vo-Dinh, *Anal. Chim. Acta* **2006**; 569, 234.
- [65] S. Sánchez-Cortés, L. Guerrini, J.V. García-Ramos, C. Domingo, *J. Phys. Chem. B* **2007**; 111, 8149.
- [66] H. Jia, J. Zeng, W. Song, J. An, B. Zhao, *Thin Solid Films* **2006**; 496, 281.
- [67] M. Maillard, P. Huang, L. Brus, *Nano Lett.* **2003**; 3, 1611.
- [68] M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, J. D. Gómez-Varga, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Langmuir* **2007**; 23, 5210.
- [69] X. Zhang, R. A. Laursen, *Anal. Chem.* **2005**; 77, 2022.
- [70] M. Leona, *US Pat. No. 7 362 431 B2* **2008**

- [71] J. Sanyovaa, J. Reisse, *J. Cult. Herit.* **2006**; 7, 229.
- [72] Gregory D. Smith, Lucia Burgio, Steven Firth, Robin J. H. Clark, *Anal. Chim. Acta* **2001**; 440, 185.
- [73] A. De Santis, E. Mattei, C. Pelosi, *J. Raman Spectrosc.* **2007**; 38, 1368.
- [74] Erik J. Bjerneld, Fredrik Svedberg, Patrik Johansson, Mikael Käll, *J. Phys. Chem. A* **2004**; 108, 4187.
- [75] K.S.K. Varadwaja, M.K. Panigrahi, J. Ghose, *J. Solid State Chem.* **2004**; 177, 4286.
- [76] D. Ghosha, G.S. Samala, A.K. Biswasa, Y.N. Mohapatra, *Thin Solid Films* **2005**; 477, 162.
- [77] C. Andalò, M. Bicchieri, P. Bocchini, G. Casu, G.C. Galletti, P.A. Mandò, M. Nardone, A. Soda, M.P. Zappalà *Anal. Chim. Acta* **2001**; 429, 279.
- [78] P. del Carmine, F. Lucarelli, P.A. Mandò, A. Pechioli, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **1993**; 75, 480.
- [79] P.A. Mandò, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **1994**; 85, 815.
- [80] M. Sánchez del Río, M. Picquart, E. Haro-Poniatowski, E. van Elslande, V.H. Uc, *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37, 1046.
- [81] M. Sánchez del Río, E. Boccaleri, M. Milanesio, G. Croce, W. van Beek, C. Tsiantos, G.D. Chyssikos, V. Gionis, G.H. Kacandes, M. Suárez-Barrios, E. García-Romero, *J. Mater. Sci.* **2009**; 44, 5524.
- [82] M. Sánchez del Río, P. Martinetto, C. Solís, C. Reyes-Valerio, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2006**; 249, 628.
- [83] M. José-Yacamán, L. Rendón, J. Arenas, M.C. Serra-Puche, *Science* **1996**; 273, 223.
- [84] M.E. Haude, *J. Am. Inst. Conserv.* **1998**; 37, 240.
- [85] F. Hernandez, *Historia de las plantas de la Nueva España*, Imprenta Universitaria, México, **1943**
- [86] M. Martínez, *Plantas útiles de la flora mexicana*, Ediciones Botas, México, **1959**
- [87] D. Cardon, *Natural dyes. Sources, tradition, technology and science*, Archetype Publications, **2007**
- [88] A. Wallert, *Materials Issues in Art and Archaeology, IV*, Mat. Res. Soc. Symp. Proc., 352, **1995**
- [89] B. Sahagun, *Historia general de las cosas de la Nueva España*, Ediciones Porrúa, Mexico, **1992**
- [90] K.L Euler, M. Alam, *J. Nat. Prod.* **1982**; 45, 220.
- [91] X.A. Domíniguez, H. Achenbach, C. Gonzalez Ch., A.R. Ferré-D'Amare, *Rev. Latinoam. Quim.* **1990**; 21, 142.
- [92] R.H.F. Manske, *Can. J. Res., Sect. B* **1943**; 21, 140.

- [93] D.R.A. Watson, *The Book and Paper Group Annual*, Ed. The American Institute for Conservation, Washington DC, **2005**, pp. 137.
- [94] L.F.C. de Oliveira, H.G.M. Edwards, E.S. Velozoc, M. Nesbitt, *Vib. Spectrosc.* **2002**, 28, 243.
- [95] J. Cuadriello, E. Arroyo, S. Zetina, T. Falcón, E. Hernández, J.L. Ruvalcaba, M. Espinosa, *Ojos, alas y patas de la mosca: Visualidad, tecnología y materialidad de El martirio de san Ponciano, de Baltasar Echave Orio*, en proceso de publicación en *Anales del Instituto de Investigaciones Estéticas*
- [96] I. Godoy, *Baltazar de Echave Orio en la pintura novohispana*.  
<http://www.ilianagodoy.com/echave.pdf>
- [97] M. Toussaint, *Pintura colonial en México*, Universidad Nacional Autónoma de México, **1990**
- [98] E.I. Estrada de Gerlero, *Los temas escatológicos em La pintura mural novohispana Del siglo XVI, Traza y Baza*, Cuadernos hispánicos de simbología, arte y literatura, **1979**, 7.
- [99] X. Wu, P.L. Redmond, H. Lu, Y. Chen, M. Steigerwald, L. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**; 130, 9500.
- [100] I. Ojea-Jimenez, F.M. Romero, N.G. Bastús, V. Puentes, *J. Phys. Chem. C.* **2010**; 114, 1800.
- [101] T.H. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**; 61, 694.
- [102] V. Soni, R.N. Mehrotra, *Transition Met. Chem. (Dordrecht, Neth.)* **2003**; 28, 893.
- [103] L.P. Hurlburt, *Art J.* **1976**; 35, 237.
- [104] J. Crook, T. Learner, *The Impact of Modern Paints*, Nueva York, Watson-Guption ed., Tate Gallery, **2000**, pp. 15-17.
- [105] Instruction Manual, Inspector Raman 1.5, DeltaNu, Laramie, WY, USA, **2008**
- [106] H.G. Silva Pereira, *Estudio de los mecanismos de deformación de nanopartículas de oro embebidas en sílice, producida por irradiación de iones*, Tesis de doctorado, UNAM, **2011**
- [107] M.V. Cañamares, J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *Vib. Spectrosc.* **2006**; 40, 161.
- [108] G. Favaro, C. Miliani, A. Romani, M. Vagnini, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**; 192.
- [109] R.T. Morrison, R.T. Boyd, *Química Orgánica*, Addison Wesley, Prentice Hall, Pearson Educación, pp. 897, **1998**
- [110] A. Andrade-Cetto, M. Heinrich, *J. Ethnopharmacol.* **2005**; 99, 325.
- [111] L.M.A. Pavón-García, C. Pérez-Alonso, J. Orozco-Villafuerte, D.J. Pimentel-González, M.E. Rodríguez-Huezo, E.J. Vernon-Carter, *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**; 46, 1428.
- [112] J.C. Merlin, A. Statoua, R. Brouillard, *Phytochemistry (Elsevier)* **1985**; 24, 1575.

- [113] J.C. Merlin, A. Statoua, J.P. Cornard, M. Saidi-Idrissi, R. Brouillard, *Phytochemistry (Elsevier)* **1994**; 35, 227.
- [114] Z. Jurasekova, J.V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, *J. Raman Spectrosc.* **2006**; 37, 1239.
- [115] M. Żuk, L. Dymińska, A. Kulma, A. Boba, A. Prescha, J. Szopa, M. Mączka, A. Zajac, K. Szołtysek, J. Hanuzab, *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**; 78, 1080.
- [116] Z. Jurasekova, A. Torreggiani, M. Tamba, S. Sanchez-Cortes, J.V. Garcia-Ramos, *J. Mol. Struct.* **2009**; 918, 129.
- [117] J. P. Abid, A. W. Wark, P. F. Brevet, H. H. Girault *Chem. Comm.* **2002**, 7, 792.
- [118] A. C. Ferrari, J. Robertson; *Phys. Rev. B* **2000**; 61, 14095.
- [119] P. Vandenabeele, M. Ortega-Avilés, D.T. Castilleros, L. Moens, *Spectrochimica Acta Part A* **2007**; 68, 1085.
- [120] B. Doherty, B. G. Brunetti, A. Sgamellotti, C. Miliani, , *J. Raman Spectrosc.* **2011**; 42, 1932.