

UCH-Fc  
DOC-Q  
A282  
C.1



**COLORANTES EN TEXTILES  
ARQUEOLÓGICOS E HISTÓRICOS.  
UNA APROXIMACIÓN ESPECTROSCÓPICA  
VIBRACIONAL**

**Tesis**

**Entregada a la Universidad de Chile**

**Para optar al grado de**

**Doctor en Química**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**Tomás Elías Aguayo Alvarado**

**Diciembre, 2017**

**Director de Tesis:**

**Prof. Dr. Marcelo Mariano Campos Vallette**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**TOMÁS ELÍAS AGUAYO ALVARADO**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 16 de noviembre de 2017.

Director de Tesis:

Dr. Marcelo Campos Vallette

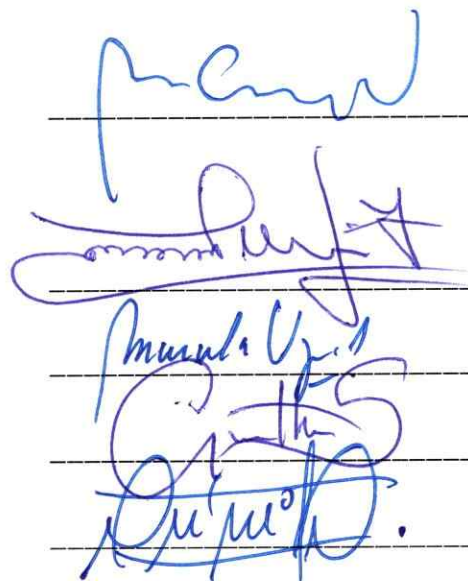
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Antonio Zanocco (presidente)

Dra. Marcela Urzúa

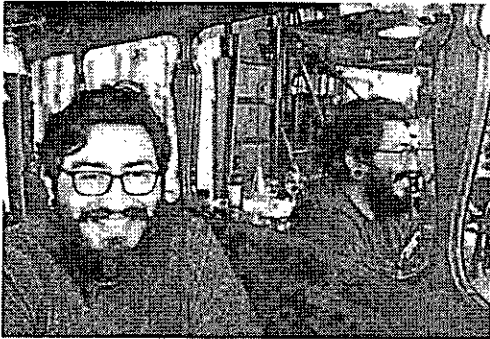
Dr. Germán Gunther

Dr. Patricio Leyton



a Noemí, por mucho, lo mejor  
que me ha pasado en la vida

## Resumen biográfico



Tomás es licenciado en ciencias con mención en Química de la Universidad de Chile y Químico del Laboratorio de Análisis del Centro Nacional de Conservación y Restauración. Ha desarrollado su carrera principalmente en la aplicación de técnicas espectroscópicas en el estudio material de objetos patrimoniales y sus procesos de deterioro. Ha participado de numerosos eventos de difusión, publicaciones y proyectos en los que se promueve la aproximación Arqueométrica en el estudio del patrimonio cultural.



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia: Noemí, Angélica, Elías y David, su apoyo ha sido fundamental para que este trabajo llegara a buen puerto y su paciencia inagotable han hecho de mí una mejor persona a través de los años.

Quiero agradecer también al Dr. Marcelo Campos por la oportunidad de haber pertenecido a su grupo de investigación, por haber visto potencial en mí y por todas las enseñanzas que me ha entregado en mi paso por el Laboratorio de Espectroscopia Vibracional. Sin su confianza, la carrera que he hecho al día de hoy sin duda no existiría.

Quiero agradecer también a la Dra. Dalva Lúcia Araujo de Faria (USP), su ejemplo, su sabiduría y su amistad han sido una pieza fundamental en mi formación académica y personal. El haberme recibido tantas veces en su laboratorio y su ayuda en el trabajo de esta tesis me han permitido sacar adelante algo que en alguno minuto parecía perdido.

Quiero agradecer al Dr. Ludovic Bellot-Gurlet (UPMC) y la Dra Maite Maguregui (UPV) por haberme recibido en sus laboratorios y haber compartido conmigo su valioso tiempo y experiencia. A la Dra. Marcela Sepulveda (UTA) por su amistad, constante apoyo y entusiasmo en mi formación académica.

Quiero agradecer a los grandes amigos que hice en París, Elisabetta Stanzani, Marine Wojcieszak, Settakorn Upasen y Héctor Morillas, por todo lo

que compartieron conmigo y por todo lo que me enseñaron tanto en lo académico como de la vida. Quiero agradecer a mis compañeros de "laboratorios", especialmente a Álvaro Aliaga (U de Chile), Eduardo Carrasco (U de Chile), Fernanda Espinosa (CNCR), Nathália D'Elboux Bernardino (OSU) y Thiago Sevilhano Puglieri (UFPEL) por haber estado ahí todos estos años compartiendo altos y bajos, aunque más bajos que altos; y a mi gran amigo Aharón Valdés por estar ahí siempre, a pesar de todo.

Finalmente, quiero agradecer a las instituciones que han financiado y que han apoyado mi formación: la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT), la Embajada de Francia en Chile y muy especialmente al Centro Nacional de Conservación y Restauración (CNCR).

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE MATERIAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Textiles.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. Colorantes naturales.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Teñido .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Espectroscopía vibracional.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5. Caracterización de textiles coloreados y uso de técnicas vibracionales aplicadas al estudio del patrimonio cultural.....</b>	<b>28</b>
<b>2.6. Hipótesis.....</b>	<b>34</b>
<b>2.7. Objetivos.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7.1. Objetivos generales .....</b>	<b>35</b>
<b>2.7.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>35</b>
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Reactivos y muestras.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2. Preparación de superficies.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3. Medidas UV-Visible .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4. Medidas FTIR.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5. Medidas Raman y SERS .....</b>	<b>38</b>
<b>3.6. Preparación de complejos.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7. Preparación de las muestras de seda.....</b>	<b>39</b>
<b>3.7.1. Desgomado.....</b>	<b>39</b>

3.7.2.	Pesado.....	40
3.7.3.	Teñido.....	41
3.8.	<b>Extracción de colorantes</b> .....	<b>42</b>
3.9.	<b>Espectrometría de Masas por MALDI/LDI-ToF</b> .....	<b>42</b>
3.10.	<b>Microscopía electrónica de barrido</b> .....	<b>43</b>
3.11.	<b>Espectroscopía de microfluorescencia de rayos X (<math>\mu</math>-XRF)</b> .....	<b>43</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>44</b>
4.1.	<b>Superficies activas en SERS</b> .....	<b>44</b>
4.1.1.	Superficies de cobre .....	44
4.1.2.	Superficie de oro.....	46
4.1.3.	Superficies coloidales .....	48
4.2.	<b>Fibras</b> .....	<b>51</b>
4.2.1.	Espectros Raman, FT-Raman y SERS del péptido motivo GAGAGS.....	53
4.2.2.	Espectros ATR-IR, Raman, FT-Raman y SERS de la seda .....	58
4.2.3.	Caracterización estructural de la seda pesada.....	65
4.3.	<b>Colorantes</b> .....	<b>69</b>
4.3.1.	UV-Vis.....	69
4.3.2.	ATR-IR y Raman.....	70
4.3.3.	SERS colorantes.....	75
4.4.	<b>Complejos metálicos de colorantes</b> .....	<b>86</b>
4.4.1.	ATR .....	86
4.4.2.	Raman .....	88
4.4.3.	MALDI/LDI-ToF-MS .....	91
4.5.	<b>Textiles</b> .....	<b>96</b>
4.5.1.	Muestras de seda teñida con RB5 .....	96
4.5.2.	Sedas históricas.....	98
4.5.3.	Muestras de seda teñidas con Az. ....	106
4.5.4.	Textiles arqueológicos .....	111
4.5.5.	SERS de extractos acuosos de materiales colorantes .....	120
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>122</b>
<b>6.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>126</b>

<b>7. Anexos .....</b>	<b>133</b>
<b>7.1. Anexo 1. Artículos publicados en el periodo de tesis. ....</b>	<b>133</b>
<b>7.2. Anexo 2. Participaciones en congresos durante el periodo de tesis ..</b>	<b>134</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Asignación espectral Raman y SERS del péptido GAGAGS y FTIR, Raman y SERS de la seda entre 200 y 1800 $\text{cm}^{-1}$ a temperatura ambiente. ....	56
<b>Tabla 2.</b> Asignación espectral FT-IR, Raman y SERS de los colorantes alizarina (Az) y purpurina (Pu) entre 300 y 1800 $\text{cm}^{-1}$ . ....	73
<b>Tabla 3.</b> Asignación espectral FT-IR, Raman y SERS del Ácido Carmínico. ....	75
<b>Tabla 4.</b> Asignación espectral Raman y SERS del colorante Negro Reactivo 5 (RB5). ....	85
<b>Tabla 5.</b> Códigos y descripción para las sedas históricas. ....	99
<b>Tabla 6.</b> Resumen de los resultados semicuantitativos obtenidos por SEM-EDS para las muestras de sedas históricas. ....	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Niveles de estructura en la composición de un textil.....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema de un tejido tafetán simple (1:1). .....	8
<b>Figura 3.</b> Unidad de celobiosa (4-O-β-D-glucopiranosil-D-glucosa), monómero de la celulosa... 9	
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la seda del gusano Bombyx mori.....	11
<b>Figura 5.</b> Estructuras base de algunos de los colorantes naturales más abundantes. ....	13
<b>Figura 6.</b> Estructuras de algunos colorantes derivados de quinonas (antraquinonas y naftoquinonas). En las estructuras R <sub>n</sub> = H a menos que se indique otro sustituyente.....	15
<b>Figura 7.</b> Síntesis y estructura de algunos indigoídes. ....	16
<b>Figura 8.</b> Esquema con las configuraciones más habituales del ERI con respecto a la muestra. En la primera a) el ERI es presionado contra la muestra desde la parte superior y en la segunda b) la muestra es presionada contra el ERI.....	22
<b>Figura 9.</b> Diagrama de energía de estados vibracionales involucrados en la dispersión Raman y la absorción IR. ....	24
<b>Figura 10.</b> Representación del fenómeno de amplificación de la señal Raman por efecto de la superficie metálica. ....	26
<b>Figura 11.</b> Muestra de 2 mg de lana teñida. ....	31
<b>Figura 12.</b> Microfotografía de la superficie de cobre tratada con ácido nítrico y recubierta con una solución de nitrato de plata 1 mM (izquierda) y 17 mM (derecha). ....	45
<b>Figura 13.</b> Espectros SERS del ácido camínico (CA) (izquierda) y de alizarina (Az) y purpurina (Pu) (derecha) sobre una superficie de cobre tratada con ácido nítrico. En la figura de la izquierda se muestra la diferencia en intensidad al añadir una solución de nitrato de plata (negro) y sin adición de plata (rojo). ....	46
<b>Figura 14.</b> A) Superficie klarite con Az a pH 8,2 y B) a pH 10,7; C) comparación de los mejores espectros obtenidos mapeando las superficies de A y B en las siguientes condiciones: a) SERS Az-Ag 458 nm pH 8,2; b) SERS Az-Klarite 458 nm pH 8,2; c) SERS Az-Klarite 458 nm pH 10,7; d) SERS Az-Klarite 785 nm pH 8,2 y e) SERS Az-Klarite 785 nm pH 10,7. ....	47
<b>Figura 15.</b> Espectros de absorción para distintos sistemas coloidales de plata, reducida citrato (a), hidroxilamina (b) e hidroxilamina en menor concentración (c).....	49

<b>Figura 16.</b> Espectro ATR-IR de una muestra de fibra arqueológica azul del sitio Taira A-16. Las bandas marcadas en azul corresponden a las señales características de índigo. ....	52
<b>Figura 17.</b> Espectros ATR-IR de fibras de seda (rojo) y guanaco (azul) sobre ERI de Ge. ....	53
<b>Figura 18.</b> Espectro Raman del péptido GAGAGS a baja temperatura (a) (12°C), a temperatura ambiente (25°C) (b) y espectro SERS del péptido GAGAGS.....	54
<b>Figura 19.</b> Péptido motivo de la porción cristalina de la seda (GAGAGS) y su orientación sobre una superficie de plata. ....	58
<b>Figura 20.</b> Espectros ATR-IR de seda cruda (a), y sedas desgomadas con los métodos 1 (b) y 2 (c) (ver punto 3.7) sobre un ERI de diamante.....	60
<b>Figura 21.</b> Espectros Raman de seda cruda (CS) en posición vertical (a) y horizontal (b) respecto de la observación al microscopio. Espectro Raman de las sedas desgomadas con el método 1 (DS1) (c) y con el método 2 (DS2) (d). ....	62
<b>Figura 22.</b> Espectro FT-Raman (a) y SERS (b) de la seda. ....	63
<b>Figura 23.</b> Espectros ATR-IR de seda sin pesar (UWS, a), seda con pesado rosado (PWS, b) y pesado con taninos (TWS1, c) y pesado doble con taninos (TWS2, d) sobre un elemento de reflexión interna (ERI) de Ge. ....	65
<b>Figura 24.</b> Espectros Raman (633 nm) de las muestras a) UWS, b) PWS, c) TWS1 and d) TWS2. ....	67
<b>Figura 25.</b> Espectro ATR de la seda antes (rojo) y después del proceso de mordentado (azul). ....	68
<b>Figura 26.</b> Espectros UV-Vis de los colorantes Az, Pu y CA. Izquierda: Comparación entre los sólidos y la solución para Az y Pu. Derecha: espectros UV-Vis en solución para Az, Pu y CA..	69
<b>Figura 27.</b> Espectro FT-Raman (azul) y ATR-IR (rojo) del colorante Alizarina (Az). ....	71
<b>Figura 28.</b> Espectro Raman (458 nm) (azul) y ATR-IR (rojo) del colorante Purpurina (Pu). ....	72
<b>Figura 29.</b> Espectro FT-Raman (1064 nm) (azul) y ATR-IR (rojo) del colorante Ácido Carmínico (CA). ....	74
<b>Figura 30.</b> Espectros SERS de Az sobre Ag-Cit obtenidos con distintas longitudes de onda de excitación láser. ....	77
<b>Figura 31.</b> Espectros SERS (458 nm) de Az sobre Ag-Cit a partir de una solución a pH 10,7..	78
<b>Figura 32.</b> Espectros SERS (785 nm) sobre Ag-Cit de Az (a), Pu (b) y CA (c). ....	81



<b>Figura 33.</b> Espectros Raman (a) y SERS (b) del colorante Negro Reactivo 5. ....	83
<b>Figura 34.</b> Espectros ATR-IR de los distintos complejos metálicos obtenidos para Az. ....	87
<b>Figura 35.</b> Espectros FT-Raman (1064 nm) de los complejos metálicos obtenidos para Az. ....	89
<b>Figura 36.</b> Espectros Raman (458 nm) de Pu y de su complejo de aluminio. ....	90
<b>Figura 37.</b> Espectros de masas obtenidos por MALDI-ToF-MS para los complejos de Al de Az y Pu con la matriz CMBT en modo ion negativo y positivo. ....	92
<b>Figura 38.</b> Espectros de masas obtenidos por MALDI-ToF-MS para los complejos de Al de Az y Pu con la matriz CHCA en modo ion negativo y positivo. ....	93
<b>Figura 39.</b> Espectros de masas obtenidos por LDI-ToF para Az y Pu en modo ion positivo y negativo. ....	94
<b>Figura 40.</b> Espectros de masas obtenidos por LDI-ToF para los complejos de aluminio de Az y Pu. ....	94
<b>Figura 41.</b> Espectro Raman (a) y SERS (b) de la muestra de seda teñida con el colorante RB5. ....	97
<b>Figura 42.</b> Objetos de la colección de textiles del MHN desde los que se extrajeron las muestras de sedas históricas a) HWS1, b) HWS2, c) HWS3, d) HDS1, e) HDS2 y f) HDS3 ....	99
<b>Figura 43.</b> Espectros ATR-IR de las muestras de seda histórica pesada a) HWS1, b) HWS2 y c) HWS3 sobre un ERI de diamante. ....	100
<b>Figura 44.</b> Espectros Raman de las muestras DS2 (a), HWS1 (b) y HWS2 (c). ....	102
<b>Figura 45.</b> Espectros ATR-IR de las muestras HDS1 (a), HDS2 (b) y HDS3 (c). ....	103
<b>Figura 46.</b> Espectro Raman de la trama (a) y de la urdimbre (b) de la muestra HDS1. ....	104
<b>Figura 47.</b> Espectro SERS de la muestra HDS3 (a) y Raman del colorante Negro de Sudan B (b). ....	105
<b>Figura 48.</b> (a) Imagen óptica de las muestras de seda desgomada (blancas, abajo) y de seda mordentada con alumbre y teñida con Az (rojas, arriba). (b) Imagen obtenida al graficar en rojo la intensidad de la señal $K_{\alpha}$ de Al. ....	107
<b>Figura 49.</b> Espectros SERS (785nm) de la Az, SERS de una seda teñida tratada con HCOOH, con HF y espectro Raman del complejo Al-Az. ....	109
<b>Figura 50.</b> Espectro SERS (785 nm) de una fibra de lana teñida con Galium hypocarpium. ....	110
<b>Figura 51.</b> Espectro SERS (514 nm) de una fibra de lana teñida con Galium hypocarpium. ....	111

<b>Figura 52.</b> Espectros ATR-IR de las muestras provenientes de las tumbas 30 del sitio Solor-3 (a), 20 del sitio Solcor-3 (b), 2532 (c) y 2432 (d) del sitio Quitor-6, y 3928 (e), 3926 (f) y 4091 (g) del sitio Coyo Oriente..... <sup>s</sup> .....	112
<b>Figura 53.</b> Espectros Raman de muestras azules provenientes de las tumbas 4091 (a) y 3928 (b) del sitio Coyo Oriente, de un patrón de índigo sintético (c), de la tumba 28 del sitio Solor-3 (d) y de la tumba 2457 del sitio Quitor-6 (e). .....	113
<b>Figura 54.</b> Espectros SERS de las muestras provenientes de las tumbas 28 (a) y 30 (b) del sitio Solor-3 y de las tumbas 3928 (c) y 4091 (d) del sitio Coyo Oriente. ....	114
<b>Figura 55.</b> A. Bolsa-faja cultura Arica. B. Espectros Raman de las muestras B01 (a), B02 (b), B03 (c), B04 (d) y B05 (e). .....	115
<b>Figura 56.</b> Espectros ATR-IR de las muestras B01 (a), B02 (b), B03 (c), B04 (d) y B05 (e). ..	116
<b>Figura 57.</b> Espectros SERS de CA (a) y de las muestras B05A (b), B05B (c) y B01 (d). Las señales marcadas corresponden a aquellas que permiten identificar la presencia de CA. ....	118
<b>Figura 58.</b> (a) Imagen óptica de las muestras B05 y B01. (b) Imagen obtenida al graficar en verde la intensidad de la señal $K\alpha$ de Si.....	118
<b>Figura 59.</b> Espectros SERS del pigmento laca de cochinilla ( <i>Dactylopius coccus</i> ) y aluminio (a) y de las muestras B02 (b), B03 (c) y B05B (d). .....	119
<b>Figura 60.</b> Espectros SERS de los extractos acuosos de la cochinilla ( <i>Dactylopius coccus</i> ) (a) y de la planta <i>Galium hypocarpium</i> (b). .....	121

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

$\zeta$	Potencial zeta
IR	Radiación infrarroja
UV	Radiación ultravioleta
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
ATR-IR	Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada
ERI	Elemento de reflexión interna
$\theta_c$	Ángulo crítico
$d_p$	Profundidad de penetración
$\lambda$	Longitud de onda
$n_i$	Índice de refracción
RS	Espectroscopía Raman
$\alpha$	Polarizabilidad
RRS	Espectroscopía Raman Resonante
FT	Transformada de Fourier
SERS	Espectroscopía Raman Amplificada por Superficie
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
LDI-ToF-MS	Ionización por desorción láser tiempo de vuelo con espectrometría de masas
NPs	Nanopartículas
Az	Alizarina
Pu	Purpurina
CA	Ácido carnínico
Pp	Pseudopurpurina
$\nu$	Estiramiento
$\rho$	Balanceo
$\delta$	Deformación
$\omega$	Cabeceo

## 1. RESUMEN

Este trabajo de tesis consiste en un aporte a la caracterización de los textiles arqueológicos e históricos mediante el uso de técnicas espectroscópicas vibracionales (Infrarrojo, Raman y Dispersión Raman Amplificada por Superficie (SERS)), para generar un acercamiento entre los depositarios de los vestigios de nuestros antepasados y la información obtenida con estas técnicas. Para lograrlo se decidió abordar al textil teñido como un sistema conformado por distintos componentes (y sus combinaciones) que se mantienen mediante interacciones químicas ya estudiadas y no completamente descifradas. En este trabajo se consideró que el textil teñido consiste en al menos tres partes distintas que interactúan para lograr el color: colorante, fibra y mordiente.

Al considerar que la mayor parte de los textiles arqueológicos encontrados en Chile provienen de material proteico se eligió utilizar una fibra de esta naturaleza para el estudio de las interacciones entre los distintos componentes. En particular, se decidió utilizar seda en lugar de lana por su respuesta al ser irradiada con láseres y por su homogeneidad estructural. Se puede resumir que la estructura de la seda, en parte cristalina, y la homogeneidad de sus estructuras primarias y secundarias permiten una mejor interpretación de la información obtenida puesto que no favorecen la fluorescencia al utilizar espectroscopía Raman. Para estudiar la interacción entre la proteína y los metales, además de la fibroína mordentada, se escogieron las sedas pesadas, determinando su influencia en la conservación

de textiles de seda. Del mismo modo se puso atención en la caracterización vibracional de distintos colorantes y de sus complejos metálicos. Se observó que la respuesta SERS del colorante es dependiente del metal utilizado y que los complejos metálicos de los colorantes se pueden identificar en la fibra.

El total de las caracterizaciones realizadas sobre las fibras proteicas, los colorantes, los complejos metálicos de los colorantes y las fibras teñidas, se resume en la evaluación crítica de las herramientas vibracionales para el estudio de este tipo de materiales. Se contrastó la información obtenida de muestras reales con aquellas preparadas en el laboratorio, teniendo en mente que la identificación de distintos componentes tiene como objetivo la interpretación de patrones desde el punto de vista tecnológico de las culturas antiguas. Esto resultó en la reevaluación de espectros obtenidos de muestras arqueológicas.

## 1. ABSTRACT

This thesis contributes to the characterization of archaeological and historical textiles by means of the use of vibrational spectroscopic techniques (Infrared, Raman and Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)), in order to generate an approach between the depositaries of the vestiges of our ancestors and the information obtained with these techniques. To achieve this, it was decided to approach the dyed textile as a system made up of different components (and their combinations) that are held together through chemical interactions already studied but not completely deciphered. In this work, it was considered that the dyed textile consists of at least three different parts that interact to achieve the colored fiber: dye, fiber and mordant.

Considering that most of the archaeological textiles found in Chile correspond to proteinaceous material, it was chosen to use a fiber of this nature to study the interactions between the different components. In particular, it was decided to use silk instead of wool because of the response it presents when irradiated with lasers, and due to its structural homogeneity. It can be summarized that its structure, partly crystalline, and the homogeneity of the primary and secondary structures of the silk allow a better interpretation of the obtained information since they do not favor fluorescence when using Raman spectroscopy. In order to study the interaction between protein and metals, in addition to the mordanted fibroin, weighted silks were studied to study the influence of metals on the conservation of this kind of textiles. In the same way,

attention was paid to the vibrational characterization of different dyes and their metal complexes. It was observed that the SERS response of the dye is dependent on the metal used and that the metal complexes of the dyes can be identified in the fiber.

The total of the characterizations made on the protein fibers, the dyes, the metal complexes of the dyes and the dyed fibers, is summarized in the critical evaluation of the vibrational tools in the study of this type of materials. The information obtained from real samples was compared with those prepared in the laboratory, bearing in mind that the identification of different components is aimed at the interpretation of patterns of ancient cultures from the technological point of view. This resulted in the re-evaluation of spectra obtained from archaeological samples.

## 2. INTRODUCCIÓN

En términos generales, los avances tecnológicos y de instrumentación han permitido que la Arqueología como disciplina sea capaz de responder a muchas preguntas que se han arrastrado desde que los vestigios humanos comenzaron a estudiarse. Del mismo modo, estos avances han permitido formular nuevas preguntas, lo que en los últimos años ha desencadenado una fuerte interacción con las ciencias naturales y exactas para la reconstrucción de los patrones de comportamiento humano. Esta interacción, se ha ido validando y fortaleciendo durante el último par de décadas tomando la forma de una disciplina en sí misma: la Arqueometría. A pesar que aún no se reconoce como una disciplina por todo el mundo, a través de la metodología y de quienes la desarrollan lentamente, se dirige a conformarse como tal.

Los contextos arqueológicos corresponden a los territorios individualizados que presentan signos de ocupación humana. Entre estos signos se encuentran distintos tipos de restos que pueden denotar el uso del territorio estudiado. En general, los contextos arqueológicos más comunes son los mortuorios y los habitacionales, y entre los restos más comunes se encuentran distintos tipos de utensilios cerámicos y herramientas, y textiles. En Sudamérica, en el territorio que al momento de la llegada de los conquistadores españoles correspondía a la zona centro-sur del imperio Inca (actualmente sur del Perú, sureste de Bolivia, noreste de Argentina y norte de Chile), las condiciones climáticas predominantes favorecen la conservación de muchos de

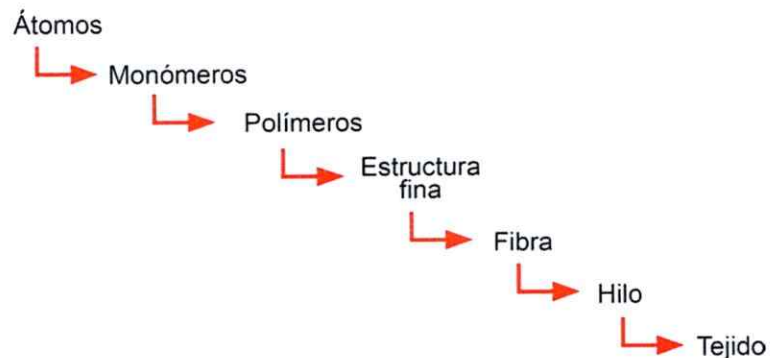


los restos orgánicos presentes. Esto hace que el conocimiento de las culturas que habitaron esa región, incluso previo a la expansión del imperio Inca, esté muy avanzado. En particular, se ha encontrado que las condiciones de sequedad y altura (en muchos casos) favorecen enormemente la momificación natural de los cuerpos enterrados y también de los restos orgánicos asociados. Entre estos materiales asociados se cuentan numerosos textiles que cubrían las diversas necesidades del ser humano. En particular, se ha encontrado que en los textiles arqueológicos la complejidad y la presencia de diseños eran símbolo de prestigio y riqueza [1].

El estudio de este tipo de hallazgos finalmente cumple una gran meta que es la puesta en valor del Patrimonio cultural a través de la construcción de la identidad de un pueblo mediante la comprensión de sus culturas antiguas. Este tipo de estudios en todo caso debe ser un esfuerzo transdisciplinario, de manera que los datos y los hallazgos, se interpreten considerando toda la información complementaria que se tenga de los objetos.

## 2.1. Textiles

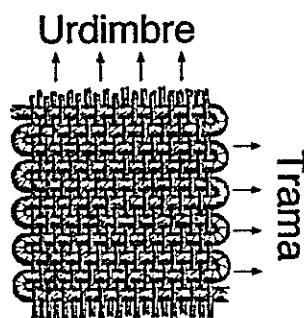
A modo general el textil es uno de los niveles de estructura en los que se puede llegar a subdividir un objeto hecho a partir de fibras de acuerdo a la Figura 1. Las fibras corresponden, en el proceso de extracción, a la mínima unidad estructural funcional a partir de la cual se constituye el hilo. Independiente del origen de cada tipo de fibra disponible, todas tienen en común que en alguno de sus niveles estructurales corresponden a polímeros que se asocian formando fibrillas, las que a su vez se unen para formar la fibra. En particular, un textil corresponde a una composición de hilos (de fibras hiladas) entrelazados de manera tal que forman (generalmente) un objeto se dispone en dos dimensiones.



**Figura 1.** Niveles de estructura en la composición de un textil.

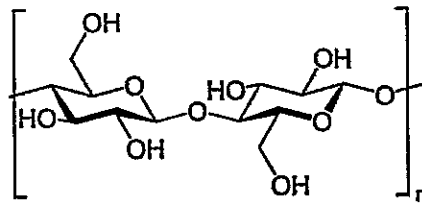
Generalmente, en la confección de tejidos una serie de fibras dispuestas en forma vertical, fijas y tensas, llamada urdimbre, recibe a la fibra que se denomina trama y se entrelaza en forma horizontal, de acuerdo a lo observado en la figura 2. En general, esta forma de tejer las fibras tiene problemas de

conservación asociados a la tensión e inmovilización de las fibras [2]. Independiente del tipo de manufactura, las fibras utilizadas para la confección de hilos pueden ser naturales (animal o vegetal) o sintéticas. Los aspectos industriales respecto de la manufactura de textiles se encuentran muy bien descritos en la literatura [3, 4], y en general se basan en los mismos procedimientos utilizados desde la antigüedad. Las etapas mínimas que se consideran como parte del proceso, son la extracción, limpieza, hilado y tejido.



*Figura 2. Esquema de un tejido tafetán simple (1:1).*

Las fibras de origen vegetal tienen como factor común la composición mayoritaria de celulosa (figura 3). La celulosa es un polímero natural en el que el monómero es la celobiosa (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucosa), un disacárido compuesto por dos unidades de glucosa unidas a través de un enlace  $\beta$ -1,4. La celulosa se puede encontrar lignificada (fibras de tallo) y no lignificada (algodón), y en su origen puede contener distintas cantidades de pectina, ceras y proteínas. La celulosa constituye la pared celular de las plantas y de algunos tipos de algas. Debido a su estructura química, en particular a la presencia de grupos OH, resultan ser fibras higroscópicas.



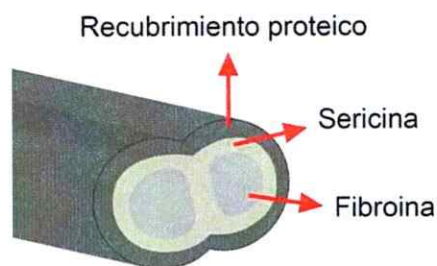
**Figura 3.** Unidad de celobiosa (4-O-β-D-glucopiranosil-D-glucosa), monómero de la celulosa.

Las fibras de origen animal son de naturaleza proteica. Pueden corresponder al pelo de algunos animales o a la secreción de algunos insectos. La lana, en particular, corresponde al pelo de la oveja doméstica *Ovis aries*, por lo que cuando se trata de un animal distinto, como por ejemplo la alpaca (*Lama pacos*), lo correcto es hablar de lana de alpaca para referirse al pelo de ese animal. Para el caso de las lanas de animales (e incluyendo el cabello humano) la proteína que se encuentra en mayor proporción corresponde a la queratina, una proteína con alto contenido de cisteína. Este aminoácido es capaz de formar puentes disulfuro en la estructura secundaria de la queratina lo que la hace estructuralmente ser muy estable. La queratina presenta principalmente dos tipos de estructura terciaria, que se describen como α-queratina, una hélice α y la β-queratina, un tipo de hoja β. Las cadenas poliméricas de α-queratina se unen para formar protofibrillas y estas a su vez para formar microfibrillas, las que junto a otras proteínas en menor proporción conforman la corteza. En las fibras de lana, la corteza está cubierta por cutículas, un conjunto de células en forma de escamas, cuya morfología permite la determinación de ciertas características que pueden llevar a la identificación de distintos tipos de lana.

Las secreciones de algunos tipos de artrópodos son conocidas como sedas, y su uso no se limita a la industria textil [5], sino que también es utilizado en medicina. Entre estos artrópodos se cuentan algunos arácnidos y algunos insectos, por lo que el término seda no queda restringido a la secreción proveniente del gusano de la seda (*Bombyx mori*). Este gusano fue domesticado en China hace 5000 años y con ello la tradición de su uso como textil. La seda producida por el gusano de la seda consiste en dos hebras de una proteína llamada fibroína unidas con otra proteína llamada sericina (figura 4). La sericina corresponde principalmente a una proteína de constitución amorfa a la que se denomina como goma, por su función adhesiva. Esta proteína es eliminada en una etapa previa al hilado de la seda en un proceso denominado comúnmente desgomado; este consiste en baños de agua caliente levemente básica, y que pueden generar hasta un 25% de disminución en la masa del producto final [6]. La fibroína, que corresponde entonces a la seda desgomada, está estructurada principalmente por hojas  $\beta$  enlazadas por secciones amorfas. Las hojas  $\beta$  en la seda del gusano *Bombyx mori* se forman por la interacción mediante puentes de hidrógeno de unidades del péptido motivo glicina-alanina-glicina-alanina-glicina-serina (GAGAGS)<sub>n</sub> [7], aminoácidos que al mismo tiempo constituyen el 90% de la composición química de la fibroína. La superposición de hojas  $\beta$  son las responsables de la presencia importante de nanocristales dentro de la estructura de la seda [8]. Esta porción cristalina le confiere una anisotropía a la fibroína asociada principalmente a su respuesta frente a la luz en distintas orientaciones. La

porción cristalina es al mismo tiempo responsable de las destacadas propiedades mecánicas de las sedas que superan a cualquier otra fibra, sintética o natural, en términos de fuerza, extensibilidad y compresibilidad [9].

Para compensar la pérdida de masa durante el desgomado, por mucho tiempo se recurrió al pesado de las sedas a través de la adición de sales metálicas que permitieran recuperar la masa y por ende elevar el precio del tejido [6]. El pesado se cree que pudo comenzar con los primeros procesos de teñido negro que se realizaban utilizando taninos y sales de hierro (composición similar a la de las tintas ferrogálicas); sin embargo, en su auge las sales de estaño fueron las más utilizadas. Alternativamente, el acetato de plomo y el de cinc fueron utilizados debido al costo de las sales de estaño.



**Figura 4.** Representación esquemática de la seda del gusano *Bombyx mori*.

Resulta particularmente interesante el estudio de las sedas pesadas pues en el tiempo desarrollan un tipo de degradación en el que la fibra se debilita y se destruye con facilidad hasta convertirse en polvo. Si bien, no está claro cuáles son los mecanismos asociados a este tipo de rupturas, sí se puede esperar que los distintos metales estén favoreciendo procesos de hidrólisis y oxidación de la cadena polimérica que conforma la fibroína.

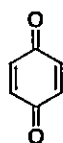
## 2.2. Colorantes naturales

Normalmente se utiliza la palabra pigmento para referirse a la sustancia que colorea un material o superficie. Y si bien esto es correcto hasta un punto es necesario hacer una salvedad al respecto. El pigmento es una sustancia orgánica o inorgánica particulada coloreada, negra, blanca o fluorescente insoluble y que se aplica a través de un medio, al cual es fisicoquímicamente inerte, en procesos en los que no se pierde su estructura. El colorante por otro lado es una sustancia orgánica de color intenso o fluorescente y que son solubles o que al menos en alguna de las etapas de aplicación pierden su estructura o forma de agregación. El color en pigmentos y colorantes se produce por la absorción selectiva de algunas longitudes de onda del espectro electromagnético por los grupos cromóforos de la molécula; sin embargo, en los pigmentos, el color además se puede producir mediante procesos de dispersión de la radiación, debido a su naturaleza particulada. Hasta el descubrimiento del primer colorante sintético, el púrpura de anilina, por Henry W. Perkin [10] en 1856 la mayor parte de los colorantes utilizados provenían de fuentes naturales, tanto de origen animal (insectos y moluscos) como vegetal (plantas, frutos, cortezas, etc.) con métodos de extracción que varían de acuerdo al material utilizado. Los usos iban desde la preparación de pigmentos para maquillaje [11] o pintura [12], hasta el teñido de textiles [13]. Para el caso de los colorantes naturales, la materia colorante se considera al material desde el cual se extrae el colorante. En muchos casos, en los extractos de la materia colorante existen

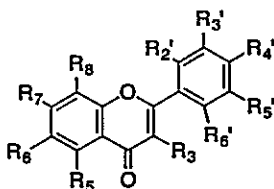
precursores de colorantes que a través de procedimientos de tinción aumentan la cantidad de algunos de los colorantes preexistentes. Un ejemplo de este fenómeno es la transformación de pseudopurpurina (Pp) en purpurina (Pu) cuando las raíces de la *Rubia tinctorum* quedan almacenadas [14]. Estos precursores también suelen ser los colorantes con una molécula de algún azúcar enlazado a la estructura, es decir sus glicósidos.

Existen diversas formas de clasificar los colorantes [15]. En particular la división se puede realizar de acuerdo a las estructuras químicas obtenidas desde los extractos. En esta perspectiva los grupos más relevantes en los que se distribuyen los colorantes naturales son: quinonas, indigoides, flavonoides, carotenoides y taninos (figura 5).

**a) Quinonas**



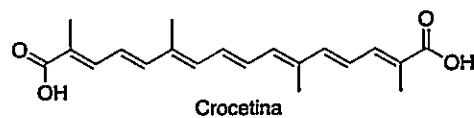
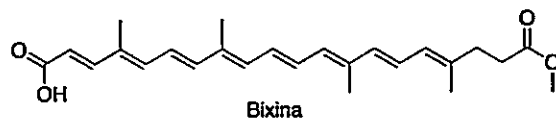
**b) Flavonoides**



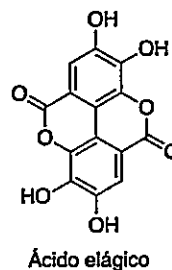
**c) Indigoides**



**d) Carotenoides**



**e) Taninos**

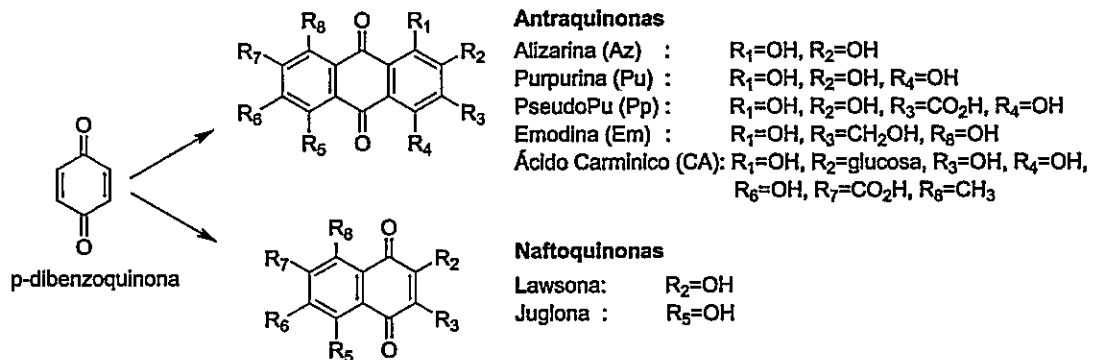


**Figura 5.** Estructuras base de algunos de los colorantes naturales más abundantes.



El grupo de las quinonas corresponde a una gran clasificación de moléculas que tienen como base la presencia de *p*-dibenzoquinona (figura 6). Además del uso de las moléculas dentro de este grupo para teñir textiles existe un gran interés por su actividad biológica [16]. Dentro de este grupo se cuentan las naftoquinonas, cuyos colorantes más destacados en cuanto a uso son la juglona y la lawsona, isómeros estructurales, extraídos principalmente de distintas especies del género *Juglans* (nogales) y de la *Lawsonia inermis* (Henna), respectivamente. Dentro del grupo de las quinonas también se destacan las antraquinonas, que corresponden a los derivados de la sustitución en las posiciones 1 a 8 de la estructura base que se observa en la figura 6 y generan colores que van desde amarillo hasta marrón, aunque se caracterizan principalmente por las tonalidades rojas. En su forma natural se pueden extraer de diversas fuentes, siendo las más importantes las raíces de las plantas de la familia de las rubiáceas entre las que se destacan los géneros *Galium* (G.) y *Rubia* (R.). Las raíces de las plantas de algunas especies de estos dos últimos géneros han sido indicadas como las principales fuentes para la obtención de alizarina (Az) y purpurina (Pu), dos de los colorantes más abundantes. Otras fuentes más comunes utilizadas han sido aquellas provenientes de insectos como la cochinilla (*Dactylopius coccus*), el kermes (*Kermes vermilio*) o el insecto laca (*Kerria lacca*), desde los cuales se extraen como colorantes principales, los ácidos carmínico (CA), kermésico y lacaico, respectivamente.

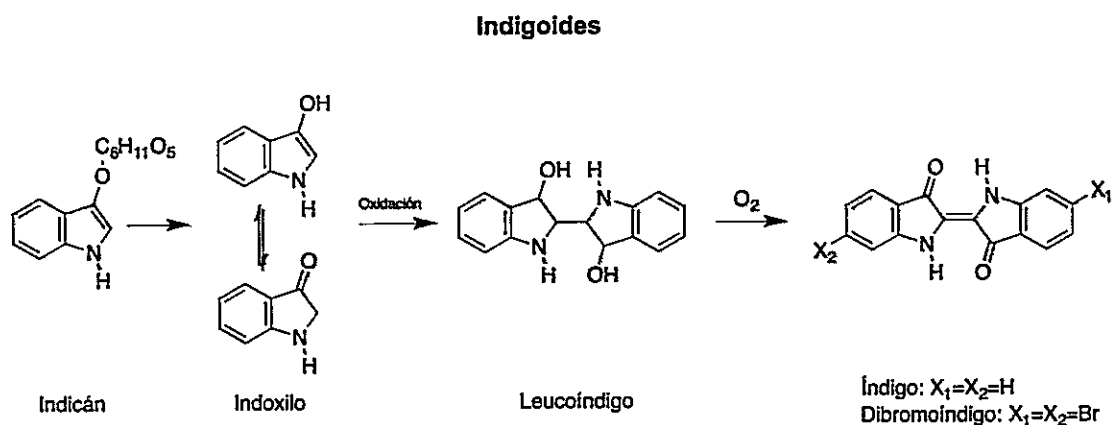
## Quinonas



**Figura 6.** Estructuras de algunos colorantes derivados de quinonas (antraquinonas y naftoquinonas). En las estructuras R<sub>n</sub> = H a menos que se indique otro sustituyente.

En términos generales, el uso de colorantes derivados de antraquinonas es el más extenso en términos de su distribución geográfica y a través de la historia. La cochinilla, por ejemplo, ha sido utilizada por pueblos precolombinos [17] y exportada a Europa después del inicio de la colonización, reemplazando el uso del kermes para la obtención de colorantes rojos.

Entre los indigoides se destacan el índigo (azul) y el dibromoíndigo (púrpura) (figura 7). El proceso para la obtención del índigo parte con la obtención del precursor indicán que corresponde a un glucósido del indoxilo (soluble en agua). Una vez removida el azúcar, dos moléculas de indoxilo se unen para formar el colorante azul índigo. Sin embargo, para la aplicación del índigo en las fibras éste debe encontrarse disuelto en el medio de tinción, para lo cual es reducido a su forma leuco (solución amarilla). Una vez aplicado al textil, el índigo adquiere su color azul característico por oxidación de la forma leuco en presencia del oxígeno en el aire (figura 7).



**Figura 7.** Síntesis y estructura de algunos indigoides.

El índigo, al igual que algunas antraquinonas, puede ser obtenido de plantas de distintos géneros, entre los que se cuentan algunas especies dentro del género *Indigófera* (*tinctoria* en Asia y *suffruticosa* en América) y del *Isatis* (*tinctoria* en Europa); sin embargo, para la obtención del índigo se utilizan las hojas en lugar de las raíces como materia prima. El otro indigoide de mayor importancia es el dibromoíndigo, molécula responsable del color púrpura en el colorante púrpura de Tiro. Este colorante es producido por la secreción de la glándula hipobranquial de algunos moluscos de la familia *Muricidae* [18, 19], y al igual que el índigo, su color final se alcanza tras la oxidación de sus precursores en presencia del oxígeno en el aire.

Los flavonoides (figura 5b) corresponden a un grupo ampliamente presente en las distintas partes de las plantas, principalmente flores, frutos y hojas [20]. De la gualda (*Reseda luteola*) se extrae uno de los flavonoides más importantes, la luteolina (figura 5b,  $R_3'=R_4'=R_5=R_7=OH$ ), una flavona extensamente utilizada como colorante amarillo en Europa [13, 17]. El grupo de

los taninos corresponde a un grupo muy amplio dentro de la clasificación de materiales utilizados para aplicar color y que han sido utilizados desde la antigüedad. Los taninos son solubles en agua y poseen estructuras diversas con la presencia de grupos fenólicos libres y elevados pesos moleculares. Se subdividen en 2 grandes grupos, los taninos hidrolizables y las proantocianidinas o taninos condensados [21]. Dentro del primer subgrupo se encuentra el ácido gálico y el elágico (figura 5e), el primero muy utilizado para la producción de tintas ferrogálicas [22].

### 2.3. Teñido

El teñido es una forma de colorear un textil a través de la aplicación uniforme de un material coloreado. Desde este punto de vista, la aplicación de un pigmento disperso en aceite sobre un lienzo también aplica como teñido. Sin embargo, se utilizará el concepto de teñir en un sentido más específico, es decir la aplicación de un colorante en una fibra. Como se mencionó antes, por definición, en alguno de los pasos durante la aplicación de los colorantes en los tejidos estos deben disolverse en el líquido de tinte para ser aplicados. Durante el proceso de teñido deben considerarse numerosos factores, la mayoría de ellos asociados a la afinidad del colorante por la fibra. Entre ellos se cuentan: el tipo de reactividad del colorante hacia la fibra, las características del líquido de tinte y la fijación del colorante a la fibra. Las propiedades que entran en juego son la disponibilidad del colorante en el líquido de tinte, que tienen que ver con la capacidad de disolver el colorante, esto es, pH y temperatura adecuado; asegurar la adsorción del colorante a la fibra para luego favorecer su difusión dentro de la fibra, lo que implica el manejo de los parámetros relacionados con estos fenómenos. En particular, el potencial zeta ( $\zeta$ ), que es una medida de la diferencia de potencial eléctrico entre la capa de carga fija a la superficie cargada (capa de Stern) y la fase móvil, permite tener una noción de las interacciones electrostáticas entre la superficie de la fibra y la molécula de colorante [23]. El manejo y las influencias que estos parámetros tienen en el proceso de teñido exceden los alcances de este trabajo de tesis; sin embargo,

existe literatura actualizada y especializada para consultar de ser necesario [24].

Además de las agrupaciones de acuerdo a la estructura química, los colorantes se pueden dividir de acuerdo al tipo de aplicación en los textiles. Este tipo de división es el que se utiliza preferentemente en la industria. De acuerdo a esta división los colorantes se pueden agrupar hasta en 19 categorías entre las que se destacan los ácidos, básicos, azoicos, directos, dispersos, reactivos, solventes, pigmentos, mordientes, naturales, sulfurados o colorantes de cuba [25, 26]. Dentro de la última clasificación, son de particular interés para este trabajo los colorantes del tipo mordiente.

Uno de los pasos determinantes del proceso de teñido es la fijación del colorante a la fibra. Esto puede ocurrir de varias formas una vez que las condiciones óptimas de teñido se alcanzan, y van a depender del tipo de colorante y del tipo de fibra. La mayoría de los procesos en la actualidad ocurren a través de la formación de un enlace covalente entre el colorante y la fibra, y al uso de materiales auxiliares con el objetivo de facilitar la interacción que lleva a la formación del enlace. Existe, sin embargo, un tipo de aplicación de colorantes en el que se emplea la adición de una sal metálica para la fijación del colorante a la fibra; este proceso se denomina mordentado y el metal utilizado se denomina mordiente. Los taninos, mencionados anteriormente, también son utilizados como mordientes gracias a su capacidad de unirse a las proteínas y de fijar las sales metálicas añadidas posteriormente para generar el

color final [27]. El proceso de teñido por mordentado ocurre a través de la formación de un compuesto de coordinación entre el metal previamente aplicado a la fibra y el colorante que cumple la función de quelato. La aplicación de la teoría de coordinación de Werner al estudio de complejos metálicos de colorantes partió con su estudiante P. Pfeiffer [28], quien ajustó la teoría al estudio de complejos metálicos de alizarina; todo esto a pesar que la síntesis y uso de este tipo de compuestos es conocida desde hace miles de años tanto en el teñido de textiles como en la preparación de pigmentos [29, 30]. Los pigmentos preparados a partir de colorantes reciben el nombre de pigmentos tipo laca (lake pigments) y corresponden en principio a compuestos organometálicos de coordinación, que históricamente se han obtenido principalmente de dos formas. La primera involucra la formación del complejo metálico, entre un catión polivalente y el colorante o los colorantes obtenidos desde la materia colorante, que precipita desde la solución, y la segunda es la adsorción de los colorantes en un substrato inerte como tiza, alumbre o arcillas blancas [11]. El colorante que se coordina al metal generalmente tiene características de dador de electrones, lo que genera un corrimiento batocrómico en el espectro de absorción de los complejos metálicos respecto del colorante puro. La magnitud del cambio está relacionada con la capacidad del ión metálico de acomodar la carga y por lo tanto el uso de distintos metales resulta en la obtención de distintos tonos para un mismo colorante [28]. Lo anterior también resulta cierto para la tinción de fibras con distintos mordientes y un mismo colorante [31, 32].

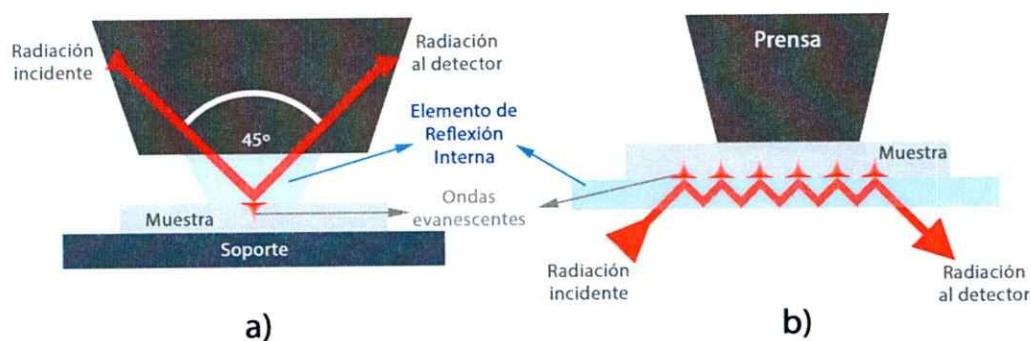
#### 2.4. Espectroscopía vibracional

La espectroscopía vibracional es en términos generales un conjunto de técnicas que tienen como objetivo la detección de las energías necesarias para la perturbación de los estados vibracionales de dos o más átomos enlazados, en particular, a través de la absorción del infrarrojo (IR) y de la dispersión inelástica (efecto Raman). Para el modelo más simple, la molécula diatómica, las energías de estos estados vibracionales son similares a los observados en el oscilador armónico (ley de Hooke) en los estados vibracionales más bajos y se corrigen añadiendo una constante de anarmonicidad (potencial de Morse).

La espectroscopía FTIR ha experimentado importantes avances instrumentales desde su auge a mediados del siglo XX, que se han traducido en la presencia de esta técnica en laboratorios de las más diversas índoles como la herramienta de caracterización molecular por excelencia. La espectroscopía FTIR da cuenta de las variaciones de los momentos dipolares de las moléculas por la absorción de la porción IR del espectro electromagnético, que en el método de muestreo por transmisión responde a la ley de Lambert-Beer. Además del método de muestreo por transmisión, donde la muestra se dispersa en un medio transparente a la radiación IR, existen (entre otros) los métodos de reflexión en los que la radiación es guiada a través de elementos de reflexión. Entre estos métodos se destaca la espectroscopía FTIR por reflectancia total atenuada (ATR-IR), en el que la radiación es guiada a través de un elemento de reflexión interna (ERI) de tal manera que se exceda el ángulo crítico ( $\theta_c$ )



(ecuación 1) en la porción IR del espectro electromagnético estudiada. Cuando la radiación IR es reflejada dentro del ERI, se produce una onda evanescente que penetra una cierta distancia ( $d_p$ ) hacia la interface donde está ubicada la muestra (figura 8). La  $d_p$  (ecuación 2) es dependiente de la longitud de onda ( $\lambda$ ) y del índice de refracción, tanto del ERI ( $n_1$ ) como de la muestra ( $n_2$ ).



**Figura 8.** Esquema con las configuraciones más habituales del ERI con respecto a la muestra. En la primera a) el ERI es presionado contra la muestra desde la parte superior y en la segunda b) la muestra es presionada contra el ERI.

$$\theta_c = \sin^{-1} \left( \frac{n_2}{n_1} \right) \quad (1)$$

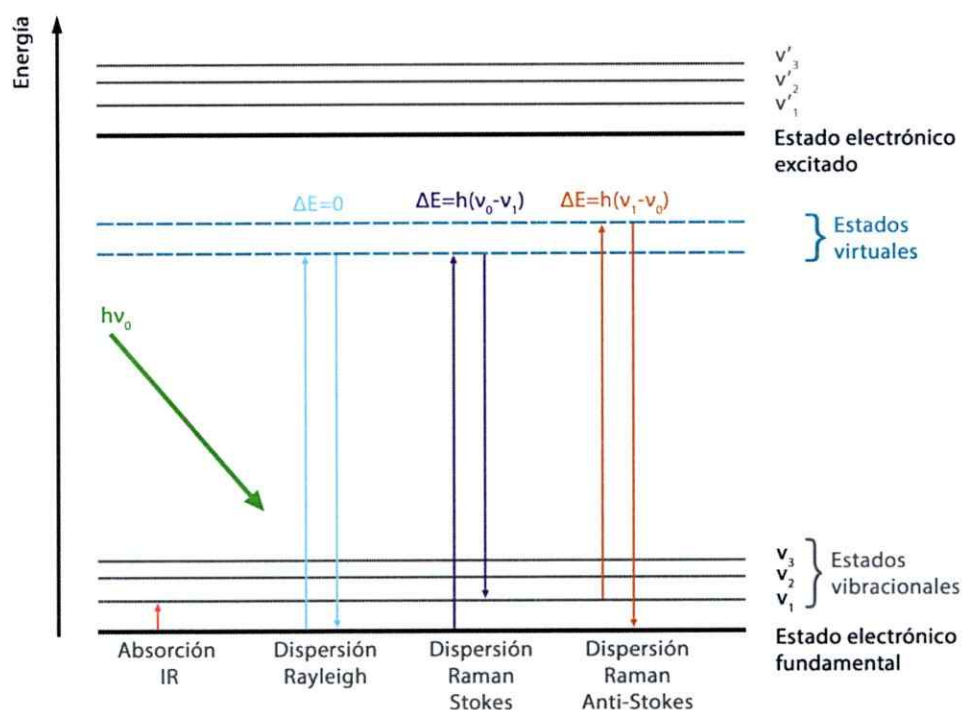
$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}} \quad (2)$$

Si bien en el ATR-IR se elimina el problema de la preparación de la muestra y su consecuente destrucción al ser dispersada en un medio transparente a la radiación IR, este método de muestreo trae consigo dos problemas: la distorsión en la intensidad de las señales y los corrimientos de

frecuencia hacia números de onda menores [33]. La distorsión en la intensidad de las señales se desprende directamente de la ecuación 2, de la que se puede deducir que, como a  $\lambda$  mayor la  $d_p$  será mayor, entonces la intensidad de la señal también será mayor. Del mismo modo, se puede deducir de la ecuación 2 que las diferencias de  $d_p$  por la longitud de onda puede alterar localmente los índices de refracción de la muestra y por tanto generar corrimientos de las frecuencias. Ambos fenómenos resultan particularmente problemáticos al comparar los espectros por ATR-IR con aquellos en las bases de datos que corresponden principalmente a espectros obtenidos por transmisión.

El efecto Raman (RS), observado por primera vez en 1928 [34, 35], consiste en la dispersión (scattering) inelástica de la radiación incidente sobre un sistema molecular, es decir, una dispersión en la que se observan corrimientos con respecto a la frecuencia de la radiación incidente. Estos corrimientos pueden ser a frecuencias menores (corrimiento Stokes) o mayores (corrimiento anti-Stokes) con respecto a la frecuencia de la radiación incidente, y están originados por los cambios de polarizabilidad ( $\alpha$ ) de los enlaces dentro de la molécula. Los corrimientos Stokes generalmente ocurren cuando la molécula se encuentra en un estado vibracional fundamental y los anti-Stokes cuando la dispersión inelástica ocurre desde un estado vibracional excitado. La excitación de los estados vibracionales no ocurre de forma directa, como en la espectroscopia IR, sino que a través del paso por un nivel energético excitado virtual (figura 9) que se relaja a un estado vibracional más o menos energético

dependiendo de si la dispersión es Stokes o anti-Stokes. La espectroscopía Raman hace uso de una radiación monocromática para la excitación de los sistemas moleculares estudiados y que, gracias a la introducción de los láseres, a los avances en su manufactura, y a las constantes mejoras en los detectores permiten la adquisición de información de mayor resolución y con tiempos de análisis cada vez menores. El efecto Raman es un fenómeno poco eficiente en términos de la cantidad de fotones dispersados inelásticamente, y que además compite con la fluorescencia, sobre todo en casos de muestras coloreadas.



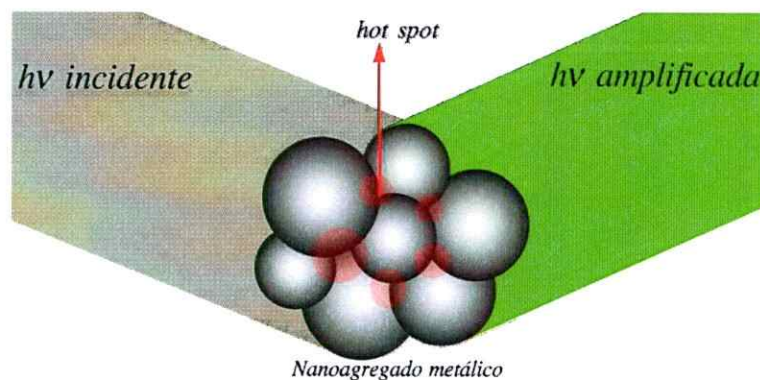
**Figura 9.** Diagrama de energía de estados vibracionales involucrados en la dispersión Raman y la absorción IR.

La baja eficiencia del efecto Raman con respecto de la fluorescencia puede enfrentarse a través de distintas aproximaciones. Entre las más utilizadas se encuentra la espectroscopía Raman resonante (RRS), que consiste en la elección de una longitud de onda de excitación igual, o muy cercana a alguna transición electrónica de la molécula estudiada, principalmente en la región visible del espectro electromagnético; esto hace que se alcance el nivel electrónico excitado y que la relajación ocurra al nivel vibracional excitado. Esto implica que la fluorescencia no es eliminada y que puede interferir tanto o más que en el RS, a pesar que la magnificación puede alcanzar hasta  $10^6$  órdenes de magnitud. El tratamiento de este fenómeno se encuentra ampliamente descrito [36-38].

La espectroscopía Raman amplificada por superficies (SERS) se ha desarrollado como una metodología capaz de aumentar la intensidad de las señales Raman. El SERS tiene su origen en la observación de la respuesta vibracional amplificada que se obtuvo de la piridina adsorbida sobre la superficie de electrodos de plata con rugosidades generadas electroquímicamente [39]. En un principio este aumento de la señal Raman se atribuyó al aumento de la cantidad moléculas adsorbidas por el aumento de la superficie efectiva en el electrodo; sin embargo, más tarde se descubrió que la amplificación de la señal no solo ocurría por el aumento de las moléculas adsorbidas en la superficie, sino que también por un aumento en la eficiencia del efecto Raman [40, 41]. Estos descubrimientos han sentado las bases para

el desarrollo de esta técnica que ha sido capaz de aumentar la eficiencia de la espectroscopía Raman hasta la detección incluso de una sola molécula [42].

El SERS resulta de una combinación de fenómenos que involucran la interacción de la radiación con la superficie metálica y la molécula (figura 10). Se ha encontrado que esta interacción puede ocurrir a través de dos mecanismos: químico y electromagnético, y que la contribución de cada uno a la amplificación total no puede ser determinada. El mecanismo químico involucra aquellos procesos en los que la amplificación de la señal depende de la existencia de una interacción entre la molécula y la superficie, es decir, procesos de adsorción química, resonancia y transferencia de carga [43], con factores de amplificación que pueden variar entre 10 y  $10^6$  [44].



**Figura 10.** Representación del fenómeno de amplificación de la señal Raman por efecto de la superficie metálica.

La amplificación de la señal a través del mecanismo electromagnético está relacionada con el aumento del campo eléctrico en la superficie metálica por la influencia del campo electromagnético externo. Cuando la superficie

metálica es irradiada, existe la posibilidad de generar la oscilación coherente de los electrones de superficie (plasmón), lo que a su vez puede también generar la amplificación de la señal dispersada en factores de hasta  $10^{11}$ . El aumento del campo eléctrico en la superficie es dependiente de la geometría de la superficie y alcanza sus máximos en zonas donde existen rugosidades a escala nanométrica. Se ha encontrado que idealmente los metales deben ser buenos conductores, poco reactivos en aire y con altas densidades eléctricas; con esto se asegura que al irradiar la superficie se genere el plasmón. La búsqueda por superficies activas en SERS ha llevado a la preparación de diferentes sistemas capaces de aumentar la señal Raman utilizando diversos metales [45, 46]. Los metales más activos en SERS son la plata (siendo también la más utilizada), seguida de los metales alcalinos, oro y cobre [47, 48]. Entre los métodos más comunes de fabricación de superficies SERS activas se encuentran la reducción química, la electrodeposición, el grabado químico (*etching*) y la litografía [48-50]. El tratamiento teórico de la amplificación de la señal Raman se encuentra extensamente tratado en la literatura [47, 51-56] y por lo tanto no se profundizará en ello.

## **2.5. Caracterización de textiles coloreados y uso de técnicas vibracionales aplicadas al estudio del patrimonio cultural**

La caracterización e identificación de los materiales que componen los objetos de interés patrimonial puede realizarse a través de numerosas técnicas analíticas. Dependiendo del tipo de material algunas técnicas presentan ventajas notorias sobre otras por lo que el análisis mediante otras técnicas queda descartado *a priori*; sin embargo, debido al alcance que puede tener un resultado en términos de la información que puede proveer respecto de los patrones de comportamiento humano, es importante que los resultados obtenidos se confirmen utilizando técnicas analíticas complementarias.

En el caso de la identificación de fibras naturales, se ha logrado obtener los espectros RS e IR de fibras vegetales [57, 58] y animales [7, 59, 60]. En el caso de las fibras de origen celulósico, las diferencias en los espectros son tan sutiles que se requiere de métodos estadísticos para diferenciar las fibras [61] o del uso de técnicas vibracionales polarizadas para lograr establecer ciertas diferencias [62]. Y, aun así, la interpretación de los resultados puede ser ambigua si es que se considera la degradación de estas fibras. En el caso de las fibras de origen proteico otros factores influyen en la buena obtención de los espectros vibracionales. Entre algunos de estos factores se cuentan la naturaleza polimérica de las fibras, que produce ensanchamiento de las bandas en IR y baja dispersión Raman, y la similitud de la información obtenida dentro de un mismo tipo de fibra, es decir, los pelos de animales (lanas) poseen

espectros vibracionales muy similares entre ellos. Adicionalmente, las lanas presentan una elevada fluorescencia al ser analizadas por RS con excitaciones en el UV y el visible, lo que hace que su espectro solo se pueda obtener irradiando con línea láser en el infrarrojo (1064 nm) y por tiempos extremadamente prolongados [59, 60]. La seda por otro lado, presenta un comportamiento algo distinto al ser estudiada mediante técnicas vibracionales. Debido a su elevada porción cristalina y a su baja variabilidad aminoacídica incluso sus estructuras secundarias pueden ser observadas por RS [7, 63]. La interacción de la seda con algunos metales también ha sido estudiada exitosamente en el contexto de la interpretación de la degradación observada en textiles históricos, encontrándose que el pesado con estas sales genera alteraciones en la cristalinidad y estructura de las fibras [64-67].

El estudio de materiales y pigmentos en objetos con valor patrimonial utilizando técnicas vibracionales ha sido ampliamente abordado. El uso del FTIR como herramienta estructural para la caracterización de compuestos de síntesis ha permitido que numerosos compuestos, principalmente orgánicos, hayan sido caracterizados utilizando esta técnica, previo a que los científicos estuvieran al tanto de las implicancias de sus hallazgos en la puesta en valor de los objetos o muestras estudiadas. Mucho del trabajo con FTIR aplicado a las ciencias en conservación se recopiló en un libro de Derrick et al [68], en el que se abordan los distintos aspectos implicados en el estudio de objetos de interés patrimonial. Para la RS, sin embargo, su auge comienza con la primera base de



datos publicada por Bell et al [69] en 1997, en la que los autores dan cuenta de la utilidad de esta técnica en el estudio de objetos de valor histórico principalmente por la ventajas de la RS sobre otras técnicas. Se reconoce a Howell G. M. Edwards y Robin J. H. Clark como los pioneros en este ámbito, y actualmente existen numerosas revisiones y casos de estudio que dan cuenta de la utilidad de esta técnica en los diversos materiales que constituyen los objetos de interés cultural [69-80].

Los colorantes han sido estudiados utilizando técnicas vibracionales. Ya se cuenta con algunas bases de datos que contienen espectros tanto Raman como FTIR de colorantes sintéticos [77, 80-82], pero la enorme cantidad de compuestos de este tipo, y en muchos casos las patentes que restringen su conocimiento exacto, dificultan su identificación.

Para los colorantes naturales por otro lado, es bien sabido que las técnicas cromatográficas, en particular la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), son las más apropiadas para el estudio de este tipo de compuestos cuando están aplicados en los textiles. Esto es debido a la capacidad de este grupo de técnicas de obtener información de todos los componentes presentes en la muestra al mismo tiempo y, por lo tanto, suficiente para llegar a proponer incluso el tipo de planta utilizado. Sin embargo, metodológicamente presenta dos grandes problemas, por un lado, está la cantidad de muestra que se requiere para extraer el colorante, que puede ser desde 2 mg hacia arriba (figura 11); y, por otro lado, está el problema de su tratamiento, que implica una

gran cantidad de trabajo sólo para generar las condiciones de separación óptimas y que además necesita tratamientos de extracción. Por mucho tiempo, la metodología de extracción del colorante más utilizada ha sido en una mezcla de metanol, agua y ácido clorhídrico 37% (1:1:2 v/v/v) a 100 °C [83]; este método en particular, provoca la transformación de algunos glicones en sus respectivos aglicones, lo que sesga la información considerablemente.



**Figura 11.** Muestra de 2 mg de lana teñida.

Para mejorar esto, se han desarrollado métodos de extracción suaves basados en el uso de ácido fluorhídrico (HF), ácido fórmico (HCOOH) y etilendiamintetraacetato (EDTA) [84, 85], los que han mostrado excelentes resultados en la mantención de estos precursores y de algunos compuestos como la pseudopurpura, que fácilmente se descarboxila para formar el colorante purpurina. Más recientemente se ha logrado acoplar las metodologías de HPLC con el SERS para la identificación de colorantes de interés forense [86] y también con interés histórico [87]; sin embargo está aún en etapa de desarrollo por lo que factores como la agregación de la superficie SERS para el

contacto efectivo con los colorantes, el pH y del eluyente no permite trabajar con concentraciones menores de  $10^{-5}$  M.

La espectroscopía vibracional ha sido utilizada en la identificación de colorantes, en un primera instancia a través de FTIR [88, 89]; sin embargo las limitaciones de esta técnica en relación a la cantidad de muestra y a los tratamientos que deben utilizarse para la obtención de información desde las fibras la hace poco adecuada para establecer un uso rutinario de esta técnica. Con los avances en los espectrofotómetros FTIR, principalmente el uso de detectores más sensibles (de mercurio cadmio telurio, MCT) o de radiación de sincrotrón (SR) [90] es posible analizar superficies menores con una mejor resolución espectral.

La espectroscopía Raman encuentra su límite, al momento de la detección de colorantes, en la poca eficiencia respecto del fenómeno respecto de los procesos de fluorescencia, por la naturaleza coloreada de estos compuestos. La mayoría de los instrumentos Raman utilizan láseres en el rango visible del espectro electromagnético, por lo que no es difícil que se induzca la fluorescencia de las moléculas, que en muchos casos (incluso cuando se cumple con condiciones de resonancia) obscurecen las señales Raman bajo bandas electrónicas de mayor intensidad.

El SERS, descrito previamente, presenta otra gran ventaja, que es el apagamiento (quenching) de la fluorescencia mediante la transferencia de energía entre el estado excitado de la molécula y la superficie metálica. Este

fenómeno de apagamiento permite superar el problema de la fluorescencia en los casos en que la interacción entre el analito y la superficie ocurra a través de cualquiera de los mecanismos mencionados antes. En los últimos 10 años el SERS se ha posicionado como la técnica de preferencia por diversos grupos de investigación para la identificación de colorantes en muestras del orden de algunos micrones [91-93]. El SERS, sin embargo, no resuelve el problema de la necesidad de separar al colorante del mordiente para poder favorecer la interacción con la superficie metálica, para lo cual Leona et al han desarrollado una hidrólisis no extractiva de colorantes [94]. Este procedimiento consiste en la exposición de fibras coloreadas, o pigmentos tipo laca, a vapores de ácido fluorhídrico (HF) en un contenedor semi-cerrado para romper el complejo colorante-mordiente. Este procedimiento ha resultado muy exitoso y ha sido adoptado por diversos grupos para la identificación del colorante liberado después de la hidrólisis; sin embargo, además de mencionar lo peligroso que puede resultar la manipulación del HF no se proponen alternativas menos corrosivas.

Como se mencionó antes, la ruptura del complejo entre el mordiente (metal) y el colorante es necesaria para que se verifique la interacción colorante/superficie metálica y así obtener del espectro SERS. Este tipo de interacción ha sido poco estudiada y la literatura al respecto es escasa y antigua. El principal modelo de interacción corresponde a la formación de un compuesto de coordinación entre el metal y alguna porción dentro de la

estructura de la molécula colorante capaz de formar un tautómero ceto-enol, como bien describieron Kiel y Heertjes en 1963 [95].

Sobre la base de todo lo anterior se propone en esta tesis el estudio de las interacciones presentes en las fibras teñidas desde un punto de vista del análisis vibracional para aportar en la correcta identificación e interpretación de colorantes naturales en objetos con valor cultural.

## **2.6. Hipótesis**

Sobre la base de datos vibracionales, y utilizando procedimientos experimentales adecuados, será posible identificar colorantes, o mezclas de colorantes presentes en una muestra de fibra de tamaño mínimo. La caracterización vibracional de fibras teñidas mordentadas permitirá inferir acerca de la naturaleza de la interacción entre fibra, mordiente y colorante. Esta información permitirá complementar los contextos de los que provienen los textiles y aumentar el conocimiento respecto de la tecnología utilizada en la tinción de los textiles.

## **2.7. Objetivos**

### *2.7.1. Objetivos generales*

Caracterizar la influencia del metal utilizado en la respuesta vibracional y vibracional amplificada de fibras teñidas en el laboratorio y de fibras provenientes de textiles arqueológicos e históricos. Evaluar las metodologías de análisis y proponer una que resulte mínimamente invasiva para la identificación de colorantes en fibras. Identificar vibracionalmente problemáticas de conservación de fibras asociados a la presencia de metales.

### *2.7.2. Objetivos específicos*

- Obtención y caracterización de superficies SERS activas, sólidas y coloidales.
- Obtención de los espectros electrónicos, Raman y SERS de colorantes.
- Obtención de los espectros Raman y SERS de complejos metálicos de colorantes.
- Obtención de los espectros Raman y SERS de soportes proteicos, como lana y seda, y de algunos de sus péptidos motivos estructurales.
- Obtención de los espectros Raman y SERS de soportes proteicos tratados con sales metálicas.
- Obtención de los espectros Raman y SERS de fibras proteicas teñidas con colorantes puros y mezclas de colorantes conocidas y con extractos vegetales acuosos de especies utilizadas históricamente, con y sin mordiente.
- Obtención de los espectros Raman y SERS de fibras provenientes de textiles arqueológicos con contextos conocidos.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Reactivos y muestras**

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o Merck y fueron usados sin purificaciones posteriores. El agua utilizada para lavado es destilada y para preparar soluciones es ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega/ 0,055 \text{ }\mu\text{S/cm}$ ). En el caso de los colorantes, fueron utilizadas soluciones stock  $10^{-3} \text{ M}$  en etanol y en solución acuosa alcalina. Todas las muestras históricas de seda fueron proporcionadas por el Departamento de Textiles del Museo Histórico Nacional.

#### **3.2. Preparación de superficies**

Los sustratos SERS de oro, Klarite (Renishaw), fueron proporcionados por la Dra. Aline Percot de la Universidad de Paris VI. Las superficies coloidales se prepararon utilizando los métodos descritos por Lee-Meisel [49] y por Leopold y Lendl [50]. En el primero, una solución  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  de  $\text{AgNO}_3$  es calentada utilizando un sistema de reflujo y con agitación constante, cuando alcanza la ebullición se agrega 1 ml de una solución 1% de citrato de sodio, para reducir la plata, y se deja con agitación y temperatura por 60 minutos. Para el caso de la segunda preparación, sobre una solución  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  de  $\text{AgNO}_3$  se añade rápidamente una mezcla de 5 ml de una solución 0,06 M de clorhidrato de hidroxilamina con 4,5 ml de  $\text{NaOH}$  0,1 M. Sustratos de cobre fueron preparados lijando una superficie de cobre con una lija fina y luego aplicando una solución 1:1 de ácido nítrico (70%) en agua por 1 minuto, luego se lava la

superficie con agua ultrapura y se aplica el analito; opcionalmente se adiciona una solución de  $\text{AgNO}_3$  de distintas concentraciones para retardar la oxidación del cobre.

### **3.3. Medidas UV-Visible**

Los espectros en la región UV-Visible de las soluciones coloidales y de colorantes fueron registrados en un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-1800 utilizando celdas de cuarzo 1 cm de paso óptico, los colorantes fueron disueltos en etanol para asegurar la disolución completa y obtener concentraciones en torno a  $10^{-4}$  M. Para los espectros en sólido se utilizó sulfato de bario como blanco para medir la reflectancia difusa en un instrumento Shimadzu UV3101PC. Los espectros obtenidos se convirtieron matemáticamente a espectros de absorción utilizando la ecuación de Kubelka-Munk [96] que relaciona la reflectancia difusa con la absorbancia.

### **3.4. Medidas FTIR**

Las medidas de FTIR han sido realizadas utilizando diversos instrumentos con accesorios para ATR y transmisión. Los equipos son: espectrómetro FTIR Bruker EQUINOX 55 con el microscopio IR Scope que utiliza una micropunta de Ge con reflexión única y detector MCT refrigerado con nitrógeno líquido, espectrómetro FTIR Bruker alpha con un módulo ATR con cristal de diamante y detector DTGS, y un espectrómetro Thermo Nicolet iZ10 con ventana ATR de Ge y iN10, ambos con detector DTGS. Las medidas



utilizando diamante se realizaron entre 370 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que con Ge solo es posible observar hasta 680  $\text{cm}^{-1}$  en la zona del IR medio.

### **3.5. Medidas Raman y SERS**

Todas las medidas Raman se han realizado utilizando energías bajo 5 mW sobre la muestra, a excepción de las muestras de seda. En este trabajo se han utilizado diversos instrumentos con diversas longitudes de onda de excitación láser. Los equipos y líneas láser utilizados son: Renishaw System 2000 (458, 514, 633 y 785 nm), Renishaw InVia Reflex (633 y 785 nm), Horiba LabRam HR800 (458 nm), Bruker FRS-100/s (1064 nm) y Jovin Yvon T64000 (488 nm).

Las mediciones SERS han sido realizadas siempre después que el solvente se evaporara por completo (SERS en seco), independiente del tipo de muestra. Antes de utilizar las superficies coloidales se toma su espectro Raman para comprobar que no está contaminado.

### **3.6. Preparación de complejos**

Los complejos metálicos fueron preparados adaptando la metodología propuesta por Sanyova [84]; esta consiste en suspender 120 mg del colorante en agua por sonicación (10 minutos) y agitación utilizando una barra magnética (10 minutos), para luego añadir 25 ml de una solución 94,878 g/L de sulfato hidratado de aluminio y potasio ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) a 90°C. Una vez que el pH se estabiliza, se agregó carbonato de potasio 0,1 M hasta neutralizar la

solución. Una vez formado el complejo, se filtró utilizando una membrana con poros de 50  $\mu\text{m}$ . Este método es equivalente para Az, Pu y para el extracto acuoso de cochinilla (*Dactylopius coccus*). En esta síntesis, el aluminio se encuentra en una relación 10 a 1 con respecto al colorante y en ambos casos el resultado es un sólido rojo oscuro. Se realizó el mismo procedimiento, pero utilizando hierro en lugar de aluminio en las mismas proporciones y el resultado es un sólido de color marrón. Se realizó además la síntesis propuesta por Grazia et al [97], que consiste en la adición de una solución 0,2 M de sulfato hidratado de aluminio y potasio a una solución 0,002 M de Az a pH 10. Adicionalmente a los lavados con agua desionizada se dio un lavado con etanol para arrastrar cualquier resto de colorante que quedase sin reaccionar.

### **3.7. Preparación de las muestras de seda**

Las muestras de seda se prepararon de dos formas distintas de acuerdo al enfoque del estudio. Por un lado, estuvo la preparación de las sedas para evaluar su interacción con sales metálicas y por el otro su tinción con mordientes.

#### **3.7.1. Desgomado**

En ambos casos el material de partida es seda cruda (CS) obtenida al desfibrar un capullo del gusano de la seda (*Bombyx mori*). Para la interacción los procedimientos son los siguientes. La sericina de la muestra de seda obtenida del capullo se eliminó usando una solución con 4 g/L de jabón neutro y

1 g/L de carbonato de sodio y manteniendo el pH en el rango de 8,5 a 10. La relación de la solución de desgomado con respecto a la seda fue 30 a 1 en masa. Partiendo de esta solución se intentaron dos métodos de desgomado, el primero (D1) con el pH fijo en 10 y en ebullición por 1 hora, mientras que el segundo (D2) se llevó a cabo a pH 8,5 a 85 °C por 2 horas. El producto final en ambos casos se lavó con agua hirviendo por 15 minutos antes de un lavado final con agua a temperatura ambiente.

### 3.7.2. *Pesado*

Los procesos de pesado se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos propuestos por Garside et al [98] [10]; a partir de una seda blanca sin pesar (UWS), Pongée 7 de Francia. Para el pesado tipo rosado (PW) la seda se deposita en un baño de una solución acuosa de  $\text{SnClO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  a pH1 por 6 horas a temperatura ambiente; luego la seda se cambia a un baño de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  a pH 10 por una hora a 60 °C. Este proceso se repite 2 veces. El pesado tipo Neuhaus, o estaño-fosfato-silicato (dinamita I), se llevó a cabo igual que el proceso rosado, pero con adición sucesiva de baños de fosfato finalizando con un baño de silicato. El proceso dinamita II sigue el mismo procedimiento del proceso dinamita I, pero incluye, la adición de soluciones acuosas de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  entre los baños de fosfato y silicato, y antes del baño de silicato final. Para el procedimiento con taninos, antes de la aplicación la seda es parcialmente humectada con HCl diluido para luego ser introducida en una solución de ácido gálico por una hora a 85 °C. Finalmente, la seda se mantiene durante una hora

a 85 °C en un baño compuesto con  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , ácido acético y hierro metálico.

### 3.7.3. Teñido

Para la muestra de seda negra teñida con el colorante Negro Reactivo 5, una muestra de seda desgomada se sumergió en un baño de colorante 5,5 M en presencia de NaCl como electrolito.

Para las muestras de seda teñidas con alizarina, el desgomado se realizó sumergiendo una masa conocida de capullos de seda en una solución 0,5% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en una relación 1:20 y manteniendo en ebullición por 30 minutos; luego se lavó con agua desionizada y se repitió el proceso [99]. La seda desgomada se dejó secar a 105 °C por 2 horas y luego se masó para estimar el porcentaje de masa perdido. El mordentado se llevó a cabo manteniendo 80 mg de seda en ebullición en un sistema de reflujo por 45 minutos en una solución 2 g/L de alumbre ( $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ); después de esto, la seda mordentada se lavó con abundante agua desionizada y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad durante 24 horas. La seda mordentada se teñió en un baño que contenía 1g de colorante por 20 L de agua en un sistema de reflujo durante 1,5 horas. Después de teñidas las fibras se lavaron con abundante agua destilada y con un enjuague final de metanol/agua (1:1) para eliminar cualquier rastro del colorante no fijado a la fibra.

### **3.8. Extracción de colorantes**

La extracción de colorantes se ha realizado utilizando la metodología descrita por Leona et al [94], que consiste en exponer las muestras a vapores de ácido fluorhídrico (HF) en viales de plástico semi-cerrados por periodos de tiempo entre 30 y 60 minutos seguidos por un tiempo equivalente de ventilación. Adicionalmente al HF, se realizó el mismo procedimiento con ácido fórmico (HCOOH). Seguido el proceso de ventilación las muestras son analizadas por la metodología SERS en seco (Ver punto 3.5.).

### **3.9. Espectrometría de Masas por MALDI/LDI-ToF**

La adquisición de espectros de masas con la técnica de MALDI/ToF-MS (sigla del inglés Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) se realizó en un equipo MALDI-ToF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo y modo ion negativo mediante detección por reflexión. La ionización se realizó aplicando pulsos de láser de N<sub>2</sub> (337 nm) sobre la muestra en diferentes puntos al azar de cada muestra depositada en la placa porta muestra. Se obtuvieron espectros de las muestras con y sin matriz. Las matrices utilizadas corresponden a 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol (CMBT) preparada a una concentración de 10 mg/mL en metanol y ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) preparada a una concentración de 10 mg/mL en ácido fórmico 0,1% v/v e isopropanol. En ambos casos se depositó 1  $\mu$ L de una mezcla de 6  $\mu$ L de analito con 6  $\mu$ L de matriz en una placa porta muestra de

acero inoxidable. Las muestras preparadas en dimetilsulfóxido demoraron 1 semana en cristalizar.

### **3.10. Microscopía electrónica de barrido**

La caracterización elemental de las muestras de seda pesada se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) LEO 1420 de presión variable (Electron Microscopy Ltd., Inglaterra) acoplado a una sonda de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS).

### **3.11. Espectroscopía de microfluorescencia de rayos X ( $\mu$ -XRF)**

Para las muestras de seda mordentadas con aluminio y teñidas con alizarina se realizó un mapeo elemental. La medición de los espectros de microfluorescencia de rayos X se realizó en un instrumento Tornado M4 (Bruker Nano GmbH, Alemania). El equipo cuenta con un tubo con ánodo de rodio que opera desde 50 keV con una corriente máxima de 700  $\mu$ A y con un colimador policapilar que genera un rayo X de excitación de hasta 25  $\mu$ m. El mapeo se consiguió graficando la intensidad de la señal  $K_{\alpha}$  del aluminio.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Superficies activas en SERS

#### 4.1.1. Superficies de cobre

El cobre al igual que la plata y el oro presenta una resonancia del plasmón de superficie en la parte visible del espectro electromagnético, en torno a 675 nm [100] y que al igual que el oro y la plata puede ser modulado modificando el tamaño y la forma de las nano partículas. En particular, se ha reportado que la formación del óxido de cobre en la superficie genera desplazamientos batocrómicos en el plasmón [100]. Las superficies de cobre preparadas de acuerdo al método descrito en el punto 3.2 fueron caracterizadas utilizando microscopía electrónica de barrido para observar y registrar morfológicamente los sitios activos producidos por el tratamiento con ácido nítrico. Se encontró que el ácido nítrico produce diferentes tipos de rugosidades en escala nanométrica que son capaces de producir amplificaciones en la intensidad de las señales Raman (figura 12). Es posible también observar la formación de nanopartículas de plata sobre la superficie de cobre, y que su concentración y tamaño aumenta con la concentración de nitrato de plata. La formación de sitios activos en SERS utilizando esta metodología resulta aleatoria y carece de control sobre la geometría del sitio generado. Esto puede provocar discrepancias en los resultados obtenidos cuando se comparan con la literatura principalmente debido a que la orientación de la molécula sobre la

superficie es un factor importante a considerar cuando se observa amplificación en el espectro. Sin embargo, el espectro SERS, experimentalmente (a menos que se trabaje a muy bajas concentraciones), es un promedio de un estado particular en el área de medición. El resultado obtenido es la contribución de muchas orientaciones posibles al mismo tiempo, es por esto que los grupos más cercanos a la superficie son aquellos que aportan más al espectro resultante, esto es siempre que cumplan con las reglas de selección SERS (mayor amplificación de los modos perpendiculares a la superficie)[101].

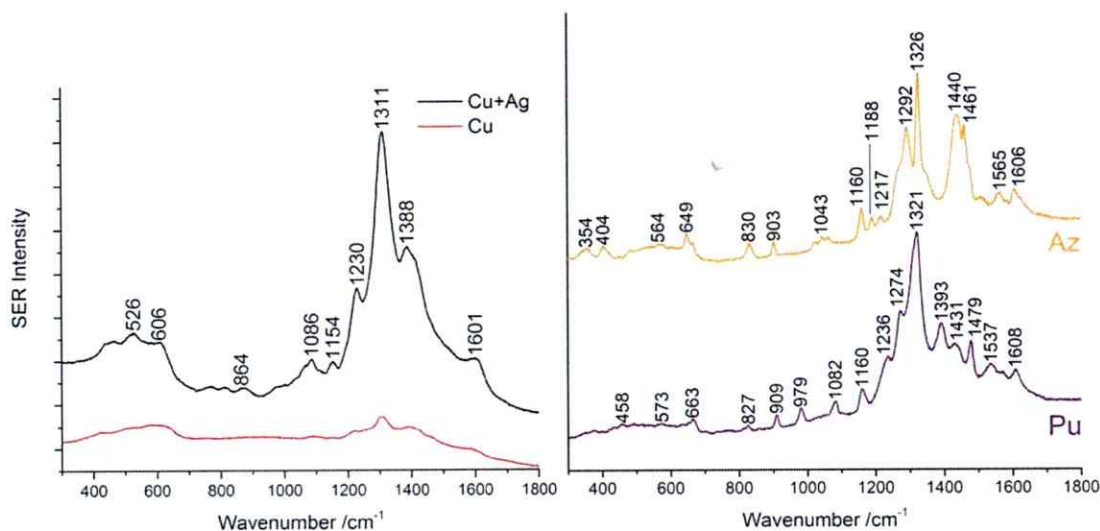


**Figura 12.** Microfotografía de la superficie de cobre tratada con ácido nítrico y recubierta con una solución de nitrato de plata 1 mM (izquierda) y 17 mM (derecha).

La actividad de las superficies fue chequeada utilizando soluciones  $\sim 10^{-5}$  M de Az, Pu y ácido carmínico (CA). Se encontró que la aparición de las señales asociadas a la oxidación del cobre (ca.  $526$  y  $614$   $\text{cm}^{-1}$ ) no se ven inhibidas por la presencia de la plata; sin embargo, la adición de plata genera una mejora en la intensidad de las señales de los distintos analitos. En la Figura 13 se puede observar que el espectro SERS del CA sobre la superficie de cobre



con plata (17 mM) presenta una mayor intensidad. En términos prácticos, la obtención de espectros SERS utilizando este tipo de superficies ofrece una alternativa viable considerando el costo/beneficio del sistema.

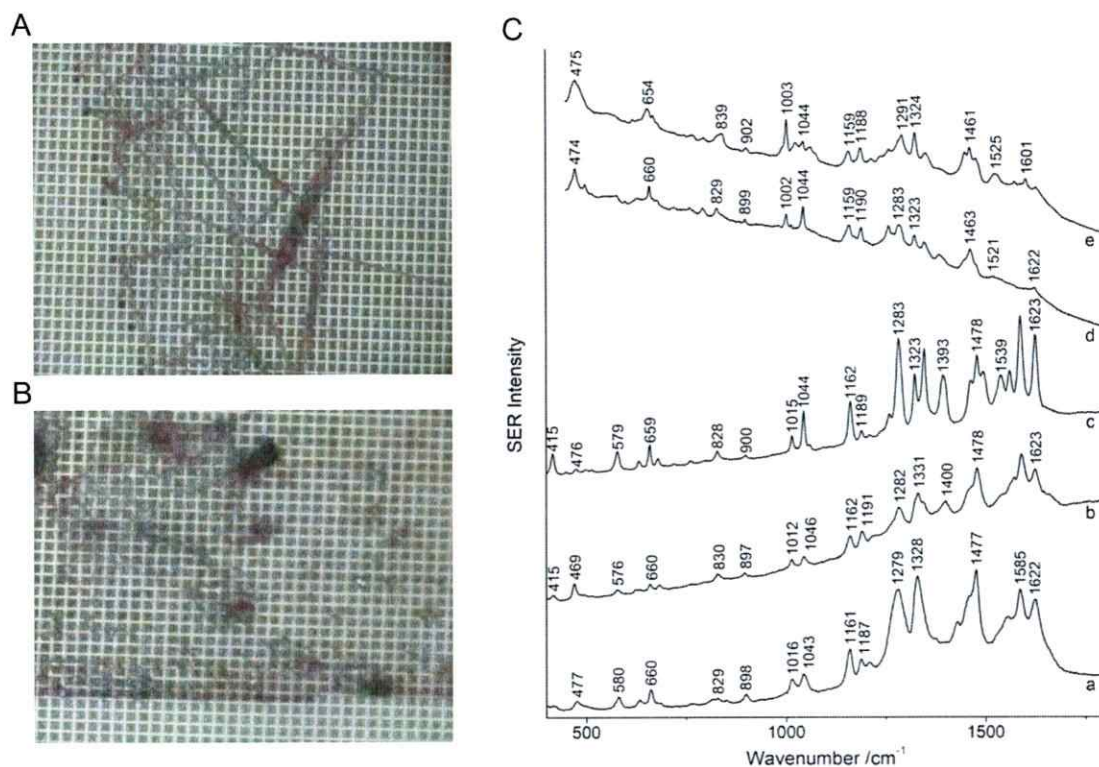


**Figura 13.** Espectros SERS del ácido carmínico (CA) (izquierda) y de alizarina (Az) y purpurina (Pu) (derecha) sobre una superficie de cobre tratada con ácido nítrico. En la figura de la izquierda se muestra la diferencia en intensidad al añadir una solución de nitrato de plata (negro) y sin adición de plata (rojo).

#### 4.1.2. Superficie de oro

El uso de superficies comerciales con actividad SERS ha sido poco estudiado en términos generales. La mayoría de los fabricantes de instrumentos Raman ofrecen u ofrecían sustratos SERS para ahorrar el paso de la fabricación de la superficie. Esto sin duda es una ventaja en términos del tiempo necesario para realizar un experimento; sin embargo, estas superficies presentan algunas desventajas que hacen que su uso sea al menos considerado con más detención. Lo primero que se puede argumentar es el

elevado costo de estas superficies de acuerdo al método de síntesis utilizado en la fabricación, luego el tiempo de almacenaje es limitado y la reutilización de una misma superficie no está recomendada. En este trabajo se utilizó una superficie de oro Klarite de Renishaw fabricada con la metodología arriba-abajo, la que consiste en la fabricación de sitios activos a partir de estructuras más grandes. La superficie en este caso corresponde a pirámides invertidas de 1,5  $\mu\text{m}$  grabadas en oro con rugosidades de hasta 20 nm.



**Figura 14.** A) Superficie klarite con Az a pH 8,2 y B) a pH 10,7; C) comparación de los mejores espectros obtenidos mapeando las superficies de A y B en las siguientes condiciones: a) SERS Az-Ag 458 nm pH 8,2; b) SERS Az-Klarite 458 nm pH 8,2; c) SERS Az-Klarite 458 nm pH 10,7; d) SERS Az-Klarite 785 nm pH 8,2 y e) SERS Az-Klarite 785 nm pH 10,7.

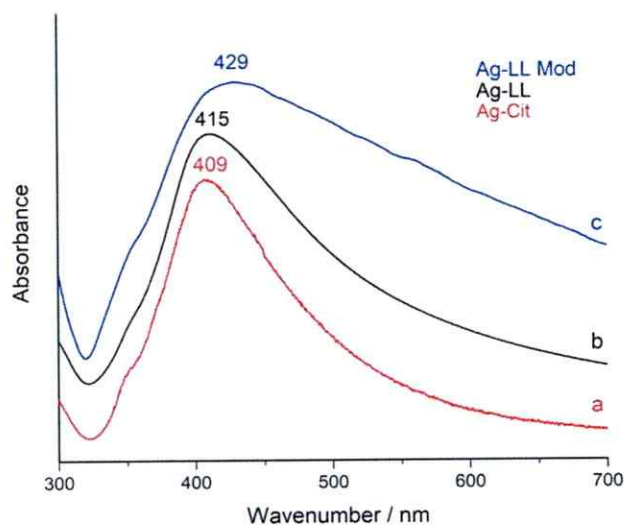
Debido a la geometría de la superficie Klarite la obtención de los espectros se llevó a cabo a través de mapeos espectrales en la superficie a pH controlado de la solución de colorante (figura 14). Se observó en los mapeos a pH 8,2 la formación de cristales de Az sobre la superficie, mientras que a pH 10,7 se observaron acumulaciones de colorante en las pirámides de la superficie. A pH 10,7 se obtuvo una mejor resolución espectral usando la superficie Klarite. Esto puede deberse a que a pH 10,7 la molécula de colorante se encuentra mayormente desprotonada y disuelta en mayor proporción por lo que alcanzar estos intersticios resulta más fácil. La notable mejoría en la resolución espectral observada en el caso de la superficie Klarite, con respecto a las NPs de plata, puede explicarse además por el hecho que la homogeneidad de la superficie de oro forzaría un orden de las moléculas propiciando la amplificación de modos que en regímenes más desordenados quedan en menor proporción.

#### *4.1.3. Superficies coloidales*

Las superficies coloidales preparadas de acuerdo al punto 3.2 corresponden a nanopartículas de plata en suspensión (Ag-NPs). Las distintas síntesis de estas nanopartículas consisten en la reducción de plata en solución con agentes reductores como hidroxilamina, citrato o borohidruro. Las nanopartículas de platas producidas utilizando una metodología modificada de la propuesta por Leopold y Lendl [102] no mostró los resultados esperados. Utilizando la metodología en seco con estas NPs no fue posible obtener

reproducibilidad ni aumento en la intensidad de los espectros obtenidos, a pesar que en solución se ha reportado excelentes resultados. Esto puede deberse a que en solución el potencial zeta juega un rol importante en la interacción del analito con el metal, mientras que en la metodología en seco esto se reduce pues la interacción se ve forzada al remover el solvente.

De acuerdo a la figura 15, las Ag-NPs sintetizadas con el método de Lee-Meisel (Ag-Cit) [49] muestran una menor distribución de tamaños que las NPs sintetizadas de acuerdo a Leopold-Lendl (Ag-LL) [50] y a Garrido (Ag-LL Mod) [102], lo que se denota por una menor intensidad en la absorción hacia longitudes de onda mayores. Esto resulta beneficioso para la metodología en seco puesto que al depositarse las nanopartículas éstas generarán rugosidades más uniformes y por lo tanto mayor reproducibilidad.



**Figura 15.** Espectros de absorción para distintos sistemas coloidales de plata, reducida citrato (a), hidroxilamina (b) e hidroxilamina en menor concentración (c).

En resumen, y considerando la mayor conveniencia para este trabajo de tesis, de acuerdo al tipo de muestra y al tipo de analito, las Ag-NPs sintetizadas por el método de Lee-Meisel (Ag-Cit) serán las elegidas para estudiar los sistemas propuestos.

## 4.2. Fibras

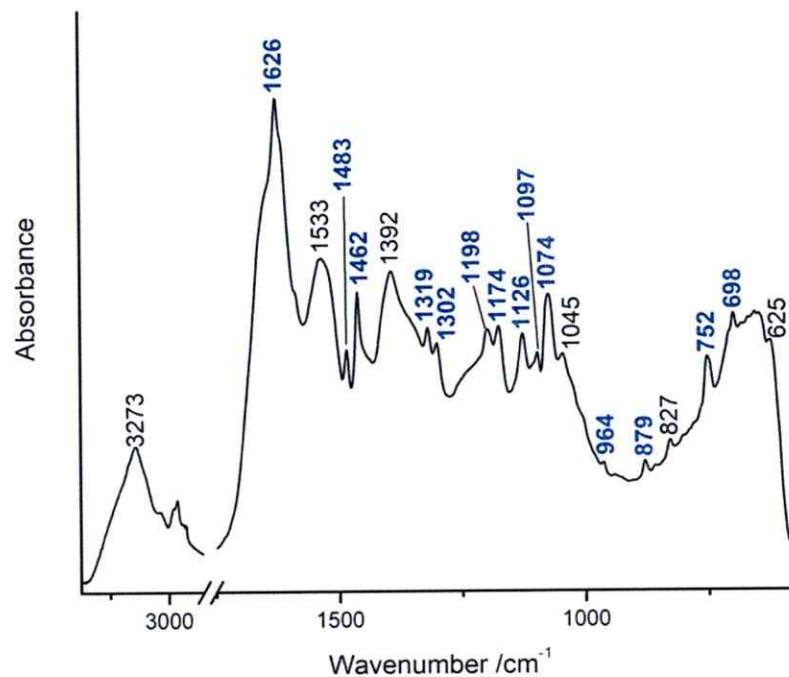
Las fibras seleccionadas fueron estudiadas usando las técnicas IR y Raman. En general, se han estudiado las fibras de origen proteico provenientes de camélidos que se pueden encontrar en algunos países de América del Sur, como la vicuña, alpaca, guanaco y llama. La caracterización de estas fibras es compleja, debido a que las características microscópicas de los pelos tomados de una parte del cuerpo de una especie pueden tener una morfología idéntica a la de otra especie en otra parte del cuerpo o incluso a la de otro animal de distinta edad (de la misma u otra especie). En la actualidad, la hibridación de estas especies también dificulta la caracterización en términos de ADN antiguo, en el que solo se cuenta con un registro parcial de los genes que podrían relevar características específicas de cada camélido.

Se pudo establecer que la espectroscopía Raman con excitación en el rango que va del visible al infrarrojo no es la más adecuada para el estudio de este tipo de fibras. Esto se debe a la elevada fluorescencia que presentan las fibras, fenómeno que se incrementa cuando se encuentran teñidas; en efecto, los colorantes contribuyen a su fluorescencia intrínseca.

El ATR-IR, en cambio, ha demostrado ser útil como técnica discriminatoria para reconocer la naturaleza proteica o celulósica en un primer examen. Con ATR-IR se ha llegado incluso a la identificación del colorante índigo en la fibra (figura 16) sin necesidad de realizar más experimentos. Las características de la formación de este colorante en el proceso de teñido (como



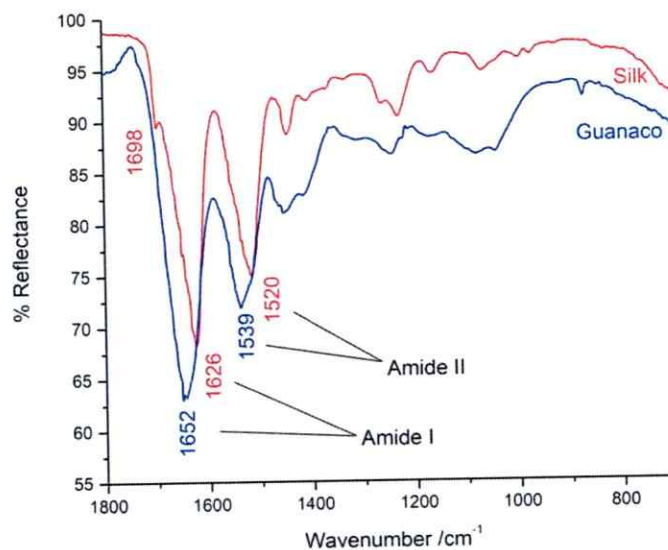
se mencionó en la introducción), permiten su identificación incluso por sobre las señales de la lana.



**Figura 16.** Espectro ATR-IR de una muestra de fibra arqueológica azul del sitio Taira A-16. Las bandas marcadas en azul corresponden a las señales características de índigo.

En vista al estudio vibracional de las interacciones entre las distintas partes que componen una fibra teñida, el uso de una fibra que no permita obtener espectros lo suficientemente resueltos como para extraer información de ellos dificulta abordar los objetivos propuestos. Es por esto que se consideró la seda como fibra proteica modelo. Esta decisión se toma sobre la base de la respuesta vibracional de este tipo de fibras y que, al tratarse de una proteína, se podrían esperar interacciones al menos similares entre metales y colorantes con las proteínas.

Se logró establecer la diferencia espectral en ambas proteínas surgida principalmente por las estructuras secundarias predominantes en cada una de ellas. En el caso de la lana las estructuras dominantes son las hélices alfa, las que hacen que la banda correspondiente al enlace amida I aparezca en torno a  $1652\text{ cm}^{-1}$ ; para las muestras de los distintos camélidos no se observan diferencias a excepción de unos cambios leves de intensidad. La fibroína posee porciones cristalinas de hojas beta antiparalelas que pueden ser distinguidas en el IR por la banda amida I en torno a  $1626\text{ cm}^{-1}$  y por su banda secundaria a  $1698\text{ cm}^{-1}$  (figura 17) [103].



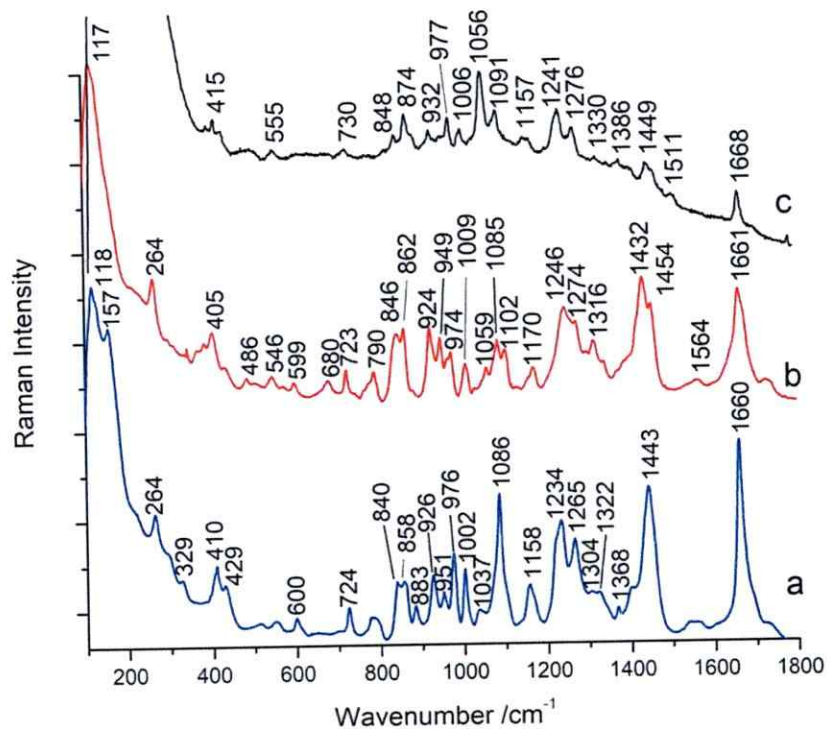
**Figura 17.** Espectros ATR-IR de fibras de seda (rojo) y guanaco (azul) sobre ERI de Ge.

#### 4.2.1. Espectros Raman, FT-Raman y SERS del péptido motivo GAGAGS

Para estudiar vibracionalmente la seda se decidió comenzar con la caracterización de su péptido motivo el hexapéptido GAGAGS (G glicina, A



alanina, S serina). La asignación espectral Raman del GAGAGS (tabla 1) se basa en trabajos previos relativos a péptidos [104, 105] y aminoácidos [106, 107]. Las tres bandas Raman a 1660, 1234 y 926  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a los modos amida I, amida III y modos esqueléticos, respectivamente (figura 18a). La posición en las frecuencias de estas señales y el hecho que varias bandas presenten una composición doble o son asimétricas es consistente con al menos dos tipos de estructuras terciarias coexistentes, láminas  $\beta$  y ovillo aleatorio o conformaciones tipo  $\alpha$ -hélice [108].



**Figura 18.** Espectro Raman del péptido GAGAGS a baja temperatura (a) (12°C), a temperatura ambiente (25°C) (b) y espectro SERS del péptido GAGAGS.

La banda ancha y muy débil, a 1539  $\text{cm}^{-1}$  contiene probablemente información sobre los grupos carboxilato y amino. Las bandas a 1443 y 1265

$\text{cm}^{-1}$  se asignan a modos de deformación de  $\text{CH}_2$  de los componentes serina y alanina. Una banda doble muy débil a aproximadamente  $1304$  y  $1322 \text{ cm}^{-1}$  se atribuye a deformaciones de  $\text{CH}$  de los residuos laterales de serina y glicina. La banda a  $1158 \text{ cm}^{-1}$  es probablemente una vibración acoplada que implica los modos  $\nu\text{CC}$  y  $\nu\text{C-OH}$ , siendo el último atribuido a la cadena lateral de la serina. La banda media a fuerte a  $1086 \text{ cm}^{-1}$  es un ovillo aleatorio ( $\nu\text{CC}$ ) del esqueleto (estructura secundaria) y también un modo de hoja  $\beta$ , siguiendo a Monti et al [63, 109]. Se observó una disminución de la intensidad de la banda a  $1086 \text{ cm}^{-1}$  junto con la aparición de la banda de  $1102 \text{ cm}^{-1}$  aumentando la temperatura (figura 18b); el perfil espectral Raman de GAGAGS a temperatura ambiente sugiere que podrían coexistir diferentes conformaciones. El aumento de la temperatura induce cambios espectrales principalmente relacionados con el aumento del ancho de banda, cambios en los números de onda y modificaciones en la intensidad de las bandas, todo sugiriendo cambios conformacionales y/o un aumento de especies conformacionales coexistentes. Siguiendo a Martel et al [110] proponemos una hoja  $\beta$  cristalina a la transición conformacional  $\alpha$ -helicoidal para el cambio observado en la estructura del GAGAGS al aumentar la temperatura [111]. Así, el efecto de aumento de la temperatura induce una pérdida de cristalinidad de la muestra. Sin embargo, sólo la banda de amida III se desplaza a los números de onda más altos como se esperaría para una transición de  $\beta$ -hoja a  $\alpha$ -hélice de transición [108]. Se observa otro modo  $\nu\text{C-OH}$  de la cadena lateral de la serina a  $1002 \text{ cm}^{-1}$ .

**Tabla 1. Asignación espectral Raman y SERS del péptido GAGAGS y FTIR, Raman y SERS de la seda entre 200 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  a temperatura ambiente.**

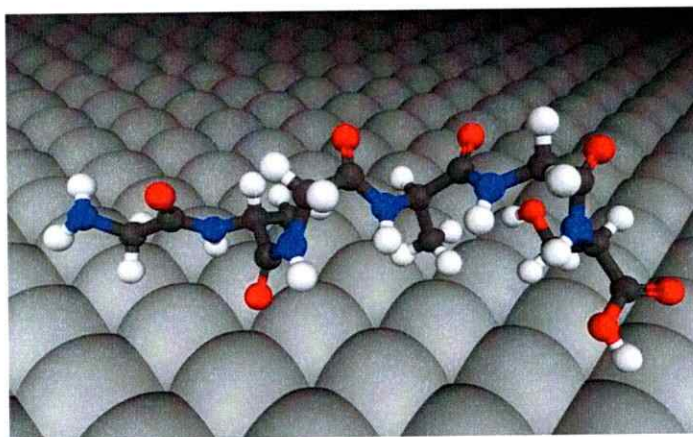
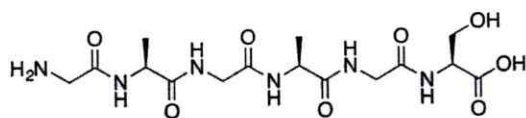
GAGAGS		Seda			Asignación
Raman	SERS	Raman	SERS	ATR-IR	
1661 s	1668 m	1665 s	1651 m	1617 s	Amida I
		1615 w			Tyr
1564 vw b					COOH + NH <sub>2</sub>
	1511 w b			1511 s	Amida II, vCC, $\delta$ CH, Tyr
1454 sh	1449 m d	1451 m	1432 sh	1440 w	CH <sub>2</sub> def. (Ala, Ser)
1432 s				1403 vw	CH <sub>2</sub> def. (Ala, Ser)
1368 vw	1386 w	1403 w	1398 s		vCOOH (Ala, Ser)
				1335 vw	vCH <sub>3</sub>
1316 w			1297 w		Ser, Gly, CH def.
1274 sh	1276 m	1266 w sh	1265 vw		CH <sub>2</sub> def. (Ala, Ser)
1246 m	1241 ms	1229 ms	1230 vw	1227 m	Amida III
1170 m	1156 w b	1160 w	1159 vw		vCOH Ser, Tyr
				1162 w	vCN, $\delta$ CH, Ala-Gly
			1125 m		vCC alif.
1102 sh	1091 m	1085 s	1090 m	1063 w	vCC esquel.
1085 m					vCC esquel.
1059 vw	1056 s		1025 vw		vCC alif., Ser
1009 wm	1006 w	1004 w			vC-OH Ser
974 w	977 m	979 w			$\rho$ CH
949 w					$\rho$ CH <sub>3</sub>
924 wm	932 w		924 ms		Esquel.
	874 m	882 w	887 w		$\rho$ CH
862 m	848 w	853 w			vCC, vCN, Tyr (seda)
840 m		828 w			vCC, Ser, Tyr (seda)
790 w b		759 vw			CH <sub>2</sub> def. Ala
723 w	730 w		706 w b		CH <sub>2</sub> def. Ala
680 w		643 vw			$\omega$ NH <sub>2</sub>
599 w				605	Amida IV
546 vw	555 w	558 m b		540 vw	CCN def.
		425 vw	432 vw	422 m	$\delta$ CCH, $\delta$ CCN
405 m	415 w				$\delta$ CCH, $\delta$ CCN
264 wm		296 vw	281 m b		$\delta$ CCC, $\delta$ CCN

Intensidad relativa: s, fuerte; sh, hombro; m, media; w, débil; vw, muy débil; b, ancha; d, doble.  
 Nomenclatura: Ser, serina; Gly, glicina; Ala, alanina; Tyr, tirosina; def., deformación; esquel., modo esquelético; alif, alifático.

En el espectro Raman a baja temperatura (figura 18a), las bandas de intensidad media y débil a 976 y 883  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, se les asigna un modo de balanceo  $\rho\text{CH}$ . La banda débil a 951  $\text{cm}^{-1}$  es un modo de oscilación del grupo  $\text{CH}_3$  de la alanina. El doblete a aproximadamente 858  $\text{cm}^{-1}$  contiene información de los modos  $\nu\text{CC}$  y  $\nu\text{CN}$ . Las bandas débiles a 724  $\text{cm}^{-1}$  y a aproximadamente 795  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a los modos de deformación del grupo  $\text{CH}_2$  en la alanina. La banda débil a 600  $\text{cm}^{-1}$  podría atribuirse a un modo amida IV. Las bandas a 429 y 410  $\text{cm}^{-1}$  están asignadas a los modos  $\delta\text{CCH}$  y  $\delta\text{CCN}$ . Los grupos alquilo con OH y grupos funcionales NH están probablemente en zonas del espectro menores que 300  $\text{cm}^{-1}$ .

Al realizar el SERS, se observaron varios cambios espectrales por efecto de la superficie (figura 18c). Las bandas típicas atribuidas a los modos amida I, III y esquelético a 1661, 1246 y 924  $\text{cm}^{-1}$  en Raman a temperatura ambiente, cambian en el espectro SERS a 1668, 1241 y 932  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. La intensidad relativa de las bandas también cambia. Este comportamiento espectral es consistente con modificaciones de tipo conformacional. El perfil general sugiere que la superficie induce una conformación de ovillo aleatorio. Las dos bandas a 1432 y 1274  $\text{cm}^{-1}$ , atribuidas a modos de deformación de CH en la serina y alanina, muestran un comportamiento espectral altamente consistente con la interacción del péptido con la superficie metálica. La banda a 1059  $\text{cm}^{-1}$ , adscrita a la serina y estiramientos CC alifáticos, aumenta notoriamente su intensidad y se desplaza a 1056  $\text{cm}^{-1}$ ; también se observan

cambios espectrales para la banda de serina esquelética a aproximadamente  $846\text{ cm}^{-1}$ . Los cálculos teóricos predicen que la molécula de GAGAGS adopta una conformación casi extendida en el nivel de superficie de Ag como se muestra en la figura 19. Aceptando esto, y sobre la base de las reglas de selección SERS [56] y que la línea láser es perpendicular a la superficie metálica, se explicaría el aumento en la intensidad relativa de la banda del fragmento alifático CC de la serina a  $1059\text{ cm}^{-1}$ , el que se observa en el espectro SERS a  $1056\text{ cm}^{-1}$ . Por lo tanto, la conformación propuesta estaría de acuerdo con los cambios espectrales observados en el espectro SERS.



**Figura 19.** Péptido motivo de la porción cristalina de la seda (GAGAGS) y su orientación sobre una superficie de plata.

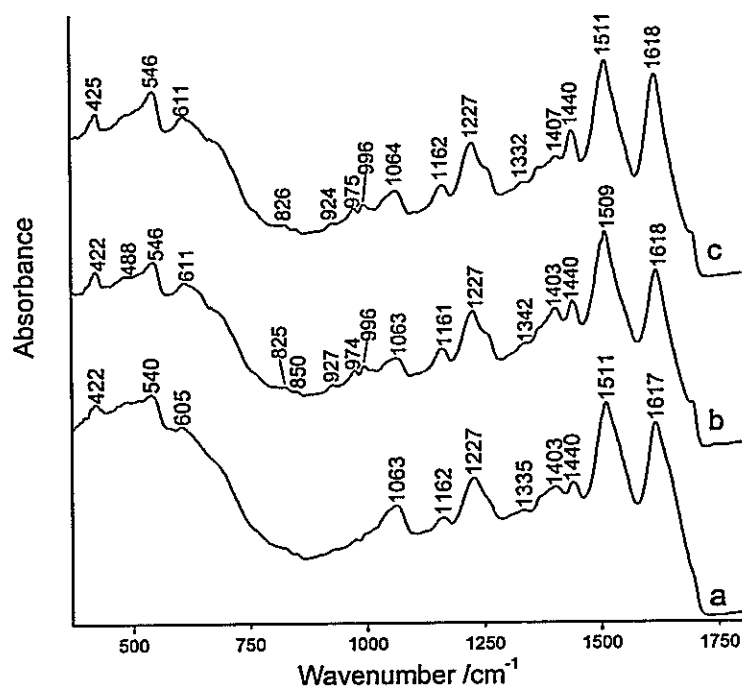
#### 4.2.2. Espectros ATR-IR, Raman, FT-Raman y SERS de la seda

La secuencia GAGAGS está altamente expresada en la fibroína del capullo. El espectro Raman de la seda cruda (CS), tiene muchas similitudes con

el perfil espectral del péptido GAGAGS, que corresponde a la porción cristalina que domina el espectro [111]. Las diferencias, debido principalmente a la variación de intensidad de bandas y cambios de número de onda, se atribuyen a que las estructuras secundarias predominan en el espectro. El perfil espectral de la sericina muestra bandas anchas y no es muy diferente de la fibroína [112]; en el espectro de seda cruda observado no es posible identificar claramente las bandas de sericina. Algunas bandas en el espectro ATR-IR del sólido en la solución de desgomado a 1651, 1234 y 1069  $\text{cm}^{-1}$  y en FT-Raman a 1656 y 850  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a sericina según Monti et al [112].

El espectro ATR-IR de la seda cruda (figura 20a) muestra dos bandas fuertes, la primera a 1617  $\text{cm}^{-1}$  atribuible al modo amida I de una conformación de láminas  $\beta$  [113] y la banda intensa a 1511  $\text{cm}^{-1}$  asignada a la tirosina y las vibraciones  $\nu\text{CC}$  y  $\delta\text{CH}$  se solapan al modo amida II de una conformación de hojas  $\beta$ . Se observan bandas que muestran una baja intensidad a 1440 y 1403  $\text{cm}^{-1}$  de alanina y serina (glicina), debido a deformaciones de  $\text{CH}_2$ . Las bandas de intensidad media a 1227 y 1063  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los modos amida III y vibraciones del esqueleto  $\nu\text{CC}$ , respectivamente. Otra vibración del segmento alanina-glicina,  $\nu\text{CN}$  acoplada a  $\delta\text{CH}$ , se observa a 1162  $\text{cm}^{-1}$ . Se pueden atribuir tres bandas a un modo  $\text{CCN}$  de deformación entre 400 y 610  $\text{cm}^{-1}$ , las dos primeras a 425 y 540  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que a 611  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a un modo amida IV.

Los espectros de ATR-IR de las muestras de seda desgomadas obtenidas siguiendo los procedimientos D1 y D2, DS1 y DS2 (figuras 20b y 20c) muestran el mismo perfil con la excepción de la variación de intensidad de las bandas en 1617, 1440 y 1403  $\text{cm}^{-1}$ ; en relación al espectro de CS, la intensidad de la primera banda disminuye en la muestra DS1 y muestra la misma intensidad relativa en DS2. En ambas muestras desgomadas la banda a 1063  $\text{cm}^{-1}$  reduce drásticamente su intensidad en comparación con el espectro de CS. Al menos tres bandas, atribuidas a deformaciones CH y modos esqueléticos, están claramente separadas en la región de 900-1000  $\text{cm}^{-1}$  de los espectros DS1 y DS2, presentando una situación similar para bandas inferiores a 650  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 20.** Espectros ATR-IR de seda cruda (a), y sedas desgomadas con los métodos 1 (b) y 2 (c) (ver punto 3.7) sobre un ERI de diamante.

Con microscopía Raman no se pudo obtener señales asociadas a las lanas usando excitación en el visible, mientras que para la fibroína, las condiciones experimentales utilizadas debieron ser muy fuertes, es decir, largos tiempos de exposición y alta potencia del láser (>10 mW). Las propiedades anisotrópicas de la seda fueron observadas cambiando la orientación de la fibra bajo el microscopio. Los cambios de intensidad en las bandas a 1675, 1410, 1238, 885 y 223  $\text{cm}^{-1}$  (figura 21a y 21b) se deben a la respuesta preferencial de la fibroína por su naturaleza cristalina, incluso sin la necesidad de polarizadores. Se ha demostrado también que los procesos de desgomado no tienen influencia en la conformación de la fibroína (figura 21c y 21d).

En Raman se observaron diferencias espectrales entre los espectros CS y las muestras desgomadas DS1 y DS2. El espectro Raman de las muestras DS1 y DS2 muestran algunas modificaciones por efecto de desgomado; a saber, la banda de amida I a 1675  $\text{cm}^{-1}$  se desplaza a 1673  $\text{cm}^{-1}$  y disminuye su intensidad. La banda de amida III a 1235  $\text{cm}^{-1}$  reduce su intensidad en la muestra DS1. En este caso, no se pueden inferir cambios conformacionales de las proteínas a partir de las variaciones espectrales Raman de las vibraciones de la amida I (1650-1670  $\text{cm}^{-1}$ ) y de la amida III (1230-1280  $\text{cm}^{-1}$ ), y los modos esqueléticos alrededor de 900-960  $\text{cm}^{-1}$  [108]. La banda a 1007  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro de la muestra DS1 y DS2 (figura 21c y 21d) se observa con una menos intensidad en relación con la banda a 981  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro de la seda de capullos (CS). Las modificaciones de los parámetros de pH, tiempo y



temperatura al pasar del método de desgomado 1 a 2 podrían estar en el origen de los cambios espectrales observados. Con esto, el proceso de desgomado solo expone la fibroína dando cuenta de la contribución de la sericina a las variaciones netas observadas en las sedas desgomadas

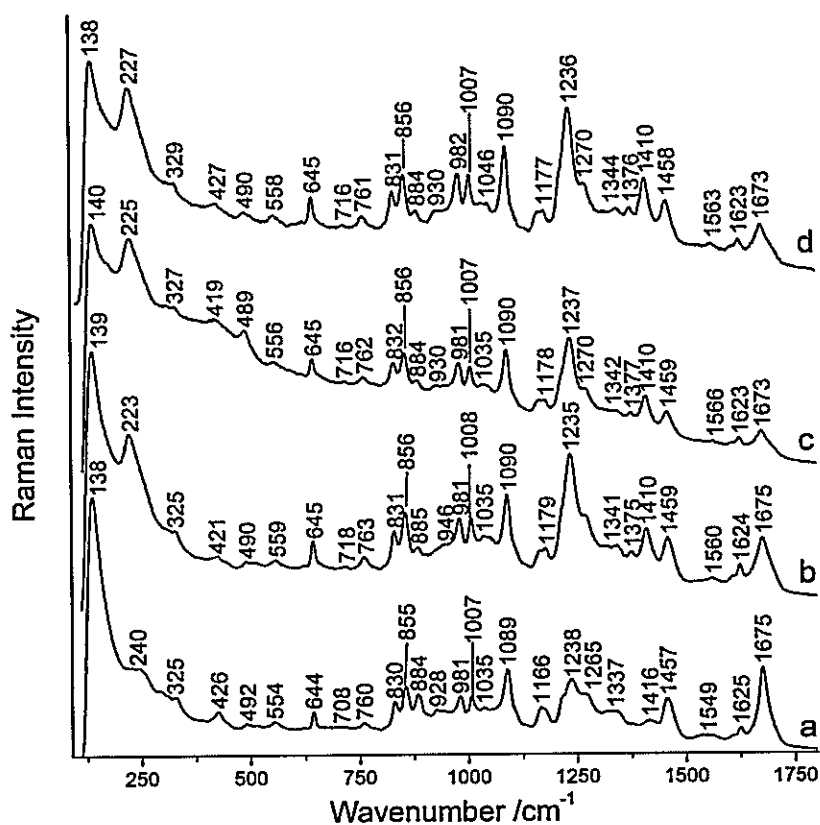


Figura 21. Espectros Raman de seda cruda (CS) en posición vertical (a) y horizontal (b) respecto de la observación al microscopio. Espectro Raman de las sedas desgomadas con el método 1 (DS1) (c) y con el método 2 (DS2) (d).

El espectro FT-Raman de seda obtenido resultó bastante similar, figura 22a, al informado por Monti et al. [109] para la fracción cristalina de fibroína de seda *Bombyx mori* (II-Cp). La presente muestra de seda se compone principalmente por el motivo péptido GAGAGS, lo que es consistente con la

estructura II-Cp en la seda. La asignación de las señales Raman realizada es coincidente con la propuesta en la literatura [63, 109].

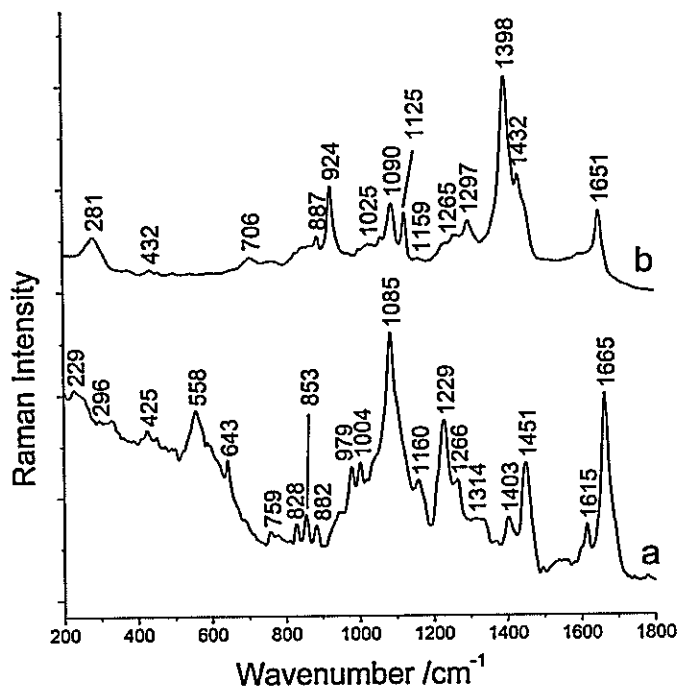


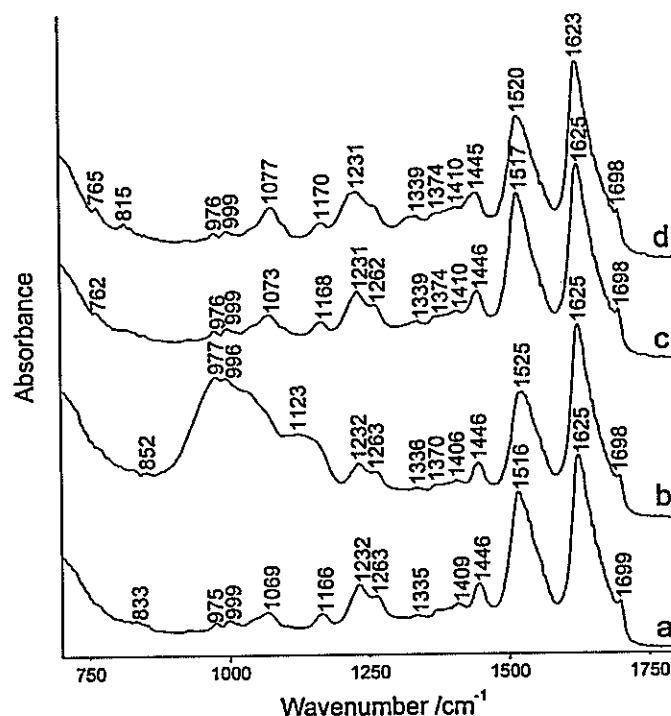
Figura 22. Espectro FT-Raman (a) y SERS (b) de la seda.

Se observaron varios cambios espectrales en términos de variación de intensidad y cambios de número de onda por efecto de superficie (figura 22b). Las bandas SERS están claramente definidas. La banda amida I a  $1665\text{ cm}^{-1}$  cambia a  $1651\text{ cm}^{-1}$  y su intensidad disminuye por efecto de la superficie; la intensidad de la banda amida III a  $1229\text{ cm}^{-1}$  disminuye drásticamente y el modo esquelético se observa claramente a  $924\text{ cm}^{-1}$ . Este conjunto de cambios espectrales indica que la superficie metálica adopta una disposición especial sobre la seda mostrando específicamente ciertos aspectos conformacionales. Las bandas a  $1432$ ,  $1398$ ,  $1265$  y  $706\text{ cm}^{-1}$  se observan ahora con diferentes

características espectrales comparadas con el espectro FT-Raman (figura 22a). En particular, la banda carboxílica a  $1398\text{ cm}^{-1}$  aumenta notoriamente su intensidad por efecto de la superficie lo que sugiere que la superficie metálica estaría más cerca de fragmentos carboxílicos, o que el modo simétrico de estiramiento correspondiente tiene su componente de polarizabilidad resultante, perpendicular a la superficie o paralelo a la incidencia del láser. De acuerdo con las reglas de selección de SERS se verificará un aumento de intensidad de una banda cuando la componente de polarizabilidad  $\alpha_{zz}$  del modo vibracional sea paralela al plano de polarización del campo eléctrico del haz láser incidente [56]. El aumento de banda observado de la banda a  $1398\text{ cm}^{-1}$  debería ser debido a la interacción o proximidad del grupo COOH de la serina con la superficie. La banda de la serina a  $1297\text{ cm}^{-1}$  aparece por efecto de la superficie mientras que el modo  $\nu\text{C-OH}$  a  $1004\text{ cm}^{-1}$  en Raman no se observa en SERS, lo que sugiere que la superficie no está cerca del residuo y que la vibración  $\nu\text{C-OH}$  es paralela a la superficie. Otra vibración de serina observada en Raman a  $1160\text{ cm}^{-1}$  disminuye su intensidad relativa en SERS; esto confirma la idea que la vibración  $\nu\text{C-OH}$  de serina es paralela a la superficie y que la vibración  $\nu\text{CC}$ ,  $\nu\text{C-OH}$  está probablemente acoplada y dominada por el modo  $\nu\text{CC}$ . Por lo tanto, el espectro SERS de la seda indica que la superficie metálica se acopla preferentemente en las cercanías de las cadenas laterales de serina y de alanina y que solo parte de la información conformacional de la fibroína está disponible en comparación con la inferida a partir de los datos Raman del sólido.

#### 4.2.3. Caracterización estructural de la seda pesada

A partir de una seda comercial sin pesar (UWS) se prepararon muestras de pesado rosado (PWS) y con taninos (TWS). Para ATR-IR las bandas más representativas de la seda son 1699, 1625, 1516, 1447 and 1232  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a los modos amida I para hojas  $\beta$ , amida II, poli-alanina-glicina y amida III, las que se observan con los mismos números de onda en los espectros de PWS, TW1 y TW2 (figura 23). Esto implica que la estructura cristalina de la fibroína no se ve afectada por los procesos de pesado.



**Figura 23.** Espectros ATR-IR de seda sin pesar (UWS, a), seda con pesado rosado (PWS, b) y pesado con taninos (TWS1, c) y pesado doble con taninos (TWS2, d) sobre un elemento de reflexión interna (ERI) de Ge.

Las señales a 996 y 977  $\text{cm}^{-1}$  son características de los grupos fosfato y silicato respectivamente y su aparición en el espectro de la muestra PWS está relacionada con la adición de estos componentes a la seda. Se prepararon dos muestras de seda pesada con taninos, TWS1 y TWS2. La muestra TWS2 se diferencia de TWS1 porque tiene una carga más pesada. Las muestras TWS presentan espectros idénticos entre ellos y similares a la seda sin pesar; los espectros están dominados por las señales de la fibroína. Un cambio de frecuencia desde 1069 a 1077  $\text{cm}^{-1}$ , y un aumento en la intensidad de las bandas a 1068 and 1624  $\text{cm}^{-1}$  son las principales modificaciones observadas sobre los espectros en IR. Las modificaciones de ambas bandas podrían estar relacionadas con la adición de un complejo metálico interactuando con las porciones amorfas de la seda. Las vibraciones esperadas en IR para el ácido gálico [114] o el complejo entre el hierro y el ácido gálico [115] podrían estar enmascaradas por las señales de fibroína.

El espectro Raman de la muestra PWS (figura 24a) está dominado por el espectro de la muestra UWS (figura 24b), confirmando así que el proceso de pesado rosado no tiene ningún efecto sobre la fibroína. Los espectros Raman de las muestras TWS1 y TWS2 (figuras 24c y 24d) son casi idénticos entre ellos y están dominados por el complejo formado entre ácido gálico y hierro (II) a partir de la sal de sulfato; esto también es similar al espectro Raman de las tintas ferrogálicas. Las bandas más intensas del complejo metálico se localizan en 1473, 1318, 960, 813, 582 y 535  $\text{cm}^{-1}$ , y el espectro del complejo dio como

resultado el mismo perfil espectral que el publicado por Lee et al [116]. Las bandas de fibroína a 1228, 1083, 1000, 849 y 755  $\text{cm}^{-1}$  (figura 24c) se identifican claramente en los espectros de la muestra TWS1 mientras que en TWS2 (figura 24d) sólo las bandas a 1229, 1081 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  son observables con menor intensidad. Los presentes resultados Raman son altamente consistentes con el hecho que los procesos de pesado con taninos no afectan a la estructura de la fibroína de la seda y muestran un espectro Raman dominado por el agente de pesado.

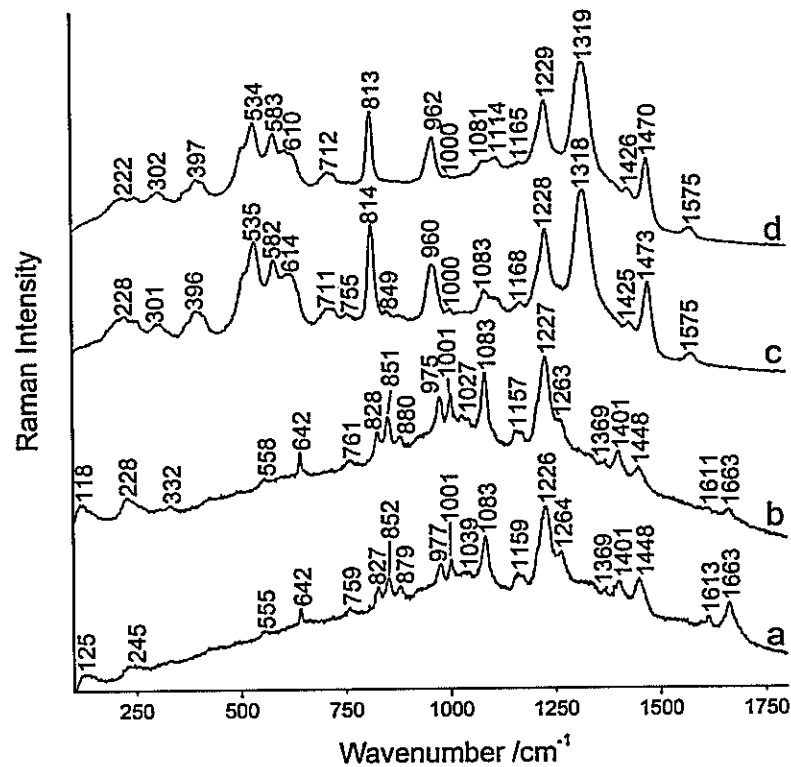
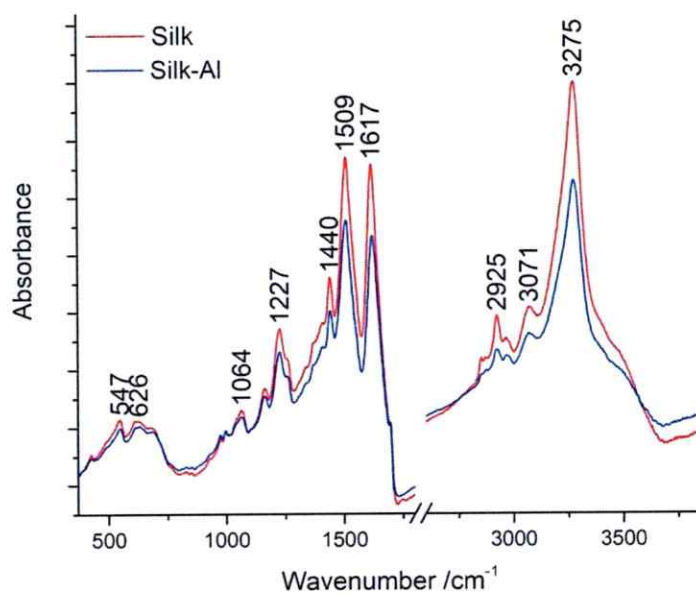


Figura 24. Espectros Raman (633 nm) de las muestras a) UWS, b) PWS, c) TWS1 and d) TWS2.

Sobre la base de los resultados anteriores se propone que el ion hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) actúa como un ensamblador molecular entre la fibroína y el ácido gálico a través de una interacción catión- $\pi$  [117].

La seda también fue tratada con sales de aluminio siguiendo el método descrito en el punto 3.7 para el mordentado. El espectro de la seda mordentada no presentó ninguna variación que permita inferir algún cambio estructural por efecto del aluminio añadido de acuerdo a lo observado en la figura 25.

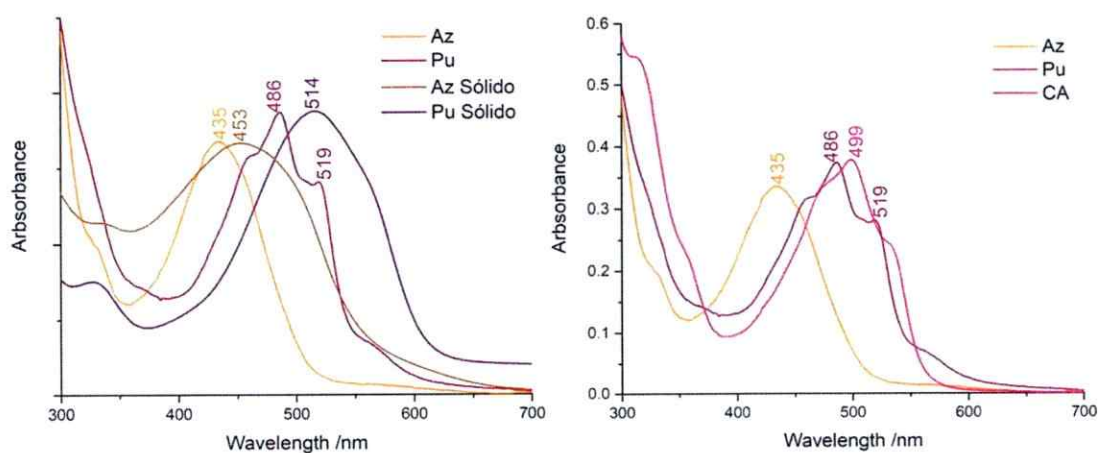


**Figura 25.** Espectro ATR de la seda antes (rojo) y después del proceso de mordentado (azul).

### 4.3. Colorantes

#### 4.3.1. UV-Vis

Se obtuvieron los espectros electrónicos de los colorantes alizarina (Az), purpurina (Pu) y ácido carmínico (CA) en solución y en sólido para Az y Pu (figura 26). El objetivo principal de estas mediciones fue obtener los máximos de absorción en el rango visible del espectro electromagnético para establecer posibles condiciones de resonancia Raman. Se logró observar que los sólidos respecto de las soluciones presentan un corrimiento hacia el rojo; es posible que este corrimiento esté relacionado con la mayor capacidad de redistribución de la carga entre los grupos OH y C=O de las moléculas en estado sólido. Los espectros en solución presentados corresponden a las moléculas neutras y los corrimientos observados con respecto a solventes más apolares [118] están relacionados con la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el solvente.



**Figura 26.** Espectros UV-Vis de los colorantes Az, Pu y CA. Izquierda: Comparación entre los sólidos y la solución para Az y Pu. Derecha: espectros UV-Vis en solución para Az, Pu y CA.



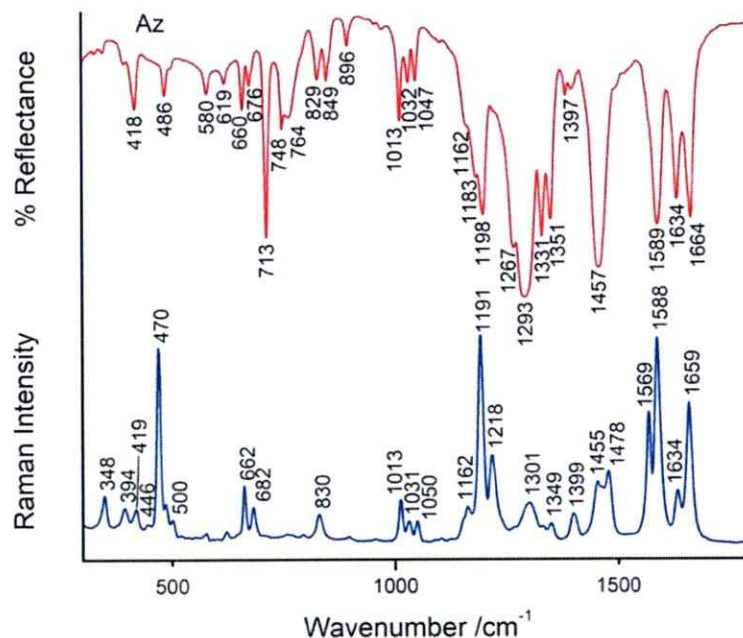
La obtención de los espectros de absorción en sólido permite una mejor interpretación de las señales Raman y SERS resonantes; en este trabajo de tesis todas las mediciones vibracionales se realizan en ausencia de solvente.

#### 4.3.2. ATR-IR y Raman

Se caracterizaron los colorantes Az, Pu y CA, previo a su interacción con las fibras y los metales, para entender sus estructuras y poder tener una noción acerca de su modo de interactuar con el metal y la fibra. Las asignaciones vibracionales se encuentran resumidas en la tabla 2 y 3, y se realizaron siguiendo la literatura [95, 119-125]. Hasta este punto y como se mencionó antes, el índigo, colorante azul, se puede identificar sin problemas utilizando ATR-IR y también Raman simple, en todas las longitudes de onda de excitación; esto implica que su detección no es un desafío en términos experimentales, y es por eso que no se entra en mayores detalles relacionados a su detección.

La Az es probablemente uno de los colorantes más estudiados hasta el momento, debido a su identificación como colorante principal en la planta *Rubia tinctorium*, una de las más utilizadas en Europa para lograr el color rojo tanto en la producción de pigmentos como para la tinción de textiles. Los espectros FT-Raman y FT-IR de la Az (figura 27) permiten la asignación de los principales modos observados en la molécula. Además del FT-Raman (1064 nm) el espectro Raman de la Az se puede obtener con la línea de excitación a 458 nm.

Con el resto de líneas de excitación en el visible las señales Raman se ven oscurecidas por la fluorescencia.

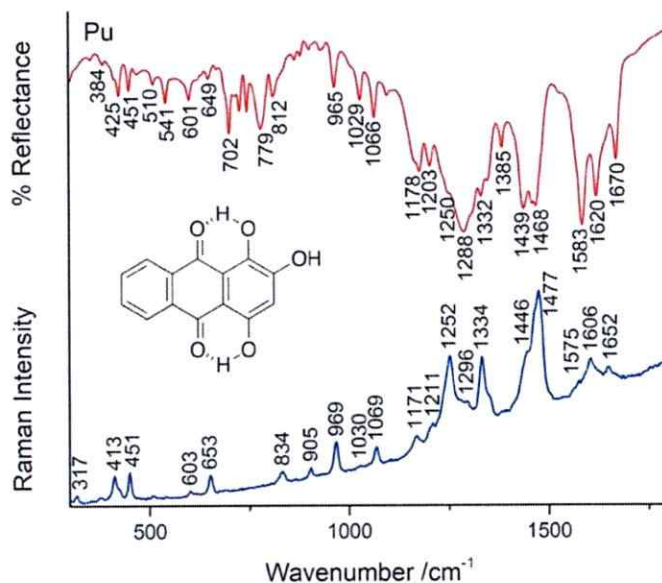


**Figura 27.** Espectro FT-Raman (azul) y ATR-IR (rojo) del colorante Alizarina (Az).

Los modos FT-IR de mayor interés en la Az son aquellos que podrían sufrir modificaciones por efecto de las interacciones con otros componentes; estos modos son los estiramientos de los grupos C=O en la posición (10) ( $1664\text{ cm}^{-1}$ ) y en la posición (9) ( $1634\text{ cm}^{-1}$ ) (figura 6), los  $\nu_{\text{CC}}$  de los anillos aromáticos ( $1589$ ,  $1457$ ,  $1293$  y  $1198\text{ cm}^{-1}$ ), deformaciones de los C-OH en la posición (1) ( $1351\text{ cm}^{-1}$ ) y en la posición (2) ( $1331\text{ cm}^{-1}$ ) y de la deformación fuera del plano de los grupos C=O y C-O ( $713\text{ cm}^{-1}$ ).

El espectro Raman de Pu (figura 28) solo se puede obtener al excitar con la línea láser a  $458\text{ nm}$ , esto es, en condiciones de resonancia. Con todas las

otras líneas de excitación el fondo de fluorescencia no permite observar señales que puedan asignarse a los modos vibracionales de esta molécula.



**Figura 28.** Espectro Raman (458 nm) (azul) y ATR-IR (rojo) del colorante Purpurina (Pu).

La asignación que se presenta está hecha sobre la base de los espectros SERS del colorante [123] y los espectros IR [126]. En IR de Pu se pueden observar algunos de los modos similares a los que se obtienen para Az con asignaciones que podrían ser similares; tal es el caso de las señales a 1670, 1620, 1583, 1468, 1332 y 1288  $\text{cm}^{-1}$ . En Raman, los modos que se observan están siendo amplificados por efectos resonantes. Esto que permite sugerir que los modos asociados a la formación de un sistema altamente conjugado, por la deslocalización de la carga, serían aquellos más amplificados. Esta conjugación ocurre a través de enlaces puente de hidrógeno intramoleculares mediante sistemas ceto-enólicos entre los grupos C=O y OH en las posiciones (9)-(10) y

(1)-(4), respectivamente. El grupo OH en la posición (2) es el responsable del corrimiento observado de la banda a 1620 cm<sup>-1</sup> [127].

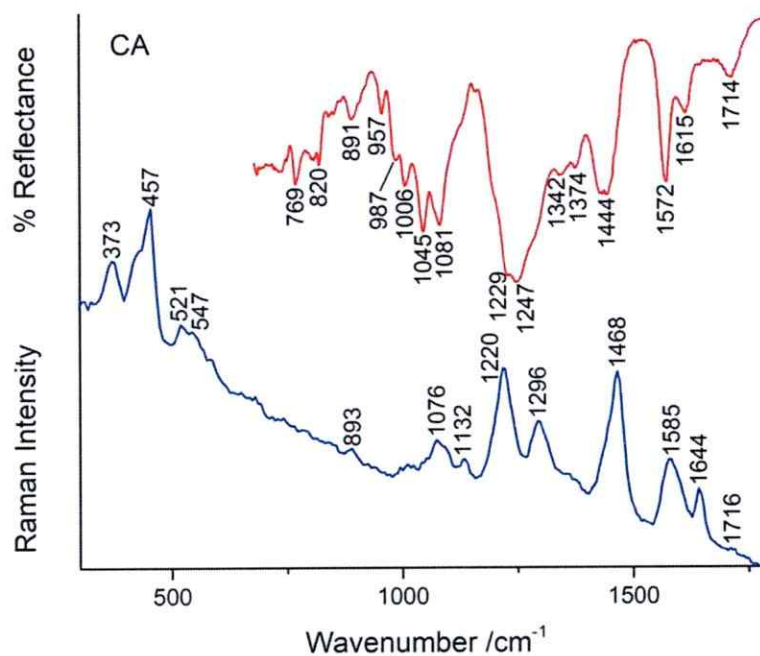
*Tabla 2. Asignación espectral FT-IR, Raman y SERS de los colorantes alizarina (Az) y purpurina (Pu) entre 300 y 1800 cm<sup>-1</sup>.*

Alizarina			Purpurina			Asignación
FT-IR	Raman	SERS	FT-IR	Raman	SERS	
1664 s	1659 s		1670 m	1652 w		v C(10) (C=O)
1634 m	1634 w	1627 w	1620 m	1606 m	1609 w	v C(9) (C=O)
1589 s	1588 vs	1602 w	1583 s	1575 vw		v (C=C)
	1569 s	1552 m			1556 bw	v (C=C)
	1478 m		1468 m	1477 vs	1479 w	v (C-O) / δ (=CH)
1457 s	1455 w	1452 s	1438 m	1446 m	1418 sh	v (C=C) / δ (C-O-H) / δ (=CH)
1397 vw	1399 w		1385 w		1394 m	v (C-C) / δ (=CH)
1351 m	1349 vw					v (C-C) / δ (C-O-H)
1331 m		1324 vs	1332 w	1334 s	1323 vs	v (C-C) / δ (C-O-H)
1293 vs	1301 w	1286 s	1288 s	1296 vw	1303 vs	v (C-O) / v (C-C) / δ (C-C-C)
1267 s			1250 w	1252 s	1269 sh	v (C-O) / v (C-C)
	1218 m	1208 vw		1211 vw	1218 m	δ (C-H) / δ (C-C-C)
1198 m	1191 vs	1187 s	1203 w			δ (C-H) / δ (C-C-C)
1183 m						
1162 w	1162 w	1160 m	1178 w	1171 w	1163 m	v (C-C) / δ (C-H)
1047 w	1050 vw	1049 w	1066 w	1069 m	1067 m	δ (C-C-C)
1032 w	1031 vw		1029 w	1030 vw		v (C-C) / δ (C-H)
1013 w	1013 w	1015 vw				v (C-C) / δ (C-C-C)
			965 w	969 m	976 w	ρ(C-H)
896 vw		902 vw		905 w	908 vw	
849 w						δ (C=O) / δ (C-C-C)
829 w	830 w	818 vw	812 w	834 w		γ (C-H) / γ (C-O)
764 m			779 m			γ (C-H) / γ (C-O)
748 m					738 vw	
713 s			702 m			γ (C=O) / γ (C-O)
676 w	682 w	682 w				
660 w	662 m	663 vw	649 w	653 w	650 w	γ (C=O) / δ (C-C-C)
619 w		634 w	601 w	603 vw	604 vw	
580 w		583 vw	541 w			
	500 vw	506 w	510 vw		526 m	Def.esquel. anillo
486 w	470 vs	478 m	451 w	451 w	473 b	
418 w	419 w	420 vw	425 w	413 w	426 vw	
	348 w	343 s			379 vw	
				317 w	315 vw	

Intensidad relativa: s, fuerte; sh, hombro; m, media; w, débil; vw, muy débil; b, ancha.  
Nomenclatura: def., deformación; esquel., modo esquelético.

Para la asignación de las señales observadas en los espectros ATR-IR y FT-Raman del ácido carmínico existe solo un trabajo por Cañamares et al [121] que permite establecer las señales más importantes (tabla 3).

A pesar que la mayoría de estas señales presentan contribuciones simultáneas de distintos modos vibracionales, se pueden destacar algunas como el estiramiento del grupo C=O del ácido presente a  $1714\text{ cm}^{-1}$  para IR y a  $1716\text{ cm}^{-1}$  para Raman, la señal de los grupos C=O de la base antraquinónica a  $1644\text{ cm}^{-1}$  en Raman y  $1615\text{ cm}^{-1}$  en IR, las vibraciones de los anillos aromáticos a  $1585$  y  $1468\text{ cm}^{-1}$  en Raman y  $1572$  y  $1444\text{ cm}^{-1}$  en IR, y las señales atribuibles al residuo glucosídico  $1374$ ,  $1342$ ,  $1081$  y  $1045\text{ cm}^{-1}$  en IR y  $1076\text{ cm}^{-1}$  en Raman.



**Figura 29.** Espectro FT-Raman (1064 nm) (azul) y ATR-IR (rojo) del colorante Ácido Carmínico (CA).

**Tabla 3. Asignación espectral FT-IR, Raman y SERS del Ácido Carmínico.**

FT-IR	Raman	SERS	Asignación
1714 m	1716 vw		Vácido (C=O)
	1644 m	1652 vw	v C(10) (C=O)
1615 m			v C(9) (C=O)
1572 s	1585 mb	1581 w	v (C=C)
	1468 s	1474 s	v (C-O) / $\delta$ (=CH)
1444 m			v (C=C) / $\delta$ (C-O-H) / $\delta$ (=CH)
1374 w			$\delta$ Glu(CH) / $\delta$ Glu(COH) / $\delta$ (COH)
1342 w		1353 sh	v (C-C) / $\delta$ (C-O-H)
	1296 m	1307 s	v (C-C)
1247 s			v (C-O) / v (C-C)
1229 sh	1220 s	1226 s	$\delta$ (C-H) / $\delta$ (C-C-C)
	1132 vw	1134 vw	v (C-C) / $\delta$ (C-O-H)
1081 m	1076 w	1080 m	v Glu(CH) / $\delta$ Glu(COH)
1045 m			v Glu(CH) / $\delta$ Glu(COH)
1006 w			v (C-C) / $\delta$ (C-C-C)
987 w		970 vw	$\rho$ (C-H)
957 vw			$\rho$ (C-H)
891 w	893 vw		$\rho$ Glu(C-H)
820 w			$\gamma$ (C-H) / $\gamma$ (C-O)
769 w			$\gamma$ (C-H) / $\gamma$ (C-O)
	547 w	563 vw	
	521 w		
	457 vs	454 vs	Def.esquel. anillo
		434 sh	
	373 m	367 bw	

Intensidad relativa: s, fuerte; sh, hombro; m, media; w, débil; vw, muy débil; b, ancha.  
Nomenclatura: def., deformación; esquel., modo esquelético; Glu, glucosa.

#### 4.3.3. SERS colorantes

Se logró obtener los espectros SERS de los colorantes Az, Pu y CA y se pudo establecer algunas de las características de la respuesta SERS en distintas condiciones. Existen estudios que tratan de la respuesta amplificada asociada a los cambios de pH en la solución [120, 121, 128] y que dan luces acerca de la interacción entre los colorantes antraquinónicos sobre las

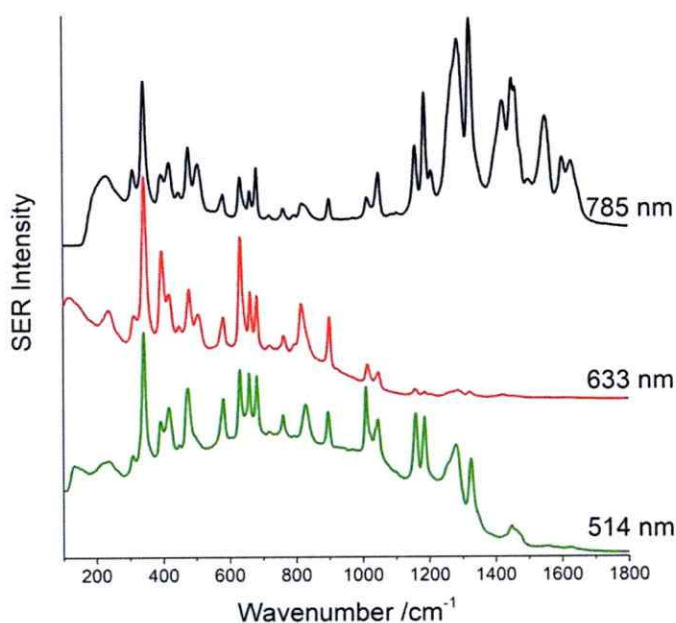
superficies metálicas. En los espectros SERS obtenidos de los colorantes es posible observar cambios en las frecuencias y en las intensidades de las señales con respecto a los espectros Raman. En general, los cambios de frecuencia responden a la transferencia de carga entre el analito y el metal.

En este trabajo de tesis se trató de exponer con algo más de claridad el origen de las diferencias que muestran los colorantes al interactuar con las nanopartículas metálicas. El instrumento con el cual se realizaron la mayoría de los experimentos SERS (Renishaw RM1000) cuenta con tres líneas de excitación láser en el visible, 514,5 nm, 632,8 nm y 785 nm. La eficiencia del detector y de los filtros en este instrumento también genera diferencias en los espectros obtenidos, principalmente en términos de las intensidades en algunas regiones del espectro. Se encontró que la mejor longitud de onda para llevar a cabo los espectros SERS en este trabajo de tesis es la línea de excitación a 785 nm, pues la respuesta del detector en la ventana espectral entre 100 y 1800  $\text{cm}^{-1}$  (correspondiente a la zona de la huella digital) presenta una respuesta más uniforme (figura 30). Además, al usar esta longitud de onda, se evitan efectos resonantes por efecto de la radiación incidente, lo que permite una mejor interpretación de las variaciones de los espectros SERS con respecto al Raman.

Se ha demostrado que la Az puede presentar más de un espectro SERS cuando se obtiene en solución con distintas condiciones [120] lo que está asociado a la posibilidad de formar especies aniónicas en la medida que



aumenta el pH. Esto resulta relevante para la aplicación de la metodología en seco, pues la interacción del colorante en las condiciones iniciales de pH va a condicionar la respuesta y pueden llevar a una interpretación errónea de los espectros obtenidos.

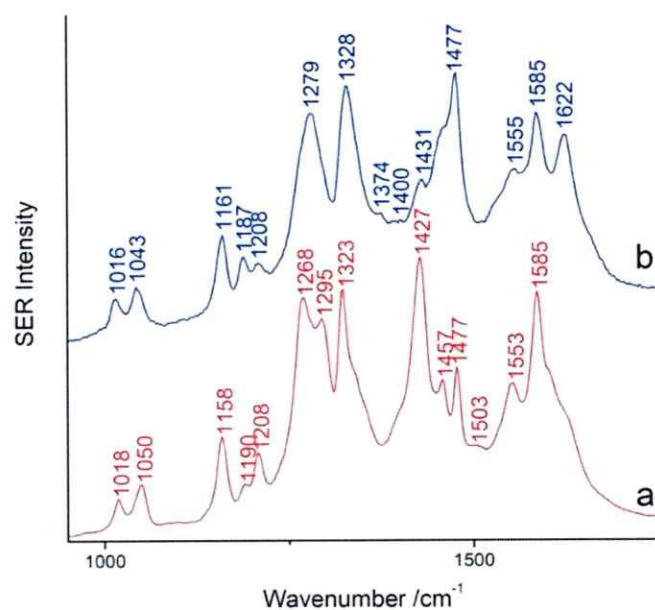


**Figura 30.** Espectros SERS de Az sobre Ag-Cit obtenidos con distintas longitudes de onda de excitación láser.

En la figura 31 es posible observar el espectro SERS de la Az sobre Ag-Cit, tomado a partir de una solución a pH 10,7. Se puede observar diferencias notables entre ambos espectros en los modos asociados principalmente a los estiramientos del C=O en la posición (10) ( $1622\text{ cm}^{-1}$ ) de los estiramientos de los anillos aromáticos (región entre  $1000$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ ) y las señales específicas de los estiramientos C-OH ( $1477$  y  $1427\text{ cm}^{-1}$ ), y la porción del espectro entre  $1230$  y  $1300\text{ cm}^{-1}$ ) (ver tabla 2).



El espectro que se observa en la Figura 31a concuerda con el espectro que se obtiene a pH básico, mientras que el de la Figura 31b concuerda con el que se obtiene a pH ácido [120]. Esto se puede interpretar como una interacción preferente de las moléculas en forma aniónica mientras aún están en solución, lo que da paso a la interacción de la forma protonada en la medida que el solvente se evapora.



**Figura 31.** Espectros SERS (458 nm) de Az sobre Ag-Cit a partir de una solución a pH 10,7.

Para los tres colorantes antes mencionados se midieron los espectros SERS utilizando las superficies de Ag-Cit con la línea de excitación láser a 785 nm (figura 32).

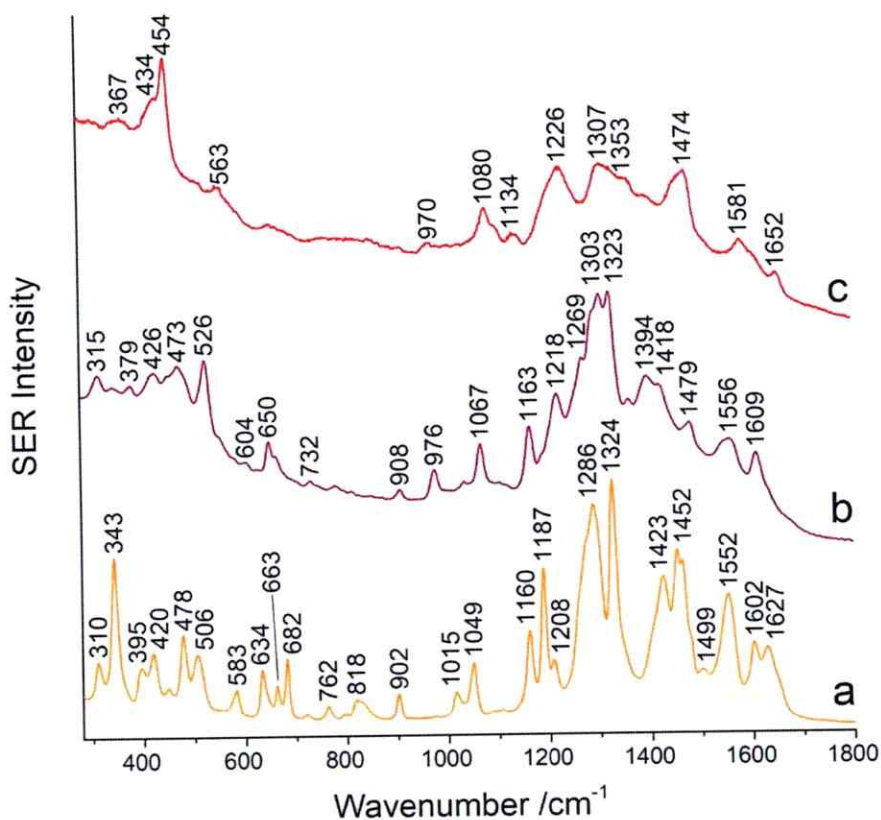
Para Az (figura 32a) las diferencias más notables en el espectro SERS con respecto al Raman es la disminución de la frecuencia e intensidad de la señal correspondiente al estiramiento del grupo C=O en la posición (9) de 1659

a  $1627\text{ cm}^{-1}$ . Esta disminución implica una deslocalización de la carga hacia el resto del anillo por efecto de la transferencia de carga entre el sistema cetónico formado por los grupos C=O en (9) y OH en (1). La intensidad de la señal a  $1324\text{ cm}^{-1}$  de la deformación del enlace entre grupo OH y el C en la posición (2) también se ve notoriamente amplificada debido a la cercanía con la superficie. La aparición de las señales en  $1552$  y  $1423\text{ cm}^{-1}$  podrían estar dando cuenta de la interacción química de la Az con la superficie metálica a través de la formación de un anillo quelato entre los grupos C=O en (9) y OH en (1) y la plata [129]; esta interacción también podría estar siendo evidenciada en algunas de las señales que le otorgan la asimetría a la señal con máximo en  $1286\text{ cm}^{-1}$ . Esta última señal, al igual que la que se observa en  $1452\text{ cm}^{-1}$  también se podría asignar a una amplificación de los modos de estiramiento de aromáticos. Los cambios de intensidad en la zona de las vibraciones del esqueleto de la molécula, en particular de las señales a  $478$  y  $343\text{ cm}^{-1}$ , también podrían estar dando cuenta de algún tipo de orientación preferencial de la molécula en la superficie; sin embargo, estos modos acoplados son difíciles de asignar y generalmente contienen contribuciones de distintas porciones de la molécula.

Para Pu (figura 32b), la asignación espectral está mayormente basada en la de la alizarina por tener estructuras relativamente similares. En este caso las principales modificaciones residen en la disminución de la intensidad de la señal a  $1477$  y  $1252\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a estiramientos de los enlaces C-O y

deformaciones de los grupos =C-H; esto es concordante con la idea que se forma un quelato entre la molécula de Pu con la superficie metálica. La orientación y/o polarizabilidad de estos enlaces podrían estar asociadas a su nula actividad SERS. En términos de la amplificación por efectos de la superficie, el modo a  $1323\text{ cm}^{-1}$  que podría ser asignado, al igual que en Az, principalmente a la deformación C-O-H del grupo OH en la posición (2); los modos que corresponderían a estiramientos de los anillos aromáticos también se ven amplificados con un máximo a  $1303\text{ cm}^{-1}$ . La molécula de Pu tendría la posibilidad de formar quelatos con la plata, similares al propuesto para Az, en las posiciones (9) y (1), y (10) y (4). Al observar el espectro SERS de Pu se observan señales a  $1556$ ,  $1418$  y  $1269\text{ cm}^{-1}$ , que dan cuenta de los distintos modos de estiramiento de estos quelatos.

Para CA (figura 32c), las modificaciones del espectro SERS corresponden al aumento en la intensidad de las señales ya observadas en el espectro Raman. La principal modificación en términos de nuevas señales se observa en el hombro a  $1353\text{ cm}^{-1}$  asignado a modos de estiramientos de anillos aromáticos y deformación de los enlaces C-O-H. A pesar que en el espectro SERS del CA la formación de anillos quelatos no es tan evidente como en el caso de Az, por el ancho observado de las señales no es posible descartar que exista ese tipo de interacciones.

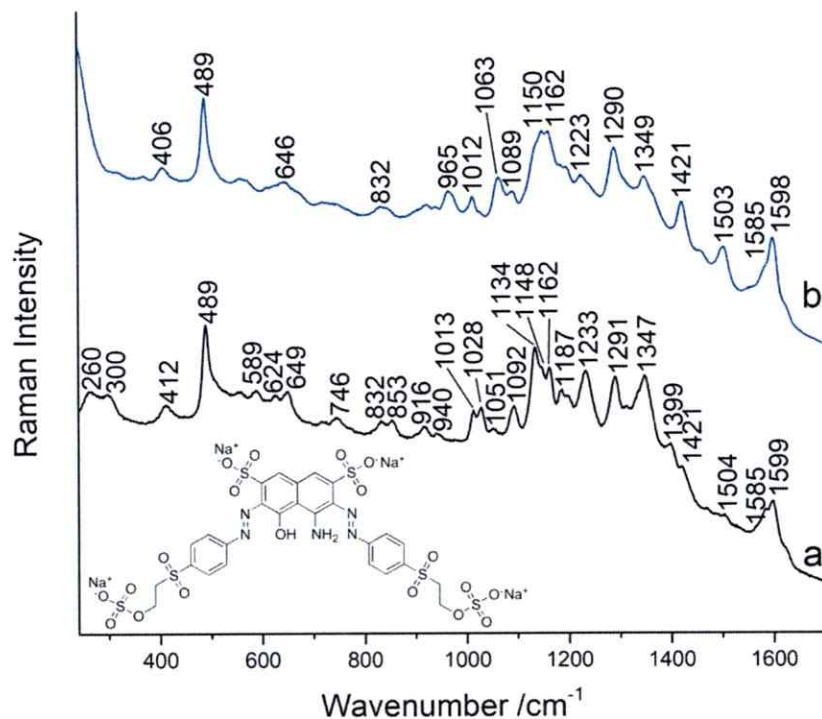


**Figura 32.** Espectros SERS (785 nm) sobre Ag-Cit de Az (a), Pu (b) y CA (c).

Además de los colorantes que se pueden obtener de fuentes naturales, se decidió utilizar uno sintético con características de teñido distintas a las de los naturales. El colorante Negro Reactivo 5 (RB5), corresponde a un colorante en el que la fijación al color ocurre a través de sustituciones nucleofílicas con algunos residuos de los aminoácidos presentes en la estructura de la fibra proteica. El hecho de que su fijación no ocurra a través de la formación de un complejo metálico, como en el caso de los colorantes mordentados, permite observar ciertas características de la interacción en la seda teñida que serán discutidas más adelante en el texto.

El espectro Raman del RB5 (figura 33a) muestra un perfil similar al obtenido por Abbott et al [130] usando la línea de excitación a 514 nm y casi idéntico al presentado por Buzzini [131] usando la línea a 785 nm. La asignación espectral del RB5 (tabla 4) se realizó utilizando referencias generales [132, 133] y algunas específicas [80]. Las señales a 1291, 1187 y 1092  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a estiramientos del grupo sulfato (-OSO<sub>2</sub>O-); la señal débil a 746  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la deformación de ese mismo grupo. Al menos dos bandas correspondientes al grupo sulfonato (-SO<sub>2</sub>O-) se observan a 1233 y 1162  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas de la porción sulfona de la molécula (-SO<sub>2</sub>-) se observan a 1347, 1028, 624 y 589  $\text{cm}^{-1}$ ; la banda doble a 1134  $\text{cm}^{-1}$  probablemente contiene estiramientos CC de alcanos. Otro modo que involucra enlaces CC alifáticos se observa a 832  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas débiles a 940 y 916  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a modos de balanceo de CH. Las señales a 412 y 260  $\text{cm}^{-1}$  probablemente también involucran al grupo -SO<sub>2</sub>-. Las señales a 1599 y 1585  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento del anillo aromático de los fenilos y naftilos, respectivamente. La banda a 1013  $\text{cm}^{-1}$  se puede asignar a los modos de estiramiento simétrico de los anillos bencénicos. El modo de aleteo del grupo NH<sub>2</sub> se observa a 649  $\text{cm}^{-1}$  mientras que los modos de deformación del mismo grupo están entre 400 y 300  $\text{cm}^{-1}$ . La banda débil a 1504  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a modos de estiramiento CC, CN; el hombro a 1421  $\text{cm}^{-1}$  podría asignarse a una conformación trans -N=N-, sin embargo se esperaría que es este modo mostrara una intensidad mayor [131]. En este caso, la banda está enmascarada por la vibración de los anillos aromáticos a 1399  $\text{cm}^{-1}$ . La banda intensa a 489

$\text{cm}^{-1}$  se atribuye a una deformación CCC de los anillos de naftaleno fuera del plano.



**Figura 33.** Espectros Raman (a) y SERS (b) del colorante Negro Reactivo 5.

En el espectro SERS se observan modificaciones por efecto de la superficie metálica. De hecho, las señales atribuidas al grupo sulfona a 1347, 1134, 1028, 624, 589 y 412  $\text{cm}^{-1}$  muestran cambios más notorios en intensidad que en la frecuencia (figura 33b), al igual que las bandas del grupo sulfonato en 1233 y 1162  $\text{cm}^{-1}$ . Esto es consistente con una orientación preferencial de los grupos sulfona y sulfonato hacia la superficie metálica. No se observaron modificaciones mayores en los modos asociados a los grupos fenilo, naftilo, sulfato y algunos de los modos alifáticos, lo que sugiere que los grupos no tienen una preferencia especial hacia la superficie. La banda a 1504  $\text{cm}^{-1}$

presenta una intensidad mayor en SERS lo que indicaría una mayor cercanía de los modos CC, CN con el metal. La conformación trans del grupo azo (-N=N-) se define claramente por la disminución en la intensidad de la señal a  $1399\text{ cm}^{-1}$  y el aumento de la señal a  $1421\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente, no se observaron bandas que pudieran indicar una interacción química del colorante con la superficie.

Siguiendo la literatura, y teniendo en consideración las distintas formas en las que las moléculas se pueden acomodar sobre las superficies, es posible notar que existen discrepancias entre la literatura citada y los espectros obtenidos. Estas diferencias se deben principalmente a la combinación de la interacción inicial de la molécula y el metal con la conformación final que adopta cuando la muestra se seca por completo. Esto implica, necesariamente, que cada experimento SERS puede conducir a espectros distintos para un mismo analito, dependiendo de las condiciones utilizadas. Entre estas condiciones, como ya se mostró, están la longitud de onda de excitación, el pH y también el tipo de superficie.

**Tabla 4. Asignación espectral Raman y SERS del colorante Negro Reactivo 5 (RB5).**

Raman	SERS	Asignación
1599 s	1598 s	v-fenilo
1585 sh	1585 sh	v-naftilo
1504 vw	1503 m	vCC, CN
1421 vw	1421 m	v -N=N- (trans)
1399 w		v -N=N- (cis)
1347 ms	1349 m b	v-SO <sub>2</sub> -
1291 ms	1290 s	v-OSO <sub>2</sub> O-
1233 ms b	1223 w	v-SO <sub>2</sub> O-
1187 w d		v-OSO <sub>2</sub> O-
1162 w	1162 m	v-SO <sub>2</sub> O-
1148 sh	1150 m	v-SO <sub>2</sub> O-
1134 sd		v-SO <sub>2</sub> -, vCC alif.
1092 w	1089 vw	v-OSO <sub>2</sub> O-
1051 vw	1063 w	vCC alif.
1028 wm		v-SO <sub>2</sub> -
1013 w	1012 w	Respiración anillo
	965 w	ρCH
940 vw		ρCH
916 w		ρCH
853 w		vCC, vCN
832 w	832 vw	vCC
746 w b		δ-OSO <sub>2</sub> O-
649 w b	646 vw	NH def.
624 vw		-SO <sub>2</sub> - def.
589 w b		-SO <sub>2</sub> - def.
489 s	489 s	CCC naft. def.
412 wm	406 m b	-SO <sub>2</sub> - def.
300 w		NH <sub>2</sub> def.
260 w		-SO <sub>2</sub> - def.
	236 ms	Ag-Cl

Intensidad relativa: s, fuerte; sh, hombro; m, media; w, débil; vw, muy débil; b, ancha.  
 Nomenclatura: def., deformación; alif, alifático; naft., naftilo.



#### 4.4. Complejos metálicos de colorantes

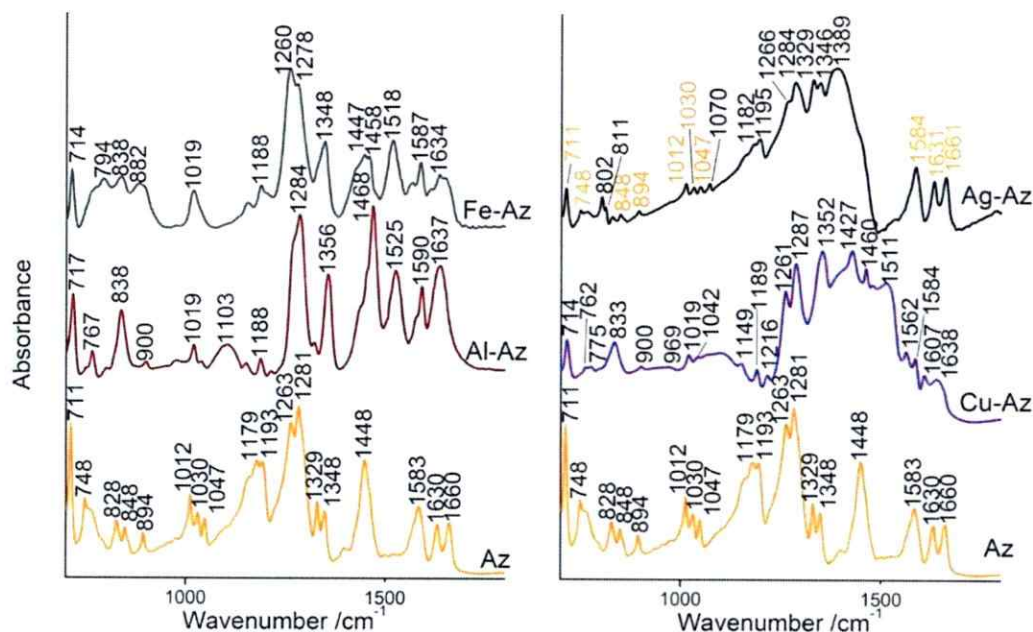
Se sintetizaron complejos metálicos de Az y Pu, siguiendo los protocolos para preparar pigmentos tipo laca descritos por Sanyova [84]. En el caso de Az, además de utilizar aluminio como metal, se utilizó hierro, cobre y plata para formar los complejos respectivos y lograr definir las interacciones metal-colorante. Utilizando ATR y Raman fue posible observar cambios significativos en los espectros de los complejos respecto del colorante puro. Estos cambios corresponden a la interacción específica del metal con sitios de la molécula capaces de formar interacciones de transferencia de carga con los metales. Los cambios se describen a continuación para cada técnica en particular, de acuerdo a la asignación de las señales de los espectros IR y Raman en cada caso.

##### 4.4.1. ATR

La Az presenta cambios en las señales correspondientes a la formación del complejo metálico que son evidentes y que, de acuerdo a las asignaciones vibracionales reportadas por otros autores y resumidas en la Tabla 2 [120, 123, 125], están orientados a las modificaciones electrónicas en los enlaces C=O en (9), (10) y OH en (1) (ver figura 6). Del mismo modo es posible observar cambios espectrales en las señales asociadas a los estiramientos del esqueleto de la molécula formado por enlaces del tipo C-C y C-H, principalmente aquellos asociados a las porciones aromáticas de la molécula. Por otro lado, Pu mostró

información menos clara y con modificaciones espectrales difíciles de interpretar en términos de la formación de complejos.

En particular para Az (figura 34), las señales correspondientes a los enlaces C=O (9) y (10), 1630 y 1660  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, presentan un cambio importante debido a la formación del complejo metálico.



**Figura 34.** Espectros ATR-IR de los distintos complejos metálicos obtenidos para Az.

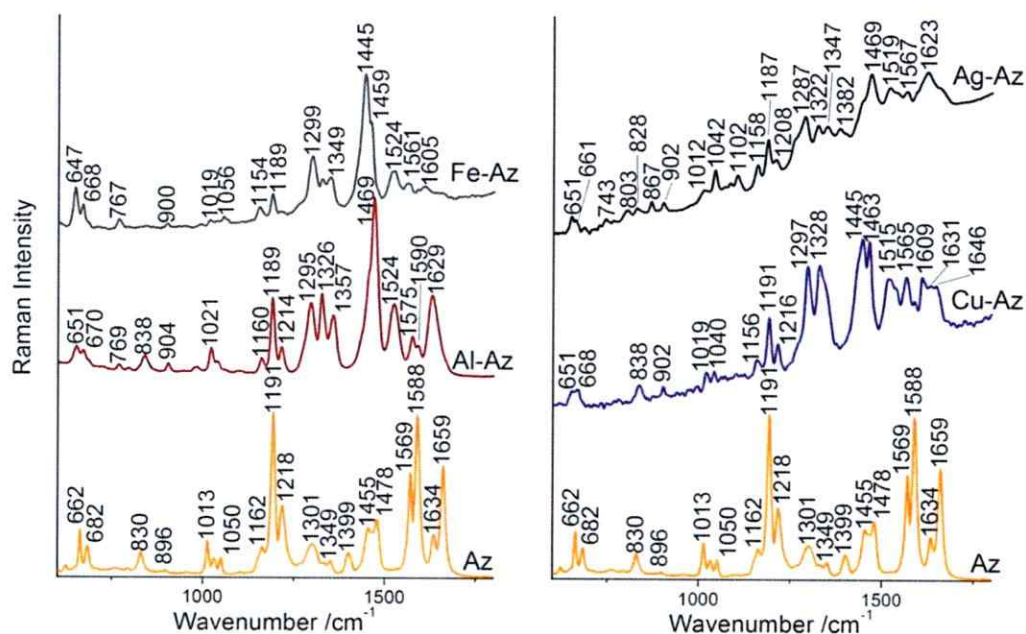
La principal señal asociada a esta modificación consiste en la aparición de una banda en torno a 1520  $\text{cm}^{-1}$  que ha sido asignada a uno de los modos de estiramiento del grupo CCC del anillo quelato formado por la interacción del metal con los O de la porción ceto-enólica que se forma entre las posiciones (9) y (1). Las señales asociadas a las deformaciones C-OH (1329 y 1348  $\text{cm}^{-1}$ ) también presentan una modificación similar a la observada para los estiramientos C=O. En este caso al formarse el complejo aparece una única

señal en la zona cercana a  $1350\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la contribución del enlace C-O en (1) coordinado al metal, lo que explicaría el corrimiento observado al cambiar de un metal a otro (Al, Fe, Cu). En el caso de la plata el complejo sintetizado muestra en el espectro IR las señales de la Az pura en el espectro, aparentemente la Az induce la reducción de la plata en las condiciones de síntesis.

#### 4.4.2. Raman

Al igual que con ATR, la formación de los complejos pudo observarse por los cambios de las señales Raman correspondientes a los estiramientos C=O en la posición (9) y (10), C-O y C-C del esqueleto (figura 35). Las señales a  $1634$  y  $1659\text{ cm}^{-1}$  que representan los estiramientos de los grupos C=O (9) y (10) respectivamente, se ven modificados de modo que con la formación del complejo metálico se observa solo una señal en torno a  $1630\text{ cm}^{-1}$ , equivalente a la observada en IR. El estiramiento del grupo CCC del anillo quelato también se observa en Raman como una señal en torno a  $1520\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, con Raman es posible observar dos fenómenos que ayudan a completar la caracterización de la interacción del metal con Az. El primero es que la contribución a la polarizabilidad de la molécula por los anillos aromáticos presentes en la molécula se ve afectada por la formación del complejo: se observa una disminución en la intensidad de la señal a  $1455\text{ cm}^{-1}$ . El segundo fenómeno tiene que ver con la similitud que tienen los espectros de los complejos metálicos de Az con Cu y Ag con el espectro SERS de Az. Esto

último probablemente está relacionado con la naturaleza del efecto SERS y las contribuciones que los distintos mecanismos de interacción aportan al espectro final [55]. Se puede interpretar que en este caso la interacción química, responsable también de la formación del complejo metálico, tendría una presencia marcada en el espectro SERS de Az.

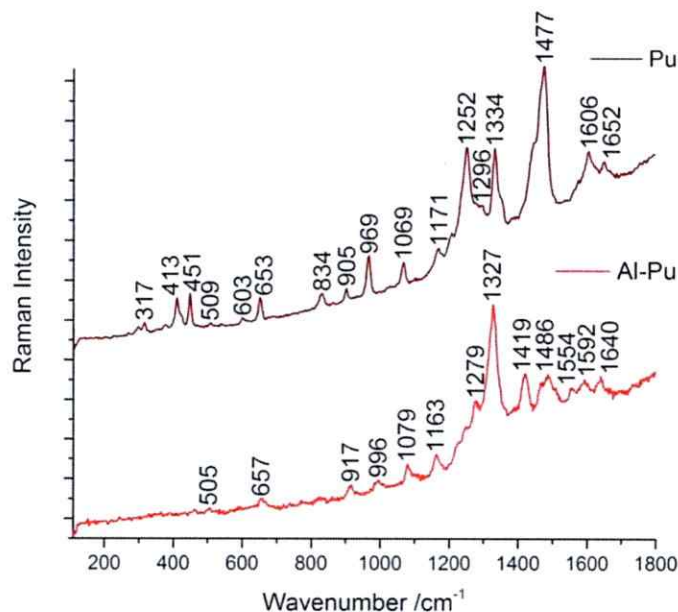


**Figura 35.** Espectros FT-Raman (1064 nm) de los complejos metálicos obtenidos para Az.

Con respecto a lo observado para Pu se reporta por primera vez el espectro Raman tanto del colorante como de su complejo metálico de aluminio (figura 36). En este caso, la interpretación espectral para definir la formación del complejo metálico no es tan clara como para Az, y cuenta con poco respaldo bibliográfico [123].

Lo que más destaca al observar los espectros del complejo colorante aluminio, es que la señal equivalente al anillo quelato que se forma para los

complejos de Az alrededor de  $1520\text{ cm}^{-1}$ , para Pu aparece a  $1554\text{ cm}^{-1}$ . Destaca también el cambio de intensidades en las señales a  $1477\text{ y }1252\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a estiramientos C-O y deformaciones angulares C-H y C-C-C.



**Figura 36.** Espectros Raman (458 nm) de Pu y de su complejo de aluminio.

La modificación en las señales de los estiramientos C-O puede ser un indicio de la inhabilidad de ciertos enlaces por estar formando parte del complejo y es por esto que solo se puede observar la señal a  $1419\text{ cm}^{-1}$ ; en el espectro de Pu aparece como un hombro a la izquierda de la señal a  $1477\text{ cm}^{-1}$ . La modificación espectral por efectos de la formación del complejo se verifica principalmente en la región  $1200\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  donde concurren principalmente los grupos funcionales C-O. Estas variaciones espectrales se asocian a cambios estructurales propios de la formación del complejo metálico. Al igual que para Az, el espectro del complejo metálico de Al-Pu guarda muchas semejanzas con

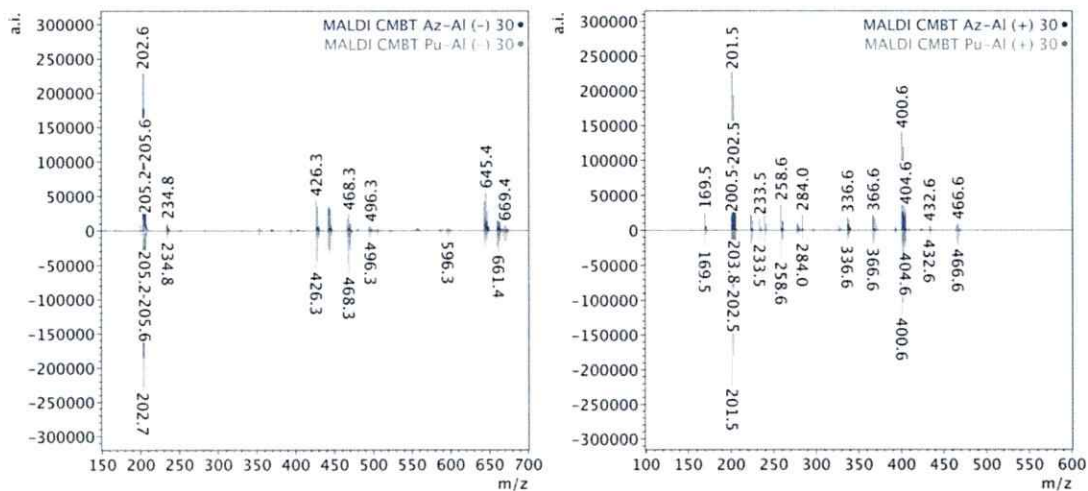
el espectro SERS del colorante puro, lo que podría estar indicando una interacción del mismo tipo. Resulta particularmente interesante hacer una comparación entre el espectro SERS obtenido para Pu sobre Cu (figura 13 derecha) y el espectro del complejo Al-Pu (figura 36 abajo). Es posible observar un perfil espectral muy similar con corrimientos que se pueden asociar directamente a la diferencia en las capacidadesceptoras de electrones entre el Cu y el Al. Es notable como la señal a  $1554\text{ cm}^{-1}$  en el complejo Al-Pu se corre hacia  $1537\text{ cm}^{-1}$  en el espectro SERS sobre Cu, confirmando su asignación como modo de estiramiento del anillo quelato formado entre Al y Pu.

#### 4.4.3. MALDI/LDI-ToF-MS

Como un primer acercamiento a la caracterización de los posibles subproductos de la síntesis de los complejos metálicos se intentó aplicar espectrometría de masas con tiempo de vuelo y ionización por desorción láser (LDI-ToF-MS) y por desorción láser asistida con matriz (MALDI-ToF-MS). Estas técnicas han sido escasamente utilizadas en la caracterización de colorantes y de materiales asociados a muestras de interés cultural [134-136]; sin embargo, presenta un alto potencial analítico principalmente por la pequeña cantidad de muestra en relación a las técnicas en que se utiliza la espectrometría de masas como detección de los productos separados. Los resultados muestran que las matrices seleccionadas en esta etapa (CHCA y CMBT) no permiten obtener señales en los espectros que puedan ser relacionadas a los iones moleculares de los complejos metálicos ni a los colorantes Az y Pu libres. Es más, para los



complejos de Al de Az y Pu la matriz CMBT mostró espectros idénticos tanto en modo ion positivo como en el modo ion negativo (figura 37).



**Figura 37.** Espectros de masas obtenidos por MALDI-ToF-MS para los complejos de Al de Az y Pu con la matriz CMBT en modo ion negativo y positivo.

Utilizando la matriz CHCA se observaron algunas diferencias entre los espectros de los complejos de ambos colorantes en el modo ion positivo (figura 38). Estas diferencias sólo se pueden relacionar directamente con las señales esperadas para el ion molecular de Pu ( $m/z = 256$ ).

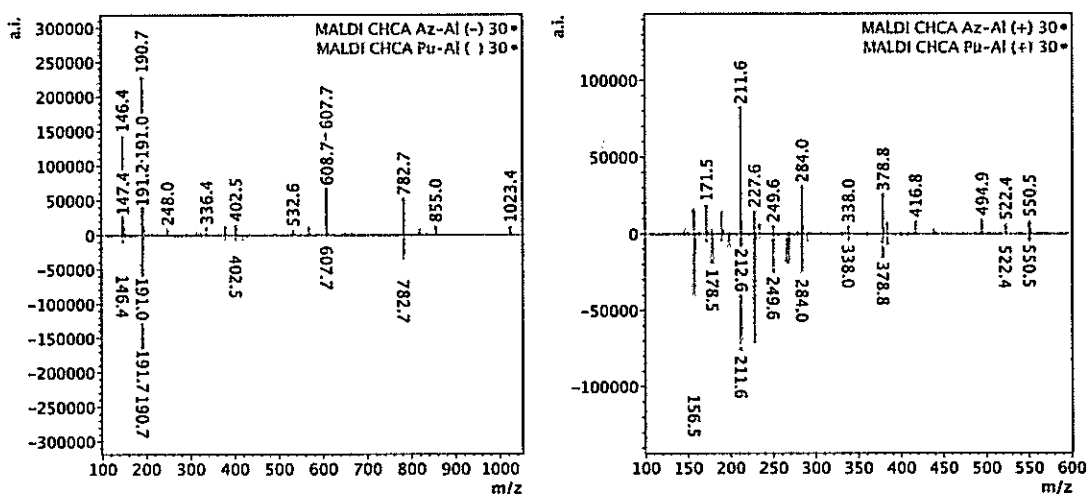
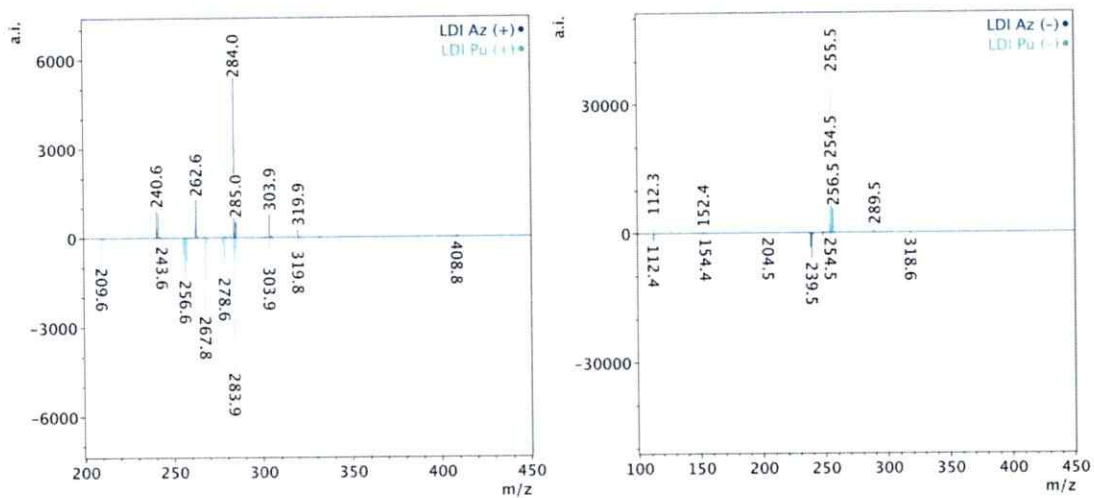


Figura 38. Espectros de masas obtenidos por MALDI-ToF-MS para los complejos de Al de Az y Pu con la matriz CHCA en modo ion negativo y positivo.

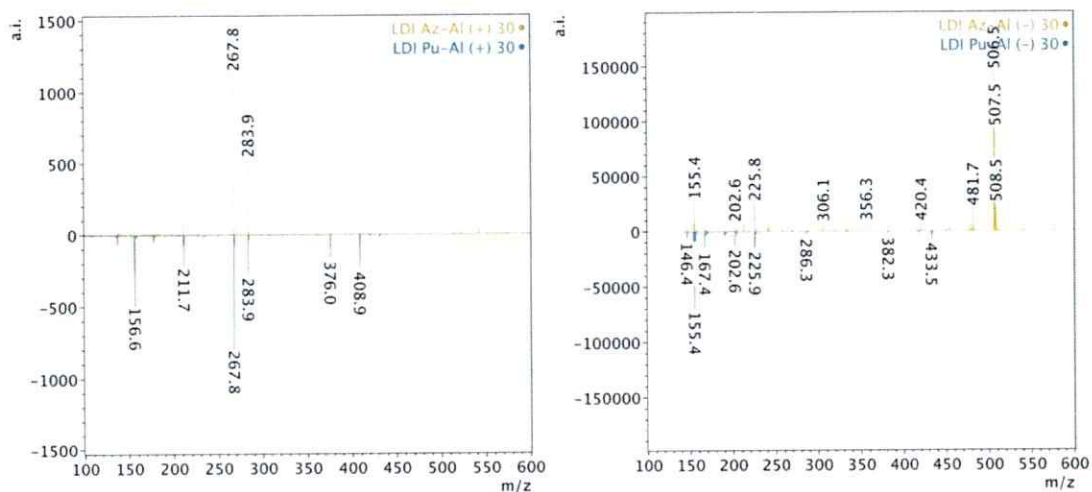
Al estudiar las muestras en ausencia de matrices (LDI-ToF), fue posible obtener señales que pueden ser asignadas como marcadores de la presencia de los colorantes (figura 39). En el caso de Az es posible observar las señales obtenidas en modo ion positivo que corresponden al ion molecular  $[M]^+$  cerca de ( $m/z = 240$ ) y también el pico asociado al ion  $[M+Na]^+$  ( $m/z = 262$ ). Para Pu también es posible observar las señales del ion molecular  $[M]^+$  ( $m/z = 256$ ). En el modo ion positivo, a pesar que se pueden observar los iones moleculares, existe un grupo de señales que se comparten y que limitan la caracterización de estas moléculas. En el modo ion negativo también es posible observar las señales de los iones moleculares en torno a 239 y 255  $m/z$  para Az y Pu, respectivamente. En este caso los espectros no comparten señales y se pueden distinguir claramente entre ellos, lo que sugiere que en el modo positivo la formación de aductos catiónicos sería un factor limitante en esta técnica.





**Figura 39.** Espectros de masas obtenidos por LDI-ToF para Az y Pu en modo ion positivo y negativo.

Para el LDI-ToF de los complejos de Al de Az y Pu (figura 40), en el modo positivo se observa el mismo problema de señales equivalentes que para los colorantes libres.



**Figura 40.** Espectros de masas obtenidos por LDI-ToF para los complejos de aluminio de Az y Pu.

En el modo negativo se identifican claramente las señales correspondientes a los complejos. Para el complejo de Az, se observa el  $[M]^-$  a 506 m/z, la aparición de este ion molecular comprobaría la formación del complejo Al-Az<sub>2</sub>. Para Pu, el ion equivalente se esperaría en torno a 539 m/z; sin embargo, no es posible observar más que las señales correspondientes al ion Al-Pu a 286 m/z y otras que pueden corresponder a posibles fragmentaciones.

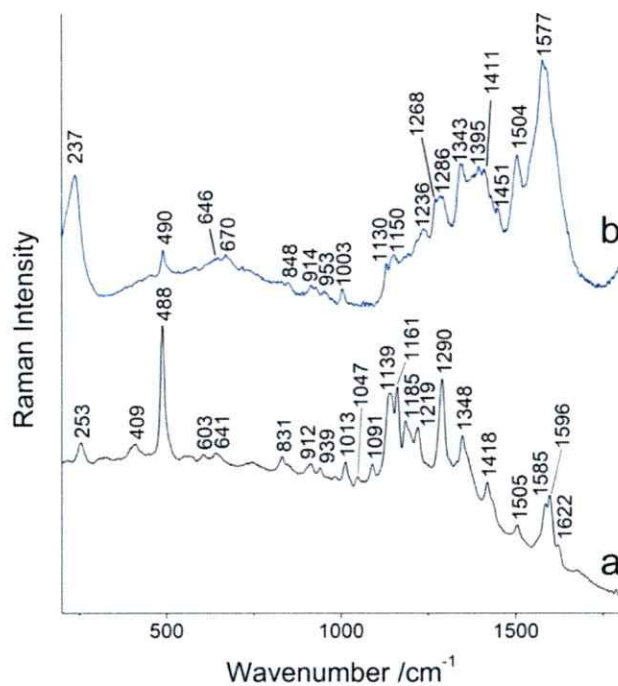
## 4.5. Textiles

### 4.5.1. Muestras de seda teñida con RB5

El espectro Raman de la muestra de seda teñida con el colorante Negro Reactivo 5 (BDS) está dominado por las señales del colorante. Sin embargo, algunos cambios espectrales podrían dar cuenta de la interacción entre el colorante y la seda (figura 41). De hecho, las señales asociadas a los fragmentos con azufre son los más influenciados. Por ejemplo, el modo  $\nu$ -SO<sub>2</sub>O- a 1233 cm<sup>-1</sup> del colorante que se observa a 1219 cm<sup>-1</sup> y disminuye su intensidad. El grupo sulfato -OSO<sub>2</sub>-O- se ve menos influenciado por la interacción con la seda que el grupo sulfonato; el aumento de la intensidad de la banda a 1291 cm<sup>-1</sup> es la única variación observada para este grupo. Las señales asignadas al grupo -SO<sub>2</sub>- a 1347, 1028, 624 y 589 cm<sup>-1</sup> muestran una gran disminución en la intensidad por efecto de la interacción. Sobre la base de estos resultados, es posible inferir que el RB5 interactúa con la seda principalmente a través de los grupos sulfona y sulfonato. Este resultado está en acuerdo con estudios acerca de la interacción de colorantes reactivos con celulosa [137], en los cuales además de la adición nucleofílica se propone que el mecanismo involucra la eliminación del grupo sulfato.

El análisis del espectro SERS de la muestra BDS indica que muchas de las señales observadas son atribuibles al colorante RB5; por ejemplo, las señales débiles a 1411 cm<sup>-1</sup> y 1343 cm<sup>-1</sup>, asignadas a los modos de estiramiento del grupo azo y del grupo and sulfona, respectivamente. El resto

de las señales correspondientes a grupos con azufre no se observan en el SERS. La banda de intensidad media a  $1286\text{ cm}^{-1}$  puede ser asignada a una vibración de estiramiento de la porción aromática de la molécula que se observa a  $1291\text{ cm}^{-1}$  en el espectro Raman [80]. Los corrimientos espectrales por efecto de la superficie observados para los grupos que contienen azufre indican que la distribución electrónica del colorante se ve influenciada por la interacción con la seda.



**Figura 41.** Espectro Raman (a) y SERS (b) de la muestra de seda teñida con el colorante RB5.

La banda doble a  $1577\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye al naftaleno, ahora está más intensa y resuelta. No se puede descartar que algunos modos vibracionales que involucren las porciones amino de la seda estén también presentes; de hecho, las bandas a  $848\text{ and }1150\text{ cm}^{-1}$  podrían contener algo de información respecto

de la presencia de tirosina (Tyr) [105]. La señal débil a  $1451\text{ cm}^{-1}$ , la media a  $1268\text{ cm}^{-1}$  y una de las bandas en la señal doble a  $1150\text{ cm}^{-1}$  se asignan a modos vibracionales del aminoácido serina [138]; las dos primeras podrían contener también información de la deformación del  $\text{CH}_2$  en la alanina. Otra deformación del  $\text{CH}_2$  de la alanina se observa en SERS a  $670\text{ cm}^{-1}$ . Las señales de la serina a  $1047$  and  $831\text{ cm}^{-1}$  sólo se observan en Raman. Este comportamiento implica que las porciones que interactuaban con la superficie metálica en la seda sin teñir, ahora están menos disponibles, o enmascarados por las señales del colorante. Otras señales conformacionales como la amida III a  $1236\text{ cm}^{-1}$  y la señal débil a  $927\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del esqueleto aparecen por efectos de la superficie. El modo de deformación del esqueleto del grupo naftaleno a  $490\text{ cm}^{-1}$  disminuye en intensidad por efecto de la superficie manteniendo casi el mismo número de onda, lo que implica que este modo está poco influenciado tanto por la superficie metálica como por la interacción con la seda.

#### 4.5.2. Sedas históricas

Se analizaron muestras de seda provenientes de algunos objetos provenientes la colección de textiles del Museo Histórico Nacional (MHN) (figura 42) que se detallan en la tabla 5, para la identificación de los materiales presentes en la seda e inferir sobre los deterioros observados en los textiles.

Las muestras de seda pesada del forro color crema (HWS1), del forro del vestido rosado (HWS2) y el bolso (HWS3) no tienen registros relacionados con los procesos de pesado a los que fueron sometidos.

**Tabla 5.** Códigos y descripción para las sedas históricas.

Código	Descripción
HWS1	Forro de seda pesada color crema de un vestido de finales del s.XIX
HWS2	Forro de seda pesada de un vestido rosado fabricado entre 1910 y 1911
HWS3	Bolso de seda pesada fabricado cerca de 1920
HDS1	Vestido negro/púrpura de principio del s.XX
HDS2	Manto de Manila negro datado entre final del s.XIX y principio del s.XX
HDS3	Manto negro de la primera mitad del s.XX

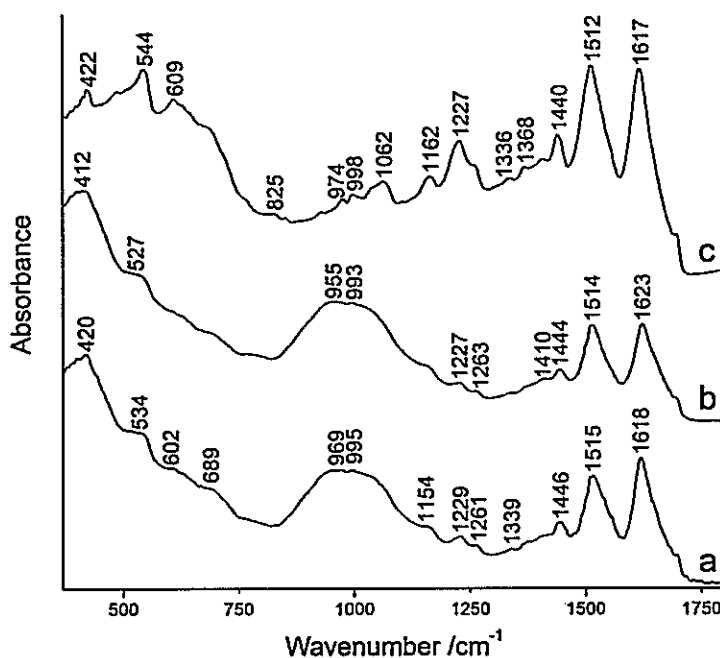


**Figura 42.** Objetos de la colección de textiles del MHN desde los que se extrajeron las muestras de sedas históricas a) HWS1, b) HWS2, c) HWS3, d) HDS1, e) HDS2 y f) HDS3

En el espectro ATR-IR de las muestras HWS1 y HWS2 (figura 43a y 43b), las bandas asignadas a las vibraciones de los grupos silicato y fosfato se

observan claramente como una banda ancha e intensa con dos máximos a 969 y 995  $\text{cm}^{-1}$ , y 955 y 993  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Las bandas de la fibroína muestran el mismo perfil que la seda desgomada presentada en la figura 20a.

La intensidad relativa de las señales amida I y II con respecto a la banda en torno a 970  $\text{cm}^{-1}$  se presenta como un buen marcador para diferenciar entre los métodos de pesado dinamita y rosado: cuando la intensidad de las señales de amida es similar al grupo de señales cerca de 970  $\text{cm}^{-1}$  es posible proponer que el pesado pudo haber sido con alguna de las variantes del método dinamita. Una intensidad mayor de las señales amida es característica de un pesado rosado [98], por lo que es posible inferir que un método dinamita fue utilizado para agregar masa a las muestras HWS1 y HWS2.



**Figura 43.** Espectros ATR-IR de las muestras de seda histórica pesada a) HWS1, b) HWS2 y c) HWS3 sobre un ERI de diamante.

Los análisis utilizando microscopía electrónica de barrido acoplada con espectroscopía de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva (SEM-EDS) muestran cantidades de silicio en las muestras HWS1 y HWS2 que permiten apoyar la idea de un método dinamita de pesado en ambos casos. El corrimiento espectral observado para la banda amida I de  $1617\text{ cm}^{-1}$  a  $1623\text{ cm}^{-1}$  (figura 43) se podría asociar a los efectos químicos del metal, o de los procesos utilizados para la preparación del textil, sobre la estructura de la fibroína [139] o incluso a un estado de deterioro más avanzado. El espectro ATR-IR de la muestra HWS3 es idéntico al de la seda desgomada DS2, exceptuando el pequeño aumento en la intensidad de la señal a  $1617\text{ cm}^{-1}$ ; es decir, la fibroína domina el espectro. El análisis por EDS de esta muestra evidencia la falta de estaño, por lo que se puede descartar un pesado de tipo rosado o dinamita, y la ausencia de hierro y de color indica que el pesado tampoco pudo haber sido realizado con taninos.

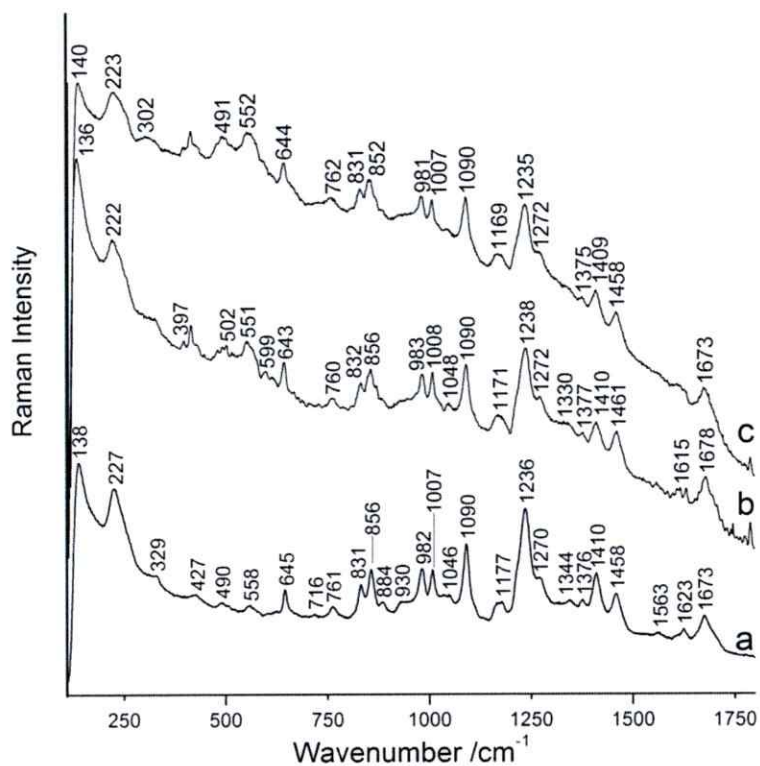
*Tabla 6. Resumen de los resultados semicuantitativos obtenidos por SEM-EDS para las muestras de sedas históricas.*

Porcentaje en masa (%)											
Muestras	HWS1		HWS2		HWS3	HDS1		HDS2		HDS3	
	Trama	Urdimbre	Trama	Urdimbre		Trama	Urdimbre	Trama	Urdimbre	Trama	Urdimbre
<b>Elemento</b>											
Al	nd	nd	nd	nd	0.27	0.51	0.37	0.24	nd	0.16	nd
Si	9.16	8.53	9.80	9.63	nd	2.04	0.46	0.54	nd	nd	0.13
P	1.18	1.34	nd	1.30	nd	0.88	nd	nd	nd	nd	nd
S	nd	nd	1.58	nd	0.10	nd	nd	0.17	nd	0.53	0.40
Ca	0.76	0.61	nd	nd	0.17	0.45	nd	0.31	nd	0.18	nd
Fe	nd	nd	nd	nd	nd	0.27	7.73	1.49	0.81	nd	nd
Sn	15.21	12.97	20.32	16.33	nd	6.41	7.56	nd	nd	nd	nd

nd: no detectado.

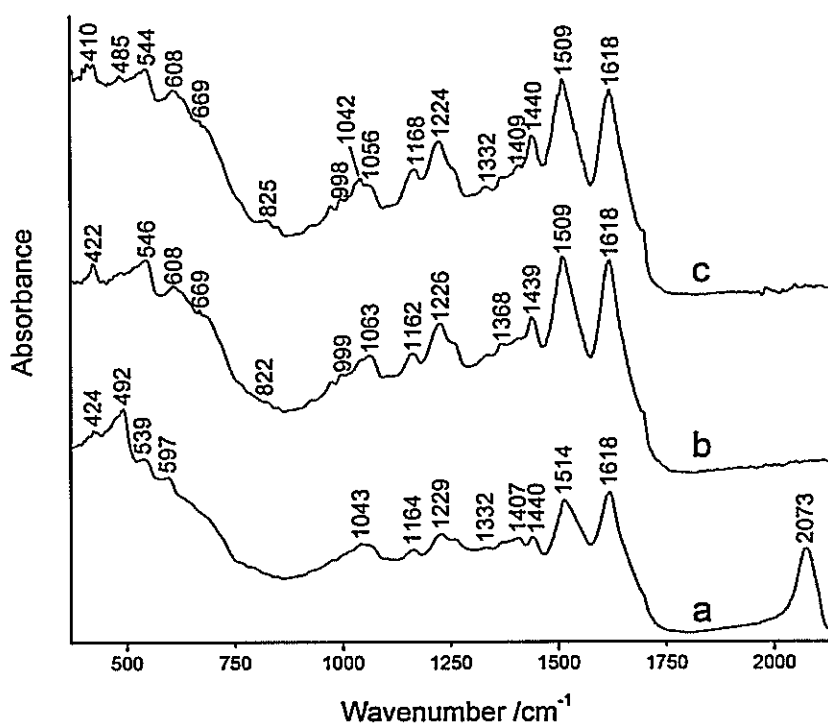


Las muestras HWS1 y HWS2 presentan un espectro Raman (785 nm) casi idéntico al obtenido para la seda desgomada DS2 (figura 44); el espectro Raman de la muestra HWS3 no pudo ser obtenido con ninguna línea láser incluso utilizando baja intensidad. Las diferencias principales en los espectros de las muestras HSW1 y HWS2 son las intensidades relativas y cambios en los números de onda de las bandas a  $558\text{ cm}^{-1}$  y las deformaciones  $\text{CH}_2$  del par  $1410/1458\text{ cm}^{-1}$  con respecto a la muestra DS2; esto sugiere un cambio en la conformación de la fibroína por efecto de los iones metálicos en las sales de pesado. El hecho que la banda de la tirosina a  $1623\text{ cm}^{-1}$  no aparezca tan bien definida podría estar relacionado con que la estructura de la fibroína es predominantemente cristalina en las muestras pesadas.



**Figura 44.** Espectros Raman de las muestras DS2 (a), HWS1 (b) y HWS2 (c).

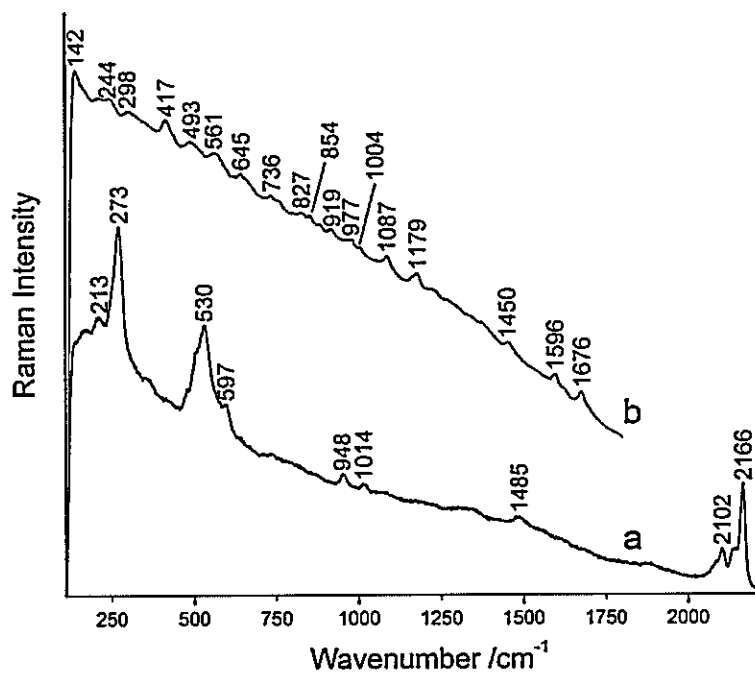
Las muestras históricas de seda teñida negra analizadas presentan resultados algo diferentes a las sedas pesadas históricas. El espectro ART-IR de la muestra HDS1, del vestido negro/púrpura presenta las bandas características de la seda, junto con dos señales intensas a 2073 y 492  $\text{cm}^{-1}$  (figura 45a). Las muestras HDS2 y HDS3 presentan un espectro ATR-IR idéntico al de la muestra DS2.



**Figura 45.** Espectros ATR-IR de las muestras HDS1 (a), HDS2 (b) y HDS3 (c).

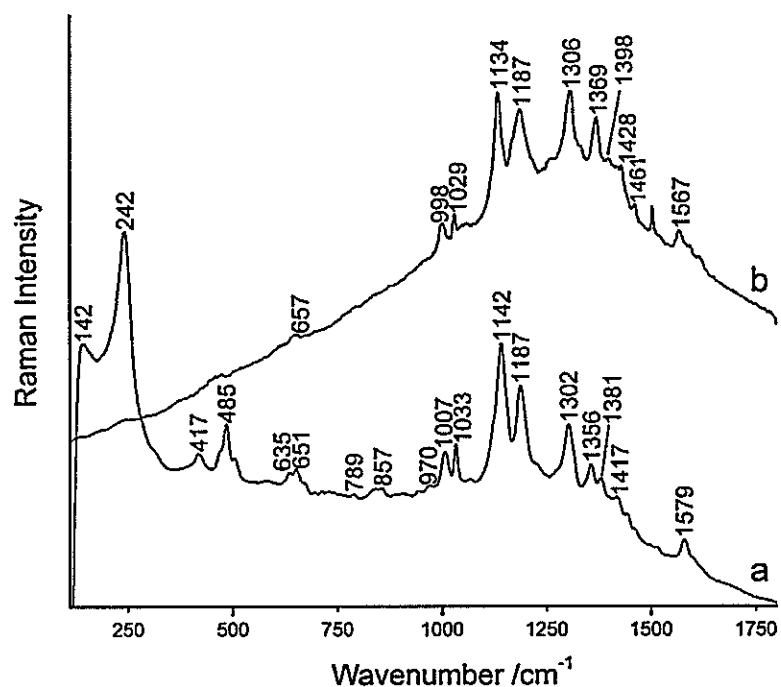
En esta muestra podemos identificar una trama negra y una urdimbre púrpura. El espectro Raman de cada una se recogió usando la línea de excitación láser a 785 nm, obteniéndose señales a 2166, 530 y 273  $\text{cm}^{-1}$  para la trama, indicando la presencia de azul de Prusia, un ferrocianato férrico (figura 46a). De acuerdo a Hacke [6] se utilizaban soluciones de cloruro de hierro o

cloruro de estaño como mordiente del azul Napoleón (una modificación del pigmento azul de Prusia). De acuerdo a los datos EDS en la tabla 6, que muestran la presencia de estaño y hierro, se podría indicar que éste fue el procedimiento utilizado para teñir la trama. Este proceso se utilizó por primera vez en 1857 lo que concuerda con la datación de la muestra HDS1 a principio del siglo XX. El espectro del azul de Prusia enmascara el espectro de la seda, fenómeno ya observado para la muestra de seda teñida con el colorante RB5 (muestra BDS). En el espectro Raman de la urdimbre púrpura (figura 46b) de la muestra HDS1 es posible identificar las señales principalmente de la seda, sobre el gran fondo de fluorescencia; también se observan señales a 1596 y 417  $\text{cm}^{-1}$  que no pueden asignarse a algún material conocido por la calidad del espectro obtenido.



**Figura 46.** Espectro Raman de la trama (a) y de la urdimbre (b) de la muestra HDS1.

En el manto negro de Manila (HDS2), datado entre fines del siglo XIX y principios del siglo XX, se observa una decoloración desde el negro hacia el marrón. Para la muestra de este manto no fue posible obtener un espectro Raman pues la exposición al láser, sin importar la potencia, induce la degradación de la muestra. Lo mismo ocurrió para la muestra HDS3, por lo que las muestras se analizaron utilizando SERS con la línea de excitación láser a 785 nm; sin embargo, solo fue posible obtener resultados con la muestra HDS3 (figura 47a), para la que obtiene el espectro SERS correspondiente al colorante Negro de Sudán B (SBB) [140]. El espectro Raman (633 nm) del colorante (figura 47b) presenta un perfil similar obtenido al del espectro SERS de la muestra.



**Figura 47.** Espectro SERS de la muestra HDS3 (a) y Raman del colorante Negro de Sudán B (b).

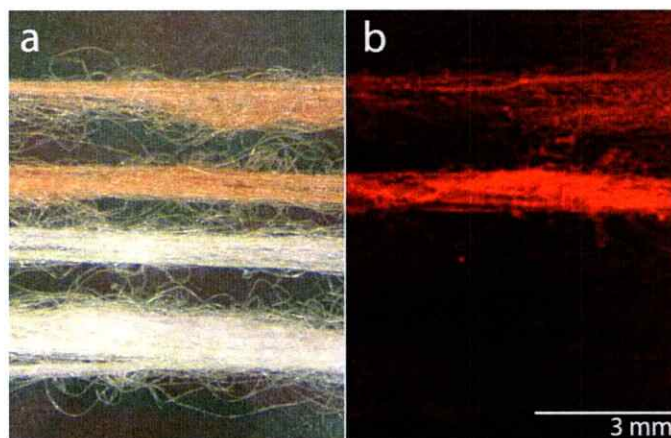
El SBB aparece mencionado por primera vez en una patente de 1913 [141], por lo que su uso como colorante para la tinción de textiles es altamente probable. Este tipo de colorantes, bajo ciertas condiciones se podría metabolizar en sustancias carcinógenas por lo que el uso de algunos tipos de Negro de Sudán está prohibido en comestibles [142, 143]. La comparación entre el espectro Raman y el SERS obtenido muestra diferencias en las frecuencias obtenidas, a pesar que el perfil espectral es similar. Es altamente probable que las modificaciones observadas se deban a la interacción que existe entre la seda y el SBB, pero como no se puede obtener información de la componente vibracional de la seda, esta interacción queda adscrita a la interpretación de las modificaciones en el espectro del colorante.

#### *4.5.3. Muestras de seda teñidas con Az.*

En los espectros SERS con AgNPs se obtiene un fondo de fluorescencia. Esto es común para casi todas las fibras teñidas con mordiente; en aquellas muestras en que el colorante se une directamente a la fibra es posible obtener espectros de los colorantes en las muestras como se pudo observar para las sedas teñidas negras. Esto indica que el teñido con mordiente induce la formación de especies cuya información vibracional queda enmascarada incluso para las metodologías SERS normales. En HPLC las muestras son tratadas con procesos de extracción para los cuales mucha de la información se pierde por los solventes utilizados y que necesitan cantidades de muestra excesivas para obtener información útil, como se discutió en el punto 2.5. Para

sobreponerse a este problema, se ha reportado en la literatura la hidrólisis no extractiva utilizando vapores de ácido fluorhídrico (HF) para romper la unión entre el colorante y el mordiente [94]; esto ha permitido la obtención de espectros SERS en muestras que anteriormente no presentaban espectro SERS en condiciones normales.

La fijación del aluminio a la muestra de seda teñida utilizando alumbre como mordiente queda demostrada en el mapa de  $\mu$ -XRF que muestra la intensidad de la señal  $K_{\alpha}$  de Al (figura 48). El instrumento utilizado resulta particularmente útil como una aproximación no destructiva; sin embargo, se encuentra limitado al tamaño y la manipulación de la muestra, que es analizada dentro de una cámara en condiciones de vacío.

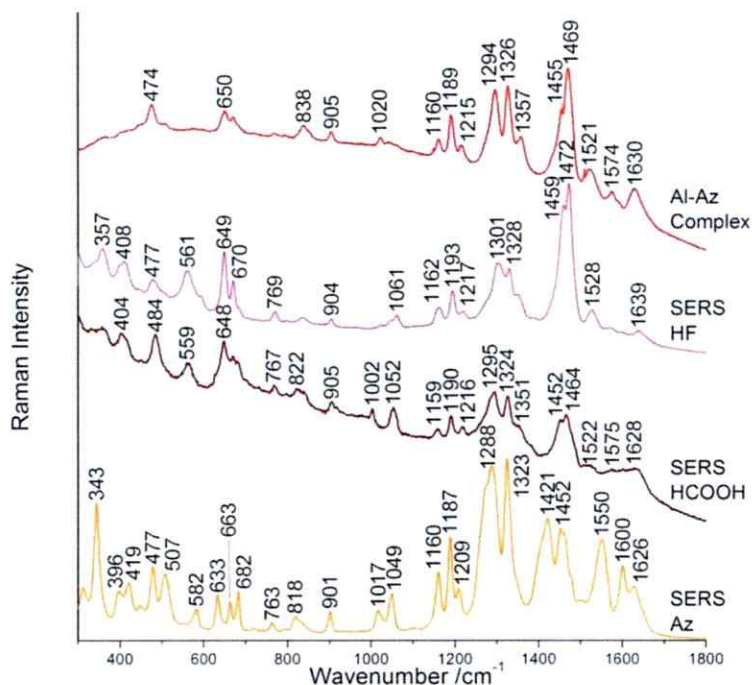


**Figura 48.** (a) Imagen óptica de las muestras de seda desgomada (blancas, abajo) y de seda mordentada con alumbre y teñida con Az (rojas, arriba). (b) Imagen obtenida al graficar en rojo la intensidad de la señal  $K_{\alpha}$  de Al.

Las muestras preparadas de acuerdo al punto 3.7.3 fueron expuestas a vapores de HF y también de ácido fórmico (HCCOH), para evaluar la posibilidad

de usar un ácido menos peligroso en este tipo de procedimientos. Los espectros SERS después de la exposición a ambos ácidos muestran resultados similares (figura 49). En ambos es posible obtener el espectro SERS de la Az producto de la extracción, por lo que la ruptura del complejo formado entre el metal y los O unidos a las posiciones (1) y (9) de la Az se confirmaría; sin embargo, en muchas de las mediciones también se encontraron evidencias del complejo entre Az y Al. Esto puede indicar que los vapores de HF y HCOOH son capaces de romper la unión entre el mordiente y la fibra, y que por lo tanto la información vibracional del complejo Al-Az sería equivalente a la del complejo Al-Az<sub>2</sub> donde el centro de Al genera un punto de simetría en el que vibracionalmente ambos lados son equivalentes generando un espectro muy similar entre ellos. Otra posibilidad es que la interacción entre el mordiente y la fibra sea más débil que entre el mordiente y el colorante, y por lo tanto el complejo (o pigmento en este caso) se formaría directamente dentro de la estructura de la fibra. Esta segunda posibilidad implica que en algunas zonas de la proteína el metal forma un enlace más afín con la fibra y que hay otros puntos donde el metal es más afín al colorante formando únicamente el complejo. Si lo anterior es cierto, se podría explicar las variaciones en la intensidad de la señal del aluminio a lo largo de una misma muestra de fibras teñidas (figura 48b) en relación a la capacidad de la fibra de retener al metal y a la aparición de los espectros SERS correspondientes al complejo de Al-Az.

Los agentes de hidrólisis no extractiva presentarían entonces efectos adicionales a la ruptura del complejo entre el metal y el colorante, como la exposición de zonas superficiales de la fibra teñida en las que se formó sólo el complejo metálico, de acuerdo a las posibilidades planteadas previamente. Sin embargo, y considerando todo lo anterior, es posible afirmar que independiente del mecanismo de acción la hidrólisis no extractiva, este procedimiento puede generar las rupturas necesarias para liberar tanto al colorante del mordiente como al complejo metálico de la fibra.

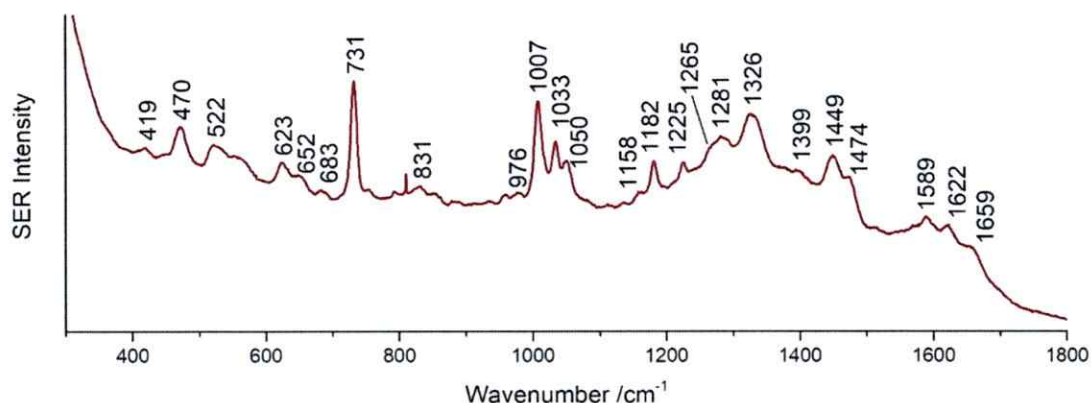


**Figura 49.** Espectros SERS (785nm) de la Az, SERS de una seda teñida tratada con HCOOH, con HF y espectro Raman del complejo Al-Az.

Se realizó el mismo procedimiento de hidrólisis no extractiva con HF para obtener el espectro SERS desde una fibra de lana teñida con la planta *Galium*



*hypocarpium* de la colección fabricada por Max Saltzman [31]. El espectro obtenido (figura 50) no calza exactamente con los espectros SERS que se obtienen para los colorantes puros (figura 32); sin embargo, algunas de las señales indican la presencia de Pu (522, 652, 976, 1225 y 1326  $\text{cm}^{-1}$ )

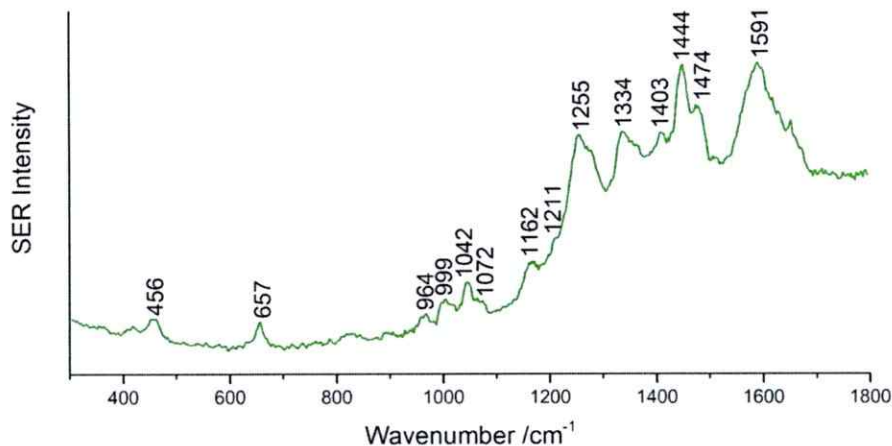


**Figura 50.** Espectro SERS (785 nm) de una fibra de lana teñida con *Galium hypocarpium*.

Adicionalmente se observan señales que no concuerdan específicamente con ninguno de los colorantes presentados en la figura 32. En el espectro SERS obtenido con la línea de excitación láser a 514 nm (figura 51), se observan diferencias con respecto al espectro en la figura 50, las que podrían ser explicadas por heterogeneidades parciales en la muestra, es decir, una fibra no necesariamente debe contener exactamente la misma composición en toda su extensión.

El espectro obtenido con la línea láser a 514 nm presenta semejanzas importantes con el espectro de la pseudopurpurina (Pp), a pesar que aún es posible observar señales de Pu. La identificación del espectro SERS del

colorante Pp por Rambaldi et al [144] ha sido una enorme contribución a la interpretación de este tipo de muestras como se mostrará en el punto 4.5.4.

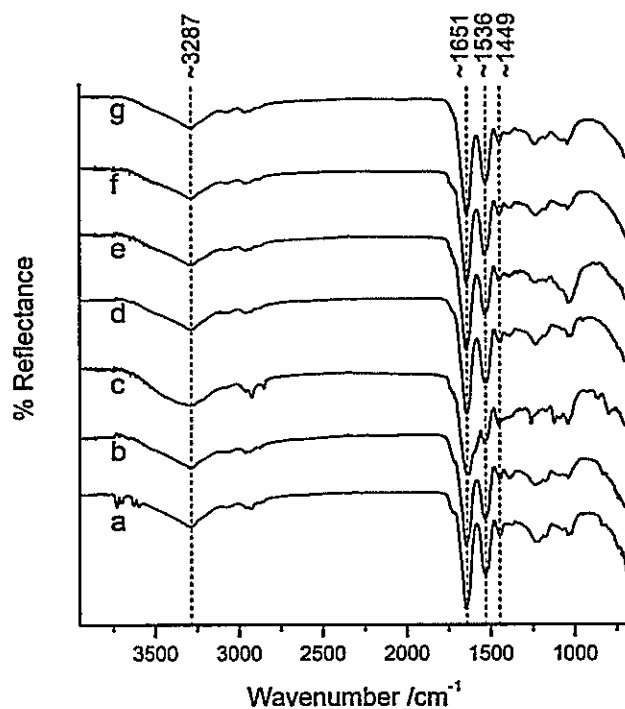


**Figura 51.** Espectro SERS (514 nm) de una fibra de lana teñida con *Galium hypocarpium*.

#### 4.5.4. Textiles arqueológicos

Se analizaron muestras provenientes textiles excavados de dos contextos arqueológicos distintos siguiendo la metodología de hidrólisis no extractiva. El primer grupo corresponde a muestras del complejo arqueológico de San Pedro de Atacama (SPA) [145], que corresponden a fibras de colores azules y rojas provenientes de distintas tumbas ubicadas en distintos sitios dentro del complejo. En una primera instancia se analizaron las fibras por ATR-IR para identificar la naturaleza de las fibras, encontrándose que todas son de naturaleza proteica. En la figura 52 es posible observar los espectros ATR-IR de algunas de las muestras, en las que por la ubicación de las señales de las amidas indican que se trataría de algún tipo de lana.

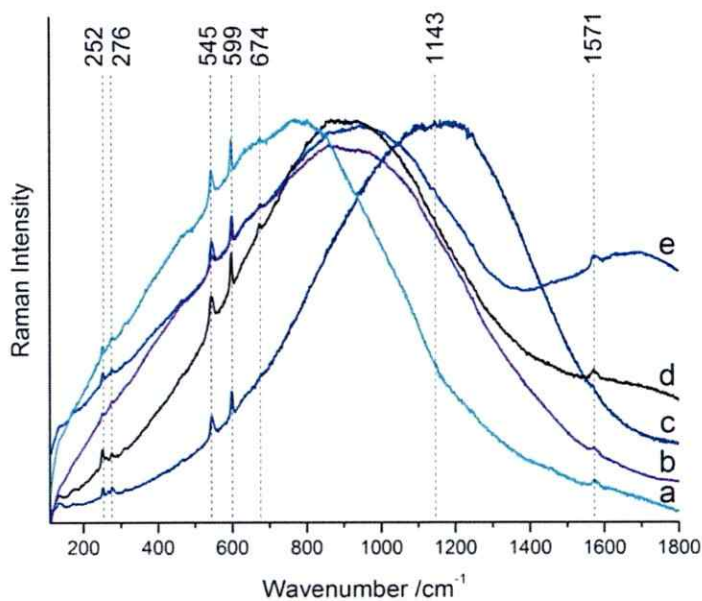
En la figura 53 se observan los espectros Raman de muestras azules provenientes de textiles excavados de las tumbas 4091, 3928 del sitio Coyo Oriente (figuras 53a y 53b), de la tumba 28 del sitio Solor-3 (figura 53d) y de la tumba 2457 del sitio Quito-6 (figura 53e), comparadas con un patrón de índigo sintético (figura 53c). Otras muestras que presentan el índigo, pero que no están en la figura 53 provienen de las tumbas, 2532 y 2788 del sitio Quito-6 y de la tumba 3445 del sitio Quito-1.



**Figura 52.** Espectros ATR-IR de las muestras provenientes de las tumbas 30 del sitio Solor-3 (a), 20 del sitio Solcor-3 (b), 2532 (c) y 2432 (d) del sitio Quito-6, y 3928 (e), 3926 (f) y 4091 (g) del sitio Coyo Oriente.

Si bien el fondo de fluorescencia es significativo, las señales del índigo se observan sin dificultad en las frecuencias señaladas. Las señales marcadas

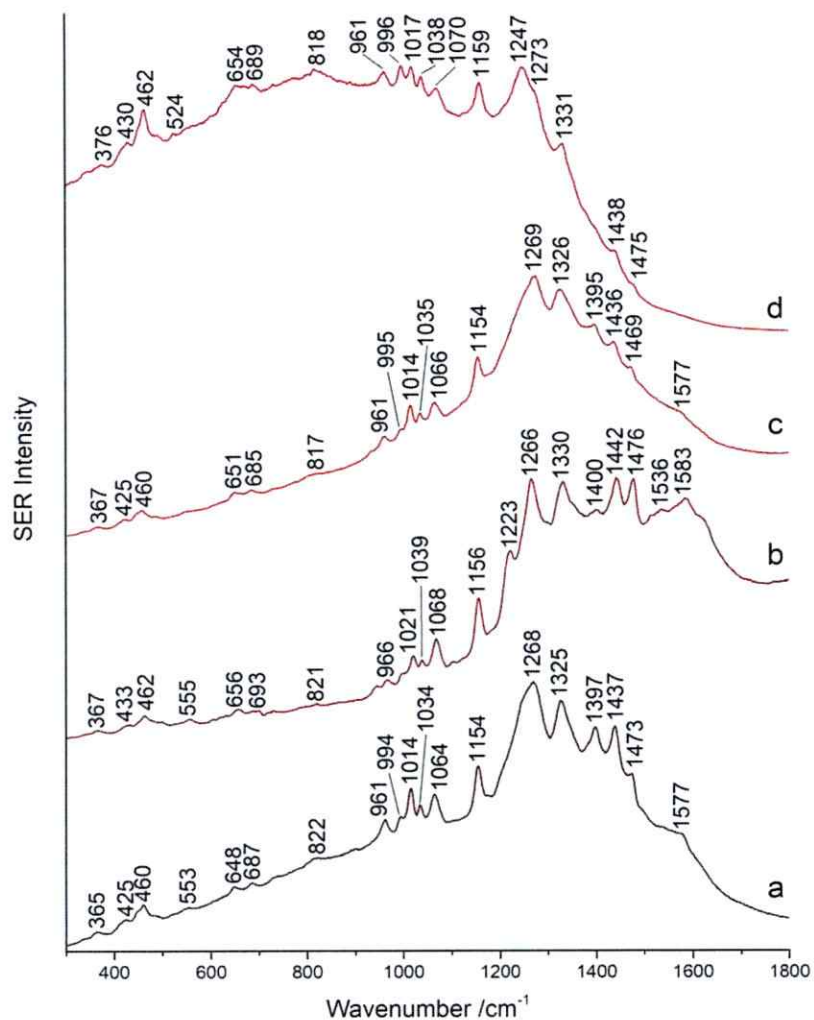
se pueden asignar al  $\nu$  C=C ( $1571\text{ cm}^{-1}$ ),  $\delta$  C-H en el plano ( $1143\text{ cm}^{-1}$ ), y  $\delta$  de los anillos en el plano ( $674$ ,  $599$ ,  $545$  y  $245\text{ cm}^{-1}$ ) y fuera del plano ( $276\text{ cm}^{-1}$ ) [146].



**Figura 53.** Espectros Raman de muestras azules provenientes de las tumbas 4091 (a) y 3928 (b) del sitio Coyo Oriente, de un patrón de índigo sintético (c), de la tumba 28 del sitio Solor-3 (d) y de la tumba 2457 del sitio Quitor-6 (e).

Para las fibras de color rojo del complejo SPA se logró identificar a la pseudopurpurina (Pp) como el colorante principal en los espectros SERS (figura 54). Se analizaron muestras provenientes de las tumbas 28 y 30 del sitio Solor-3 y de las tumbas 3928 y 4091 del sitio Coyo Oriente. Las señales obtenidas corresponden con el reportado por Rambaldi et al [144] para Pp. Este colorante corresponde al componente mayoritario de los extractos de raíces de algunas plantas del género *Galium*, utilizadas para teñir textiles y para fabricar pigmentos. En los espectros, además de las señales de Pp es posible observar

señales de Pu que son aquellas en torno a 430, 650, 1066 y 1223  $\text{cm}^{-1}$ . Además de esas señales, es posible observar que la señal en torno a los 1270  $\text{cm}^{-1}$  es dominante con respecto a la esperada para Pp en torno a 1250  $\text{cm}^{-1}$ . Esta última se observa como un hombro en los espectros a, b y c de la figura 54.



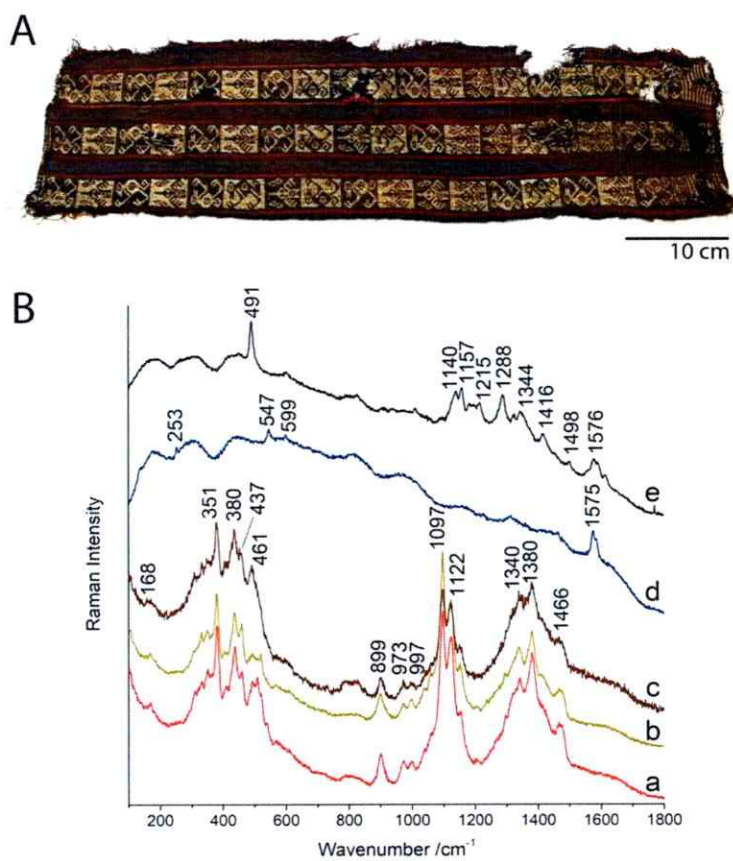
**Figura 54.** Espectros SERS de las muestras provenientes de las tumbas 28 (a) y 30 (b) del sitio Solor-3 y de las tumbas 3928 (c) y 4091 (d) del sitio Coyo Oriente.

La información de los colorantes rojos resulta de gran importancia para la correcta caracterización de los colorantes utilizados. Esto porque la



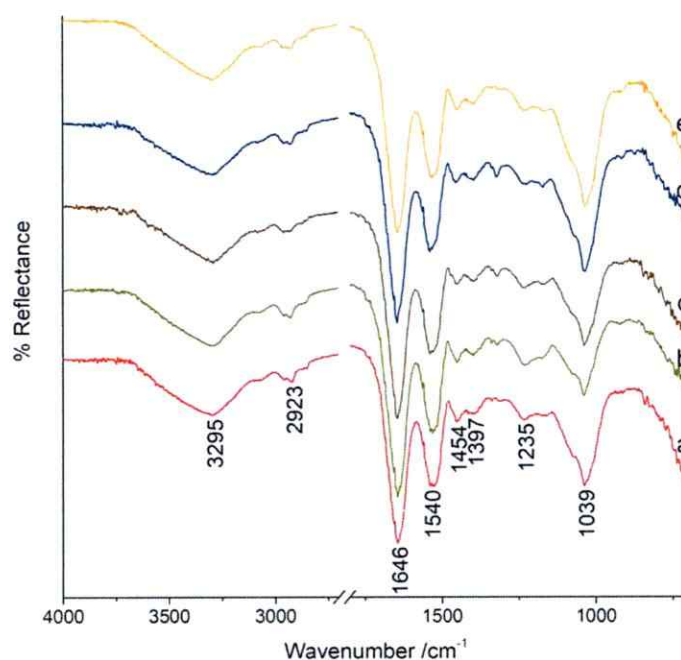
metodología utilizada presenta la identificación exitosa de un colorante que para el mismo grupo de muestras no fue identificado en un estudio previo [147], en el que el procedimiento de extracción en metanol ácido provoca la descarboxilación de la Pp generando Pu.

Se analizaron también algunas fibras coloreadas de una bolsa-faja del período formativo de la cultura Arica perteneciente al Museo Chileno de Arte Precolombino (figura 55A).



**Figura 55.** A. Bolsa-faja cultura Arica. B. Espectros Raman de las muestras B01 (a), B02 (b), B03 (c), B04 (d) y B05 (e).

Las muestras corresponden a muestras de color rojo (B01), amarillo (B02), marrón (B03), azul (B04) y naranja (B05). Además de los intensos fondos de fluorescencia obtenidos en la mayoría de los espectros Raman, en las muestras B01, B02 y B03 se identifica la presencia de celulosa (figura 55B a-c) [57, 58], lo que se contradice con el tipo fibra del objeto que por ATR-IR se determinó como fibra de origen animal en todas las muestras (figura 56). La señal que se observa a  $1039\text{ cm}^{-1}$  con intensidad media, correspondería a una mezcla de aluminosilicatos en la que el principal sería la ortoclasa ( $\text{KAlSi}_3\text{O}_8$ ) [148].



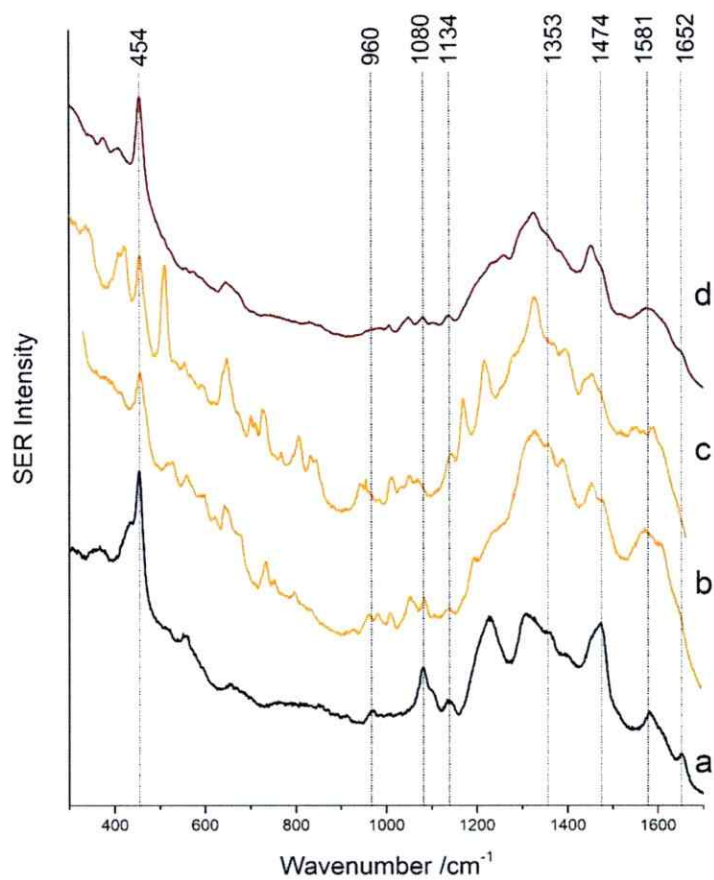
**Figura 56.** Espectros ATR-IR de las muestras B01 (a), B02 (b), B03 (c), B04 (d) y B05 (e).

La explicación más probable para la presencia de la celulosa observada por Raman es la aplicación de algún material de conservación, para limpieza o consolidación, que dejó residuos no detectables a ojo desnudo. En la muestra

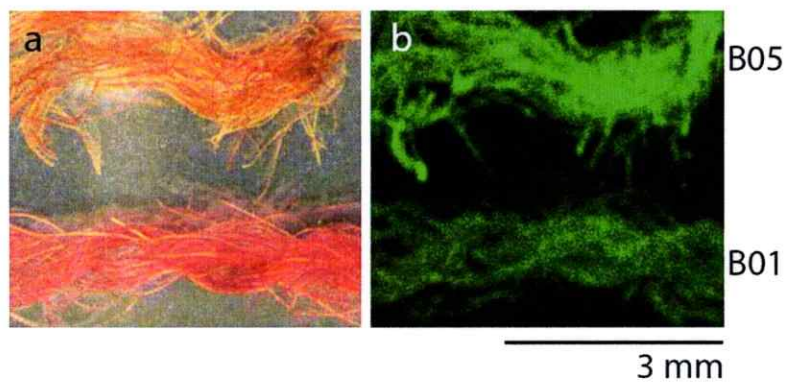
B04 se encontró índigo como colorante principal; sin embargo, este textil muestra presenta un color muy oscuro que a primera vista parece negro. La muestra B05 presenta un espectro Raman muy similar al que se obtiene para el colorante RB5. Esto resulta particularmente llamativo, pues sumado a la presencia de celulosa en algunas de las otras fibras analizadas afirma la idea de que el textil fue sometido a procesos de intervención algo más profundos.

A pesar de las intervenciones detectadas, fue posible obtener el espectro SERS, mediante hidrólisis no extractiva, de los colorantes principales en las muestras B01, B02, B03 y B05. En particular, para la muestra B05 se obtuvieron 2 espectros diferentes que se denominarán como A y B. En la figura 57 se muestra la comparación de los espectros obtenidos de las muestras B01 y B05 con respecto al espectro SERS del CA. Ambas muestras presentan las señales necesarias para identificar positivamente al ácido carmínico como el colorante principal en ambas muestras; sin embargo, ambas muestras presentan diferencias entre ellas y con respecto al SERS del CA. El origen de estas diferencias podría estar asociado al proceso de tinción utilizado originalmente, en particular al uso de distintos materiales como mordiente [31]. En el mapeo elemental de estas muestras (figura 58), es posible observar diferencias en la concentración de silicio presente, lo que concuerda con la intensidad de la señal asignada para el silicato en ATR-IR para estas muestras (figura 56a, e).



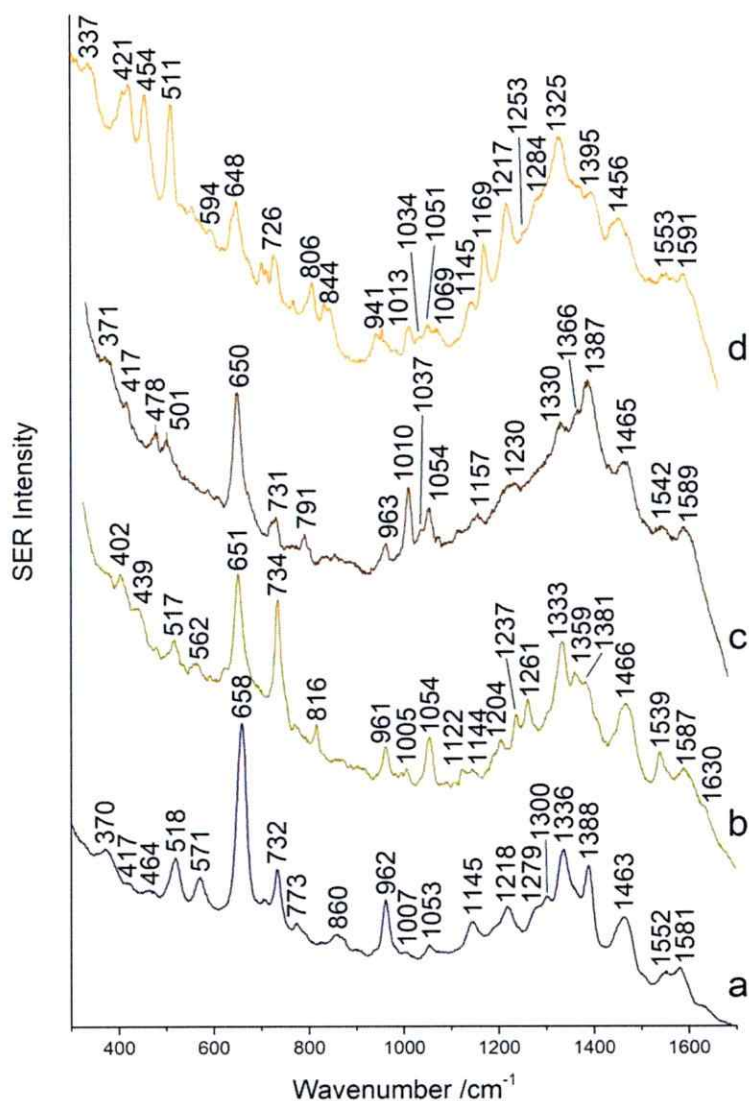


**Figura 57.** Espectros SERS de CA (a) y de las muestras B05A (b), B05B (c) y B01 (d). Las señales marcadas corresponden a aquellas que permiten identificar la presencia de CA.



**Figura 58.** (a) Imagen óptica de las muestras B05 y B01. (b) Imagen obtenida al graficar en verde la intensidad de la señal K $\alpha$  de Si.

Los espectros SERS obtenidos para las muestras B02 y B03 no presentan señales que permitan identificar el colorante directamente como Az, Pu o CA (figura 59). En el espectro de la muestra B02, las señales a 1122, 1381 y 1466  $\text{cm}^{-1}$ , podrían ser debido a la presencia de celulosa detectada con Raman.



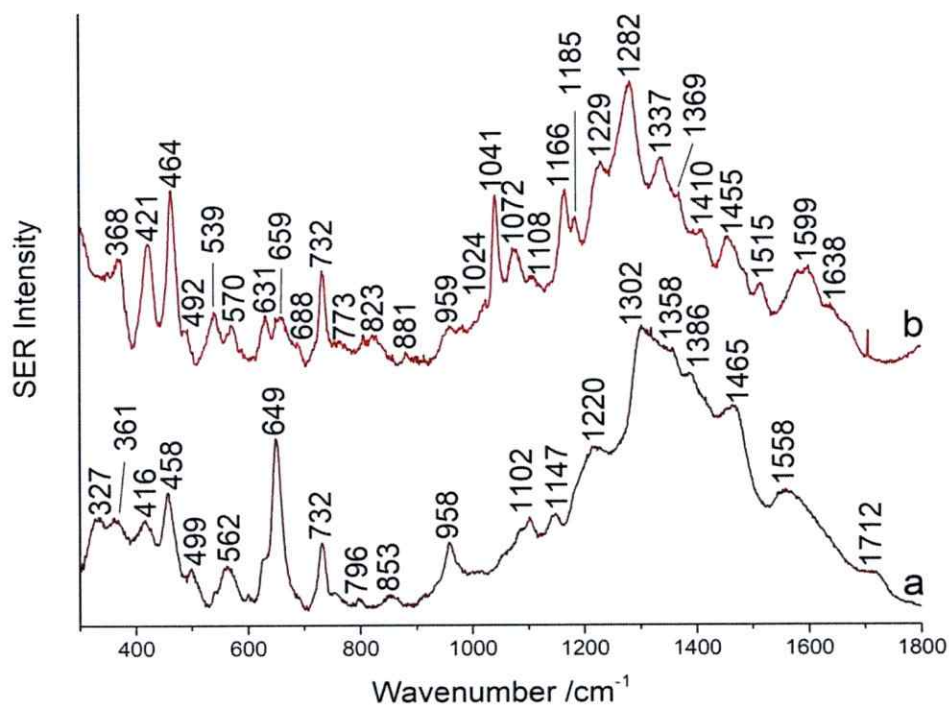
**Figura 59.** Espectros SERS del pigmento laca de cochinilla (*Dactylopius coccus*) y aluminio (a) y de las muestras B02 (b), B03 (c) y B05B (d).

Al comparar el espectro del pigmento laca de cochinilla y aluminio (figura 59a) es posible notar similitudes notables con las muestras B02, B03 y B05B. Esto implica que al igual que en el caso de las muestras de seda teñida con Az, es posible extraer los complejos metálicos de CA desde las fibras, a la vez que se observan otros componentes. En el espectro de la muestra B05B (figura 59d), además de las señales del CA, se observan señales que podrían ser atribuidas a Pu (1553, 1325, 1217, 1169, 1069 y 648  $\text{cm}^{-1}$ ; la señal que se esperaría a 970  $\text{cm}^{-1}$ , aparece con muy baja intensidad y como un hombro de la señal a 941  $\text{cm}^{-1}$ . La presencia de Pu en esta muestra, permite proponer nuevas causas para la diferencia de color observado, entre ellas la tinción simultánea con cochinilla y alguna raíz del género *Galium* o la reutilización del textil, una práctica que se observa habitualmente en textiles arqueológicos.

#### 4.5.5. SERS de extractos acuosos de materiales colorantes

Con el fin de resaltar la necesidad de contar con un cuerpo de información mayor que permita la identificación de una mayor cantidad de componentes al mismo tiempo es que se presentan los espectros SERS con la línea de excitación láser a 785 nm de los extractos acuosos de cochinilla y de raíces de *Galium hypocarpium* (figura 60). Para el caso de la cochinilla el espectro obtenido mantiene la semejanza con el presentado en la figura 32c aunque hay algunas variaciones importantes como la desaparición de la señal a 1080  $\text{cm}^{-1}$  presente en el espectro del CA y la presencia de las señales a 649, 732 y 1712  $\text{cm}^{-1}$  en el caso del extracto.

Para el caso del *Galium hypocarpium* el espectro presenta las señales características de los colorantes Pp (464, 823, 959 y 1041  $\text{cm}^{-1}$ ), Pu (421, 1072, 1166 y 1229  $\text{cm}^{-1}$ ) y Az (631, 659, 688, 1185, 1282, 1455 y 1599  $\text{cm}^{-1}$ ). Es altamente probable que a pesar que las señales coincidan, estas sean producto de alguno de los precursores de los colorantes presentes en los extractos de la planta. Es particularmente interesante, por ejemplo, la aparición de señales que se pueden asignar a Az cuando en general se acepta que la especie *Galium hypocarpium* no debería contener este colorante [149]. Sin embargo, la presencia de la 1-hidroxiantraquinona como estructura base de los precursores podría explicar la coincidencia con algunas de las bandas.



**Figura 60.** Espectros SERS de los extractos acuosos de la cochinilla (*Dactylopius coccus*) (a) y de la planta *Galium hypocarpium* (b).

## 5. CONCLUSIONES

A lo largo del trabajo de tesis se encontró que el sustrato metálico que mejor respuesta entrega para la identificación de colorantes con SERS es el coloide de NPs de Ag propuesto por Lee-Meisel. Sin embargo, la utilización de superficies SERS activas en estado sólido se presenta como una buena alternativa al relacionar la funcionalidad con la facilidad de preparación. Para la obtención de información vibracional desde las fibras proteicas se encontró que el ATR-IR permite la identificación del tipo de fibra a nivel funcional, es decir, permite la toma de decisiones en temas de conservación y catalogación. Sin embargo, a niveles más específicos (diferenciación de especies) puede llevar a errores, principalmente por los tratamientos a los que han sido sometidas las fibras previo a su análisis y por las dificultades experimentales expuestas. Es importante notar en este aspecto, que las técnicas microscópicas son las ideales para la identificación de fibras, pues tienen más acceso a la observación de diferentes descriptores que permiten una correcta clasificación. Sin embargo, la falta de bases de datos y de colecciones publicadas hace que la identificación de especies muy cercanas (como los camélidos andinos) no sea posible.

En este trabajo de tesis se expuso algunos de los factores relacionados con las diferencias que muestran los colorantes al interactuar con las nanopartículas metálicas. La longitud de onda de excitación, además de la longitud de onda del plasmón, deben ser considerados por la posibilidad de generar efectos resonantes al momento de realizar el experimento; esto permite

una mejor interpretación de las variaciones de los espectros SERS con respecto al Raman. Se ha demostrado que existe una dependencia entre el espectro SERS obtenido de un colorante utilizando distintos metales y también del pH del solvente al momento de interactuar. Lo anterior sumado a la aleatoriedad en la disposición de las moléculas sobre las superficies.

Los resultados obtenidos que apuntaron a la caracterización de la interacción entre el metal y las fibras indican que se trataría más bien de una interacción electrostática en la que los iones metálicos difunden hacia el interior de la fibra sin generar cambios en la estructuras secundarias y terciarias más representativas de las proteínas. En el caso particular de las sedas pesadas, todo indica que los iones metálicos inducen la ruptura de la proteína en zonas amorfas puesto que en las fibras degradadas la porción cristalina permanece sin mayores modificaciones de acuerdo a su respuesta vibracional.

La interacción de los colorantes antraquinónicos con los iones metálicos ocurre a través de la formación de complejos de coordinación de tipo quelato, en las que las porciones de la molécula capaces de generar tautómeros ceto-enol se coordinan con el metal formando anillos de 6 miembros. La carga en los en estos sistemas  $\pi$  conjugados se reacomoda de acuerdo a la capacidad de aceptar electrones del metal y de sus energías de campo cristalino. Esta interacción es la responsable de los distintos colores que se observan cuando se usan distintos metales para teñir una fibra o fabricar un pigmento.

Se ha encontrado que la interacción de los colorantes con las NPs es de la misma naturaleza que con los mordientes, pero que en la realización de los experimentos SERS, existen más factores que influyen en la obtención de los espectros; estos factores tienen relación con la aleatoriedad en la disposición de las moléculas sobre las superficies y con la combinación de mecanismos asociados al fenómeno SERS. En particular, y por la naturaleza de la interacción entre este tipo de colorantes y los metales, se deduce que el mecanismo químico es el que más aporta al espectro observado cuando la molécula está libre. Cuando la molécula se encuentra formando un complejo metálico la evidencia muestra que, ante la imposibilidad de interactuar a través del sitio antes descrito, el resultado es el espectro del complejo metálico amplificado.

El método de hidrólisis no extractiva utilizando ácido fórmico mostró excelentes resultados para las fibras teñidas en el laboratorio, obteniéndose la misma información que al utilizar ácido fluorhídrico. En general, se observó que los métodos de extracción generan la separación entre el metal y la molécula, al mismo tiempo que separan al complejo metálico desde la fibra. Esto aumenta la cantidad de información que se puede obtener desde una fibra, sin embargo, esto no implica en la actualidad que esa información pueda ser interpretada, pues la noción que el complejo formado al teñir sería el mismo que se forma al fabricar pigmentos no es explícita.

En vista de los resultados obtenidos desde los textiles arqueológicos es que resalta la importancia de la obtención de espectros SERS de colorantes y complejos metálicos en la mayor cantidad de combinaciones y condiciones posibles. Lo anterior resulta primordial para lograr la identificación correcta de estos compuestos en la mayor cantidad de piezas utilizando la menor cantidad de muestra posible, evitando la descomposición de la muestra. Un claro ejemplo de esto es la identificación de pseudopurpurina en muestras para las que solo estaba reportada la presencia de purpurina.

Este trabajo abre más preguntas que las que intentó responder, aun así, hay cosas que quedan claras, como la necesidad de encontrar una técnica capaz de igualar la potencia del SERS, en términos de cantidad de muestra versus calidad de respuesta, para complementar la caracterización molecular de estos sistemas. En este sentido, la espectrometría de masas con tiempo de vuelo y ionización por desorción láser (LDI-ToF-MS) aparece como una alternativa viable y con un potencial equivalente al SERS.



## 6. Referencias

1. Good, I., *Archaeological Textiles: A Review of Current Research*. Annual Review of Anthropology, 2001. **30**(1): p. 209-226.
2. Calvo, A., *Conservación y restauración de pintura sobre lienzo*. 2002: Ediciones del Serbal.
3. Frank, E., et al., *Fibers, 1. Survey*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
4. Wulfhorst, B., et al., *Textile Technology*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
5. Mondal, M., K. Trivedy, and S.N. Kumar, *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn., - a review*. Caspian Journal of Environmental Sciences, 2007. **5**(2): p. 63-76.
6. Hacke, M., *Weighted silk: history, analysis and conservation*. Reviews in Conservation, 2008. **9**: p. 3-15.
7. Lefèvre, T., M.-E. Rousseau, and M. Pézolet, *Protein Secondary Structure and Orientation in Silk as Revealed by Raman Spectromicroscopy*. Biophysical Journal, 2007. **92**(8): p. 2885-2895.
8. Scheibel, T., H. Zahn, and A. Krasowski, *Silk*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
9. Matsumoto, A., et al., *Silk*, in *Handbook of Fiber Chemistry, Third Edition*. 2006, CRC Press.
10. Perkin, W.H., XIX. *On colouring matters derived from coal tar*. Quarterly Journal of the Chemical Society of London, 1862. **14**(1): p. 230-255.
11. Van Elslande, E., S. Lecomte, and A.-S. Le Hô, *Micro-Raman spectroscopy (MRS) and surface-enhanced Raman scattering (SERS) on organic colourants in archaeological pigments*. Journal of Raman Spectroscopy, 2008. **39**(8): p. 1001-1006.
12. Marcaida, I., et al., *Optimization of sample treatment for the identification of anthraquinone dyes by surface-enhanced Raman spectroscopy*. Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(8): p. 2221-2228.
13. Saxena, S. and A.S.M. Raja, *Natural Dyes: Sources, Chemistry, Application and Sustainability Issues*, in *Roadmap to Sustainable Textiles and Clothing: Eco-friendly Raw Materials, Technologies, and Processing Methods*, S.S. Muthu, Editor. 2014, Springer Singapore: Singapore. p. 37-80.
14. Orna, M.V., *Beyond Perkin*, in *The Chemical History of Color*. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 79-92.
15. Gregory, P., *Classification of Dyes by Chemical Structure*, in *The Chemistry and Application of Dyes*, D.R. Waring and G. Hallas, Editors. 1990, Springer US: Boston, MA. p. 17-47.
16. Jordao, A.K., et al., *Lawsone in organic synthesis*. RSC Advances, 2015. **5**(83): p. 67909-67943.
17. Wouters, J. and N. Rosario-Chirinos, *Dye Analysis of Pre-Columbian Peruvian Textiles with High-Performance Liquid Chromatography and Diode-Array Detection*. Journal of the American Institute for Conservation, 1992. **31**(2): p. 237-255.
18. Roquero Caparrós, A., *Colores y colorantes de América*. Anales del Museo de América 1995. **3**: p. 145-160.
19. Eastaugh, N., et al., *Pigment Compendium: A Dictionary of Historical Pigments*. 2004, Oxford: Elsevier Butterworth-Heinemann. p. 379.
20. Eastaugh, N., et al., *Pigment Compendium: A Dictionary of Historical Pigments*. 2004, Oxford: Elsevier Butterworth-Heinemann. p. 164.
21. Eastaugh, N., et al., *Pigment Compendium: A Dictionary of Historical Pigments*. 2004, Oxford: Elsevier Butterworth-Heinemann. p. 365.

22. Neevel Johan, G., *Phytate: a Potential Conservation Agent for the Treatment of Ink Corrosion Caused by Iron Gall Inks*, in *Restaurator*. 1995. p. 143.
23. Burkinshaw, S.M., *Dye-Fibre Interactions*, in *Physico-chemical Aspects of Textile Coloration*. 2016, John Wiley & Sons, Ltd. p. 167-208.
24. Burkinshaw, S.M., *Physico-chemical Aspects of Textile Coloration*. 2016: John Wiley & Sons, Ltd.
25. Vigo, T.L., *Fundamentals of Dyes and Dyeing Processes for Textiles*. Textile Science and Technology, 1994. **11**: p. 52-111.
26. Burkinshaw, S.M., *Dyes*, in *Physico-chemical Aspects of Textile Coloration*. 2016, John Wiley & Sons, Ltd. p. 65-79.
27. Burkinshaw, S.M. and N. Kumar, *The mordant dyeing of wool using tannic acid and FeSO<sub>4</sub>, Part 1: Initial findings*. *Dyes and Pigments*, 2009. **80**(1): p. 53-60.
28. Orna, M.V., et al., *Coordination Chemistry of Pigments and Dyes of Historical Interest*, in *Coordination Chemistry*. 1994, American Chemical Society. p. 165-176.
29. Schweppe, H. and J. Winter, *Madder and Alizarin*, in *Artists' pigments : a handbook of their history and characteristics.*, E.W. FitzHugh, Editor. 1997, National Gallery of Art ; Archetype Publications: Washington; London. p. 109-142.
30. Stallmann, O., *Use of metal complexes in organic dyes and pigments*. *Journal of Chemical Education*, 1960. **37**(5): p. 220.
31. Saltzman, M., *Identifying Dyes in Textiles*. *American Scientist*, 1992. **80**(5): p. 474-481.
32. Schweppe, H., *Identification of Dyes on Old Textiles*. *Journal of the American Institute for Conservation*, 1979. **19**(1): p. 14-23.
33. Chalmers, J.M., *Mid-Infrared Spectroscopy: Anomalies, Artifacts and Common Errors*, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
34. Landsberg, G. and L. Mandelstam, *Eine neue Erscheinung bei der Lichtzerstreuung in Krystallen*. *Naturwissenschaften*, 1928. **16**(28): p. 557-558.
35. Raman, C.V. and K. Krishnan, *A new type of secondary radiation*. *Nature*, 1928. **121**(3048): p. 501-502.
36. Johnson, B.B. and W.L. Peticolas, *The Resonant Raman Effect*. *Annual Review of Physical Chemistry*, 1976. **27**(1): p. 465-521.
37. Mukerji, I., *Resonance Raman Spectroscopy*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
38. Efremov, E.V., F. Ariese, and C. Gooijer, *Achievements in resonance Raman spectroscopy review of a technique with a distinct analytical chemistry potential*. *Anal Chim Acta*, 2008. **606**(2): p. 119-34.
39. Fleischmann, M., P.J. Hendra, and A.J. McQuillan, *Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*. *Chemical Physics Letters*, 1974. **26**(2): p. 163-166.
40. Jeanmaire, D.L. and R.P. Van Duyne, *Surface raman spectroelectrochemistry*. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1977. **84**(1): p. 1-20.
41. Albrecht, M.G. and J.A. Creighton, *Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode*. *Journal of the American Chemical Society*, 1977. **99**(15): p. 5215-5217.
42. Kneipp, K., et al., *Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)*. *Physical Review Letters*, 1997. **78**(9): p. 1667-1670.
43. Jensen, L., C.M. Aikens, and G.C. Schatz, *Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering*. *Chemical Society Reviews*, 2008. **37**(5): p. 1061-1073.
44. Fromm, D.P., et al., *Exploring the chemical enhancement for surface-enhanced Raman scattering with Au bowtie nanoantennas*. *The Journal of Chemical Physics*, 2006. **124**(6): p. 061101.
45. Boyd, G.T., et al., *Local-field enhancement on rough surfaces of metals, semimetals, and semiconductors with the use of optical second-harmonic generation*. *Physical Review B*, 1984. **30**(2): p. 519-526.
46. Duyne, R.P.V., J.C. Hulst, and D.A. Treichel, *Atomic force microscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy. I. Ag island films and Ag film over polymer nanosphere surfaces supported on glass*. *The Journal of Chemical Physics*, 1993. **99**(3): p. 2101-2115.

47. Moskovits, M., *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: a Brief Perspective*, in *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications*, K. Kneipp, M. Moskovits, and H. Kneipp, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-17.
48. Jeon, T.Y., et al., *Nanostructured plasmonic substrates for use as SERS sensors*. *Nano Convergence*, 2016. **3**(1): p. 18.
49. Lee, P.C. and D. Meisel, *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. *The Journal of Physical Chemistry*, 1982. **86**(17): p. 3391-3395.
50. Leopold, N. and B. Lendl, *A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003. **107**(24): p. 5723-5727.
51. Stiles, P.L., et al., *Surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Annual review of analytical chemistry*, 2008. **1**: p. 601-26.
52. Aroca, R., *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. 2006, Chichester, UK: Sons.
53. Willets, K.A. and R.P. Van Duyne, *Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing*. *Annu Rev Phys Chem*, 2007. **58**: p. 267-97.
54. García-Ramos, J., *Mecanismo Electromagnético del efecto SERS*. *Óptica pura y aplicada*, 2004. **37**(2): p. 17-22.
55. Kneipp, K., *Surface-enhanced Raman scattering*. Print edition, 2007. **60**(11): p. 40-46.
56. Moskovits, M., *Surface-enhanced spectroscopy*. *Reviews of Modern Physics*, 1985. **57**(3): p. 783-826.
57. Edwards, H.G.M., et al., *Preliminary Study of the Application of Fourier Transform Raman Spectroscopy to the Analysis of Degraded Archaeological Linen Textiles*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1996. **27**(9): p. 663-669.
58. Edwards, H.G.M., D.W. Farwell, and A.C. Williams, *FT-Raman spectrum of cotton: a polymeric biomolecular analysis*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1994. **50**(4): p. 807-811.
59. Hogg, L.J., et al., *FT Raman spectroscopic studies of wool*. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 1994. **110**(5-6): p. 196-199.
60. Carter, E.A., et al., *FT-Raman spectroscopy of wool—I. Preliminary studies*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1994. **50**(11): p. 1927-1936.
61. Peets, P., et al., *Identification and classification of textile fibres using ATR-FT-IR spectroscopy with chemometric methods*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017. **173**: p. 175-181.
62. Garside, P. and P. Wyeth, *Identification of Cellulosic Fibres by FTIR Spectroscopy Differentiation of Flax and Hemp by Polarized ATR FTIR*. *Studies in Conservation*, 2006. **51**(3): p. 205-211.
63. Taddei, P., et al., *Raman study of poly(alanine-glycine)-based peptides containing tyrosine, valine, and serine as model for the semicrystalline domains of Bombyx mori silk fibroin*. *Biopolymers*, 2004. **75**(4): p. 314-324.
64. Aguayo, T., et al., *A vibrational approach for the study of historical weighted and dyed silks*. *Journal of Molecular Structure*, 2014. **1075**(0): p. 471-478.
65. Garside, P., S. Lahlil, and P. Wyeth, *Characterization of Historic Silk by Polarized Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Informed Conservation*. *Applied Spectroscopy*, 2005. **59**(10): p. 1242-1247.
66. Garside, P. and P. Wyeth, *Crystallinity and degradation of silk: correlations between analytical signatures and physical condition on ageing*. *Applied Physics A*, 2007. **89**(4): p. 871-876.
67. Garside, P., et al., *An Investigation of Weighted and Degraded Silks by Complementary Microscopy Techniques*. *e-PRESERVATION Science*, 2014. **11**: p. 15-21.
68. Derrick, M.R., D. Stulik, and J.M. Landry, *Infrared spectroscopy in conservation science*. 1999: Getty Publications.

69. Bell, I.M., R.J.H. Clark, and P.J. Gibbs, *Raman spectroscopic library of natural and synthetic pigments (pre- approximately 1850 AD)*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1997. **53A**(12): p. 2159-79.
70. Aliatis, I., et al., *Green pigments of the Pompeian artists' palette*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2009. **73**(3): p. 532-8.
71. Bouchard, M. and D.C. Smith, *Catalogue of 45 reference Raman spectra of minerals concerning research in art history or archaeology, especially on corroded metals and coloured glass*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003. **59**(10): p. 2247-2266.
72. Burgio, L., D. Ciomartan, and R.J.H. Clark, *Raman microscopy study of the pigments on three illuminated Mediaeval Latin manuscripts*. Journal of Raman Spectroscopy, 1997. **28**(2-3): p. 79-83.
73. Castro, K., et al., *On-line FT-Raman and dispersive Raman spectra database of artists' materials (e-VISART database)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **382**(2): p. 248-258.
74. Clark, R.J.H., *Raman microscopy: application to the identification of pigments on medieval manuscripts*. Chemical Society Reviews, 1995. **24**(3): p. 187-196.
75. Clark, R.J.H., *Raman microscopy as a structural and analytical tool in the fields of art and archaeology*. Journal of Molecular Structure, 2007. **834-836**: p. 74-80.
76. Ropret, P., et al., *Advances in Raman mapping of works of art*. Journal of Raman Spectroscopy, 2010. **41**(11): p. 1462-1467.
77. Scherrer, N.C., et al., *Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2009. **73**(3): p. 505-24.
78. Vandenabeele, P., *Raman spectroscopy in art and archaeology*. Journal of Raman Spectroscopy, 2004. **35**(89): p. 607-609.
79. Vandenabeele, P., H.G.M. Edwards, and L. Moens, *A Decade of Raman Spectroscopy in Art and Archaeology*. Chemical Reviews, 2007. **107**(3): p. 675-686.
80. Vandenabeele, P., et al., *Raman spectroscopic database of azo pigments and application to modern art studies*. Journal of Raman Spectroscopy, 2000. **31**(6): p. 509-517.
81. Fremout, W. and S. Saverwyns, *Identification of synthetic organic pigments: the role of a comprehensive digital Raman spectral library*. Journal of Raman Spectroscopy, 2012. **43**(11): p. 1536-1544.
82. Price, B.A. and B. Pretzel, *Infrared and Raman Users Group Spectral Database*. 2007, IRUG: Philadelphia.
83. Wouters, J. and A. Verhecken, *The coccid insect dyes: hplc and computerized diode-array analysis of dyed yarns*. Studies in Conservation, 1989. **34**(4): p. 189-200.
84. Sanyova, J. and J. Reisse, *Development of a mild method for the extraction of anthraquinones from their aluminum complexes in madder lakes prior to HPLC analysis*. Journal of Cultural Heritage, 2006. **7**(4): p. 229-235.
85. Zhang, X. and R.A. Laursen, *Development of Mild Extraction Methods for the Analysis of Natural Dyes in Textiles of Historical Interest Using LC-Diode Array Detector-MS*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(7): p. 2022-2025.
86. Wang, W., et al., *Rapid separation and on-line detection by coupling high performance liquid chromatography with surface-enhanced Raman spectroscopy*. RSC Adv., 2015. **5**(59): p. 47640-47646.
87. Zaffino, C., et al., *Online coupling of high-performance liquid chromatography with surface-enhanced Raman spectroscopy for the identification of historical dyes*. Journal of Raman Spectroscopy, 2016. **47**(5): p. 607-615.
88. Abrahams, D.H. and S.M. Edelstein, *A new method for the analysis of ancient dyed textiles*. American Dyestuff Reporter, 1964. **53**: p. 19-25.
89. Martoglio, P.A., et al., *Unlocking the secrets of the past: the analysis of archaeological textiles and dyes*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(21): p. 1123A-1128A.

90. Marinkovic, N.S. and M.R. Chance, *Synchrotron Infrared Microspectroscopy*, in *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
91. Chen, K., M. Leona, and T. Vo-Dinh, *Surface-enhanced Raman scattering for identification of organic pigments and dyes in works of art and cultural heritage material*. *Sensor Review*, 2007. **27**(2): p. 109-120.
92. Pozzi, F. and M. Leona, *Surface-enhanced Raman spectroscopy in art and archaeology*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2016. **47**(1): p. 67-77.
93. Wustholz, K., et al., *Surface-enhanced Raman spectroscopy of dyes: from single molecules to the artists' canvas*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009. **11**(34): p. 7350-7359.
94. Leona, M., J. Stenger, and E. Ferloni, *Application of surface enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006. **37**(10): p. 981-992.
95. Kiel, E.G. and P.M. Heertjes, *Metal Complexes of Alizarin I—The Structure of the Calcium–Aluminium Lake of Alizarin*. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 1963. **79**(1): p. 21-27.
96. Kubelka, P. and F. Munk, *Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche*. *Zeitschrift fur technische Physik*, 1931. **12**: p. 593-601.
97. Grazia, C., et al., *Photophysical properties of alizarin and purpurin Al(III) complexes in solution and in solid state*. *Photochem Photobiol Sci*, 2011. **10**(7): p. 1249-54.
98. Garside, P., P. Wyeth, and X. Zhang, *Understanding the ageing behaviour of nineteenth and twentieth century tin-weighted silks*. *Journal of the Institute of Conservation*, 2010. **33**(2): p. 179-193.
99. Cao, T.T., Y.J. Wang, and Y.Q. Zhang, *Effect of Strongly Alkaline Electrolyzed Water on Silk Degumming and the Physical Properties of the Fibroin Fiber*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e65654.
100. Chan, G.H., et al., *Plasmonic Properties of Copper Nanoparticles Fabricated by Nanosphere Lithography*. *Nano Letters*, 2007. **7**(7): p. 1947-1952.
101. Schatz, G.C. and R.P. Van Duyne, *Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Spectroscopy*, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
102. Garrido, C., G. Diaz-Fleming, and M.M. Campos-Vallette, *SERS spectrum of gallic acid obtained from a modified silver colloid*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016. **163**: p. 68-72.
103. Kong, J. and S. Yu, *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007. **39**(8): p. 549-559.
104. Aliaga, A.E., et al., *Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies of the C-terminal peptide of the  $\beta$ -subunit human chorionic gonadotropin without linked carbohydrates*. *Biopolymers*, 2011. **95**(2): p. 135-143.
105. Garrido, C., et al., *Interaction of the C-terminal peptide from pigeon cytochrome C with silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study*. *Vibrational Spectroscopy*, 2012. **61**(Supplement C): p. 94-98.
106. Cárcamo, J.J., et al., *Proline and hydroxyproline deposited on silver nanoparticles. A Raman, SERS and theoretical study*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2012. **43**(6): p. 750-755.
107. Zhu, G., et al., *Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011. **78**(3): p. 1187-1195.
108. Frushour, B.G. and J.L. Koenig, *Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin*. *Biopolymers*, 1975. **14**(2): p. 379-391.
109. Monti, P., et al., *Raman spectroscopic characterization of Bombyx mori silk fibroin: Raman spectrum of Silk I*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2001. **32**(2): p. 103-107.
110. Martel, A., et al., *Silk Fiber Assembly Studied by Synchrotron Radiation SAXS/WAXS and Raman Spectroscopy*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(50): p. 17070-17074.

111. Aguayo, T., et al., *Raman and surface enhanced Raman scattering of a black dyed silk*. Journal of Raman Spectroscopy, 2013. **44**(9): p. 1238-1245.
112. Monti, P., et al., *Vibrational spectroscopic study of sulphated silk proteins*. Journal of Molecular Structure, 2007. **834**(Supplement C): p. 202-206.
113. Barth, A., *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2007. **1767**(9): p. 1073-1101.
114. Janković, I.A., et al., *New Hybrid Properties of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Surface Modified With Catecholate Type Ligands*. Nanoscale Research Letters, 2010. **5**(1): p. 81-88.
115. Senvaitiene, J., A. Beganskiene, and A. Kareiva, *Spectroscopic evaluation and characterization of different historical writing inks*. Vibrational Spectroscopy, 2005. **37**(1): p. 61-67.
116. Lee, A.S., P.J. Mahon, and D.C. Creagh, *Raman analysis of iron gall inks on parchment*. Vibrational Spectroscopy, 2006. **41**(2): p. 170-175.
117. Mahadevi, A.S. and G.N. Sastry, *Cation- $\pi$  Interaction: Its Role and Relevance in Chemistry, Biology, and Material Science*. Chemical Reviews, 2013. **113**(3): p. 2100-2138.
118. Miliani, C., A. Romani, and G. Favaro, *A spectrophotometric and fluorimetric study of some anthraquinoid and indigoid colorants used in artistic paintings*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1998. **54**(4): p. 581-588.
119. Baran, A., et al., *Analysis of alizarin by surface-enhanced and FT-Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2009. **40**(4): p. 436-441.
120. Cañamares, M., et al., *Surface-enhanced Raman scattering study of the adsorption of the anthraquinone pigment alizarin on Ag nanoparticles*. Journal of Raman Spectroscopy, 2004. **35**: p. 921-927.
121. Cañamares, M.V., et al., *Surface-enhanced Raman scattering study of the anthraquinone red pigment carminic acid*. Vibrational Spectroscopy, 2006. **40**(2): p. 161-167.
122. Cañamares, M.V., et al., *Surface-enhanced Raman scattering study of the interaction of red dye alizarin with ovalbumin*. Biopolymers, 2006. **82**(4): p. 405-409.
123. Whitney, A.V., R.P. Van Duyne, and F. Casadio, *An innovative surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) method for the identification of six historical red lakes and dyestuffs*. Journal of Raman Spectroscopy, 2006. **37**(10): p. 993-1002.
124. DelMedico, A., et al., *Linkage Isomers of Ruthenium Alizarin Complexes*. Inorganic Chemistry, 1994. **33**(8): p. 1583-1584.
125. DelMedico, A., W.J. Pietro, and A.B.P. Lever, *Linkage isomers of alizarin-bis(bipyridine)ruthenium(II)*. Inorganica Chimica Acta, 1998. **281**(2): p. 126-133.
126. Hovaneissian, M., P. Archier, and C. Vieillescazes, *Influence of cetophenolic and diphenolic intramolecular hydrogen bonding on the chromatographic and spectroscopic properties of hydroxyanthraquinones*. Dyes and Pigments, 2007. **74**(3): p. 706-712.
127. Bernede, J.C., et al., *Is a hydrogen bond responsible for the optical properties of some dihydroxyanthraquinones: Quinizarin and anthraflavic?* Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1995. **56**(9): p. 1239-1251.
128. Shadi, I.T., et al., *Semi-quantitative analysis of alizarin and purpurin by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy(SERRS) using silver colloids*. Journal of Raman Spectroscopy, 2004. **35**(89): p. 800-807.
129. Jaworska, Z., C.I. Jose, and T. Urbanski, *Nature of metal complexes of 1-hydroxyanthraquinone*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy, 1974. **30**(5): p. 1161-1165.
130. Abbott, L.C., et al., *Resonance Raman and UV-visible spectroscopy of black dyes on textiles*. Forensic Science International, 2010. **202**(1): p. 54-63.
131. Buzzini, P., *L'application de la spectrométrie Raman en criminalistique pour l'analyse du colorant des fibres textiles en acrylique, coton et laine*. 2007, Université de Liège: Liège.
132. Lin-Vien, D., et al., *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. 1991: Academic Press Boston.
133. Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 2004, New York: John Wiley & Sons Inc.

134. Sabatini, F., et al., *A Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Method for the Identification of Anthraquinones: the Case of Historical Lakes*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2016. **27**(11): p. 1824-1834.
135. Soltzberg, L.J., et al., *MALDI-TOF mass spectrometric identification of dyes and pigments*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**(11): p. 2001-6.
136. Van Elslande, E., et al., *Analysis of ancient Greco-Roman cosmetic materials using laser desorption ionization and electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2008. **390**(7): p. 1873-9.
137. Del Río García, A.I., *Estudio de la Reducción, Oxidación y Oxido-Reducción Electroquímica Aplicado a la Decoloración/Degradación de Aguas de Tinturas Textiles que Contienen Colorantes Reactivos con Grupos Funcionales Azo como Cromóforo*. 2011, Universidad Politécnica de Valencia.
138. Garrido, C., et al., *Adsorption of oligopeptides on silver nanoparticles: surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies*. Journal of Raman Spectroscopy, 2010. **41**(10): p. 1149-1155.
139. Taddei, P., et al., *IR study on the binding mode of metal cations to chemically modified Bombyx mori and Tussah silk fibres*. Journal of Molecular Structure, 2003. **651**(Supplement C): p. 433-441.
140. Geiman, I., M. Leona, and J.R. Lombardi, *Application of Raman Spectroscopy and Surface-Enhanced Raman Scattering to the Analysis of Synthetic Dyes Found in Ballpoint Pen Inks\**. Journal of Forensic Sciences, 2009. **54**(4): p. 947-952.
141. Pfüller, U., H. Franz, and A. Preiß, *Sudan Black B: Chemical structure and histochemistry of the blue main components*. Histochemistry, 1977. **54**(3): p. 237-250.
142. Fonovich, T.M., *Sudan dyes: are they dangerous for human health?* Drug and Chemical Toxicology, 2013. **36**(3): p. 343-352.
143. Noguerol-Cal, R., et al., *High-performance liquid chromatography analysis of ten dyes for control of safety of commercial articles*. Journal of Chromatography A, 2008. **1179**(2): p. 152-160.
144. Rambaldi, D.C., et al., *Surface-enhanced Raman spectroscopy of various madder species on wool fibers: the role of pseudopurpurin in the interpretation of the spectra*. Journal of Raman Spectroscopy, 2015. **46**(11): p. 1073-1081.
145. Agüero P., C., *Aproximación al asentamiento humano temprano en los oasis de San Pedro de Atacama*. Estudios atacameños, 2005: p. 29-60.
146. Ricci, M., et al., *The Raman and SERS spectra of indigo and indigo-Ag<sub>2</sub> complex: DFT calculation and comparison with experiment*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018. **188**(Supplement C): p. 141-148.
147. Niemeyer, H.M. and C. Agüero, *Dyes used in pre-Hispanic textiles from the Middle and Late Intermediate periods of San Pedro de Atacama (northern Chile): new insights into patterns of exchange and mobility*. Journal of Archaeological Science, 2015. **57**(Supplement C): p. 14-23.
148. De Benedetto, G.E., et al., *Infrared spectroscopy in the mineralogical characterization of ancient pottery*. Journal of Cultural Heritage, 2002. **3**(3): p. 177-186.
149. Dutra Moresi, C.M., *Avaliação química do potencial de espécies nativas de Relbunium (Garança Americana) como fornecedoras de corantes e pigmentos e sua aplicação ao estudo de obras de arte*. 1999, Universidade Federal de Minas Gerais: Minas Gerais, Brasil.

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo 1. Artículos publicados en el periodo de tesis.

1. I. Marcaida, M. Maguregui, H. Morillas, C. García-Florentino, V. Pintus, T. Aguayo, M. Campos-Vallette y J. M. Madariaga, Optimization of the sample treatment for the identification of anthraquinonic dyes by Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), *Anal Bioanal Chem* (2017) 409, 2221
2. T. Aguayo, S. Vargas, F. Espinosa y V. Godoy, Base de datos de espectros FT-IR de materiales usados en restauración: un aporte desde la ciencia a un público especializado. *Conserva* (2017) 21, 145
3. T. Aguayo, M. Campos-Vallette, Vibrational spectroscopy for the study of Chilean cultural heritage, *Heritage Science* (2015) 3, 18.
4. T. Aguayo, C. Araya, M. Icaza, M. Campos-Vallette, A vibrational approach for the study of historical weighted and dyed silks, *Journal of Molecular Structure* (2014) 1075, 471.
5. M. Agustina Herrera, G.P. Jara, R. Villarroel, A.E. Aliaga, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo, C. Garrido, T. Aguayo, M.M. Campos Vallette, Surface enhanced Raman scattering study of the antioxidant alkaloid boldine using prismatic silver nanoparticles, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2014) 133, 591.
6. T. Aguayo, C. Garrido, E. Clavijo, J. S. Gómez-Jeria, C. Araya, M. Icaza, F. Espinoza Moraga, M. Campos Vallette, Raman and surface enhanced Raman scattering of a black dyed silk, *Journal of Raman Spectroscopy* (2013) 44, 1238.
7. C. Araya, J. Jaque, N. Naranjo, M. Icaza, R. E. Clavijo, T. Aguayo, M. Campos-Vallette, Raman Characterization of Pigments in Painted Beams and a Wall Painting Discovered in the San Francisco Church in Santiago, Chile. *Spectroscopy Letters* (2013) 47, 177.
8. C. Garrido, T. Aguayo, R. E. Clavijo, J. S. Gómez-Jeria, M. Campos-Vallette, The effect of the pH on the interaction of L-arginine with colloidal silver nanoparticles. A Raman and SERS study. *Journal of Raman Spectroscopy* (2013) 44, 1105.
9. T. Aguayo, E. Clavijo, F. Eisner, C. Ossa-Izquierdo, M. Campos-Vallette, Raman spectroscopy in the diagnosis of the wall painting History of Concepción, Chile, *Journal of Raman Spectroscopy* (2011) 42, 2143.
10. A.E. Aliaga, T. Aguayo, C. Garrido, R. E. Clavijo, E. Hevia, J. S. Gómez-Jeria, P. Leyton, M. Campos-Vallette, S. Sanchez-Cortes, Surface-enhanced Raman scattering and theoretical studies of the C-terminal peptide of the  $\beta$ -subunit human chorionic gonadotropin without linked carbohydrates, *Biopolymers* (2011) 95, 135.



## 7.2. Anexo 2. Participaciones en congresos durante el periodo de tesis

1. T. Aguayo, M. M. Campos-Vallette, Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Antraquinone-aluminum complexes on Dyed Fibers, TECHNART, Bilbao, España (2017)
2. F. de la Riva, P. Molina, M. Alvarado, T. Aguayo, F. Espinosa, Estudio de la colección Windsor plaqué del MAD: un aporte interdisciplinario al rescate del patrimonio industrial de Chile, V Congreso Latinoamericano de Arqueometría, Sao Paulo, Brasil (2016)
3. T. Aguayo, Desde el arte rupestre a la pintura de caballete: alcances de una metodología analítica en común, Science and Innovation for the study and Conservation of works of art, Buenos Aires, Argentina (2015).
4. S. Chiostergi, T. Aguayo, Técnicas y materiales de las superficies doradas, II Seminario de Conservación y Restauración de Bienes Culturales, Cusco, Perú (2015)
5. T. Aguayo, N. Soler, S. Chiostergi, Estudio material de la obra Fray Bartolomé de las Casas, LASMAC, Quito, Ecuador (2015).
6. S. Chiostergi, C. Correa, T. Aguayo, Identificación de Pigmentos por Técnicas No Invasivas: Infrarrojo-Falso Color y Microscopía Raman, V Congreso Chileno de Conservación y Restauración, Santiago, Chile (2015).
7. T. Aguayo, D.L.A. de Faria, M. Campos-Vallette, Vibrational investigations on alizarin-metal complexes, International Conference on Raman Spectroscopy, Jena, Alemania (2014).
8. T. Aguayo, M. Sepúlveda, P. de Souza, C. Paris, L. Bellot-Gurlet, Analysis of colored archaeological fibers from Taira, North of Chile, International Symposium on Archaeometry, Los Angeles, Estados Unidos (2014).
9. A. E. Aliaga, T. Aguayo, C. Garrido, M. M. Campos Vallette, R.E. Clavijo, Estudio Vibracional y Teórico de Lawsona. Colorante con Propiedades Farmacológicas, XXX Jornadas Chilenas de Química, Sociedad Chilena de Química, Pucón, Chile (2013).
10. M.M. Campos Vallette, T. Aguayo, C. Araya M., M. Icaza, J.S. Gómez- Jeria, R.E. Clavijo, A. Aliaga, Estudio Vibracional y Teórico sobre los Efectos del Desgomado, Pesado, y Teñido en el Deterioro de Piezas Históricas de Seda, XXX Jornadas Chilenas de Química, Sociedad Chilena de Química, Pucón, Chile (2013).
11. A.E. Aliaga, M. Agustina Herrera, G.P. Jara, R. Villarroel, J.S. Gómez-Jeria, E. Clavijo, C. Garrido, T. Aguayo, M.M. Campos Vallette, Primeras Señales Raman Amplificadas por Superficies Metálicas de Boldina Utilizando Nanoprismas de Plata, XXX Jornadas Chilenas de Química, Sociedad Chilena de Química, Pucón, Chile (2013).

12. T. Aguayo, M. Campos-Vallette, Raman characterization of blue color in Chilean cultural heritage, XIV Encuentro de Química Inorgánica, Sociedad Chilena de Química, Olmué, Chile (2012).
13. T. Aguayo y M. Campos-Vallette, Advances in the use of Raman spectroscopy for the study of Chilean cultural heritage, Workshop on Applied Raman Spectroscopy (APRAS), Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil (2012).
14. F. Eisner, T. Aguayo y A. Benavente, Caracterización de los materiales del mural Historia de Concepción para su diagnóstico y propuesta de intervención, Tercer Congreso Latinoamericano de Arqueometría, Universidad de Tarapacá – CIHDE, Arica, Chile (2011).
15. T. Aguayo, M. Campos-Vallette, L. Coca, H. Niemeyer, Colorantes en tejidos prehispánicos de los oasis de San Pedro de Atacama, Tercer Congreso Latinoamericano de Arqueometría, Universidad de Tarapacá – CIHDE, Arica, Chile (2011).
16. D. Bracchitta, C. Correa, T. Aguayo, Aproximación transdisciplinaria a los procedimientos de conservación: técnicas arqueométricas aplicadas al diagnóstico de piezas cerámicas para determinar sus niveles de intervención, Tercer Congreso Latinoamericano de Arqueometría, Universidad de Tarapacá – CIHDE, Arica, Chile (2011).
17. T. Aguayo, C. Ortiz, J. Gómez-Jeria, M. Campos-Vallette, Dispersión Raman Amplificada por Superficies (SERS) de Colorantes Históricos, XXIX Jornadas Chilenas de Química, Sociedad Chilena de Química, Termas de Quinamávida, Chile (2011).