

DERIVACIÓN CON MTBSTFA DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS GRASOS. UNA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AGLUTINANTES PROTEICOS Y GRASOS EN CAPAS DE PINTURA

Enrique Parra Crego Universidad Alfonso X El Sabio. eparra@uax.es
Beatriz García Gómez. LARCO Química y Arte

RESUMEN

En la investigación sobre de sistemas sencillos de análisis de aglutinantes tratamos de buscar métodos de análisis que permitan obtener información útil sobre la técnica original (óleo, temple, fresco, acuarela) o los productos orgánicos añadidos a lo largo de la historia de una pintura. Actualmente este trabajo requiere el concurso de varios análisis simultáneos sobre un mismo fragmento de pintura, lo que implica un mayor número de fragmentos destruidos. Para obtener resultados mínimamente reproducibles, es necesario determinar cromatográficamente, de forma independiente, los aminoácidos para ver posibles proteínas, monosacáridos para ver posibles aglutinantes del tipo de las gomas y ácidos grasos, hidrocarburos y terpenos para conocer datos sobre la fracción grasa de una pintura. Todo ello guiado por el análisis mediante espectroscopia de IR y las tinciones selectivas. Basándonos resultados bibliográficos previos, hemos desarrollado un sistema de hidrólisis y sililación que permite obtener cromatogramas complejos que una vez interpretados permiten, en un solo análisis, la determinación cuantitativa de varios de esos principios elementales simultáneamente, lo que disminuye sensiblemente la cantidad de trabajo a realizar, el tamaño de la muestra a analizar y permite la observación simultánea de mezclas de aglutinantes en un solo gráfico. Estamos en la fase de observar reproducibilidad en muestras reales, trabajando sólo con ácidos grasos y aminoácidos, pero el método podrá hacerse extensivo a hidratos de carbono pronto.

INTRODUCCIÓN

El análisis de sustancias filmógenas naturales presentes en muestras de pintura ha sido el objetivo de numerosos grupos de trabajo en análisis químico. La importancia de los datos obtenidos es de suma importancia en múltiples tareas y aspectos relacionados con la conservación y restauración de obras de arte, sobre todo pictórico, por la variedad de problemas que estos sistemas multicapa acarrear. En particular, es impensable hoy en día abordar una limpieza compleja de una pintura sin saber de qué materiales consta el barniz o qué aglutinantes tiene una capa de pintura original o repintada. El conocimiento de la técnica de ejecución pictórica condiciona tratamientos como el de consolidación y protección.

En nuestros laboratorios venimos utilizando diversos métodos analíticos para la detección de los distintos tipos de aglutinantes

orgánicos naturales, ciñéndonos sólo a los tradicionales que, como es sabido, se separan en varios grupos atendiendo a su naturaleza bioquímica, a saber: aglutinantes hidrófobos (aceites vegetales, ceras, resinas terpénicas), aglutinantes hidrófilos polisacáridicos (almidón y gomas hidrosolubles) y aglutinantes proteicos (cola animal, huevo, leche...). El método pasa primeramente por el análisis de la muestra mediante ensayos de coloración selectiva (1) de cortes estratigráficos, análisis de las distintas superficies de una muestra mediante espectroscopía IR y finalmente el análisis cromatográfico. En muchos casos es el análisis cromatográfico la única referencia analítica, ya que las técnicas de análisis preliminar fallan en determinados sustratos, como es el caso de la pintura mural tanto en exterior como en interior. En estos casos la cantidad de aglutinante sin degradar que queda (tras su exposición a la intemperie y los ecosistemas microbiológicos del muro) es tan baja y la interferencia de componentes mayoritarios (como la calcita, el yeso o el oxalato de calcio neoformado) tan grande que sólo la cromatografía, por su elevada sensibilidad, puede ofrecer alguna información.

El análisis cromatográfico de una muestra de filmógeno natural orgánico debe venir regido por las premisas de sencillez en el tratamiento de la muestra, reproducibilidad y sensibilidad. De entre la infinidad de métodos cromatográficos publicados para este tipo de materiales, no existía ninguno que pudiera ofrecer información simultánea de todos los filmógenos orgánicos posibles y que fuera suficientemente reproducible. En la tabla 1 se muestra un resumen de todos ellos con la referencia bibliográfica clave en cada caso.

Método	Aplicación	Ref.
CROMATOGRAFÍA GASEOSA		
Trimetilsililación en piridina	Universal	(2)
Metilación de ácidos carboxílicos	Aglutinantes hidrófobos naturales	(3)
Ésteres alquílicos / derivados acilados de aminoácidos	Aglutinantes proteicos	(4)
Cloroformiato de etilo	Aceites y aglutinantes proteicos	(5)
Acetatos de alditol de monosacáricos	Aglutinantes polisacáridicos	(6)
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA		
Fenilisotiocianato derivados de aminoácidos	Aglutinantes proteicos	(7)
OPA aminoácidos	Aglutinantes proteicos	(8)
Método de la ninhidrina (analizadores de aminoácidos)	Aglutinantes proteicos	(9)

Salvo la sililación, ninguno de los anteriores métodos es suficientemente universal como para ofrecer información rápida y simultánea de una mezcla de sustancias filmógenas en una única muestra, lo que, por otro lado, es muy habitual en pintura. La sililación, por otro lado, tiene el inconveniente de la reproducibilidad debido a varios factores, esencialmente relacionados con la inestabilidad de los derivados sililados en medios ácidos y la dificultad de conseguir algunos de ellos, en particular los de ácido carboxílico.

Tras muchos ensayos y errores, en nuestro laboratorio se trabaja con tres técnicas seleccionadas por su reproducibilidad. La metilación con Methprep II (disolución metanólica de hidróxido de p-toliltrimetilamonio) se usa para el análisis de aglutinantes hidrófobos. La hidrólisis ácida de la muestra, por otro lado conduce a una disolución que se analiza posteriormente en dos fracciones. La primera mediante derivatización a acetatos de alditol (para polisacáridos) y la segunda con cromatografía líquida para buscar aminoácidos por el sistema de derivados fenilisotiocianato.

La búsqueda de un método de análisis simultáneo de todos los filmógenos de forma simultánea ha sido, en los últimos años de interés prioritario en nuestra actividad. Este trabajo presenta los resultados iniciales de un método prometedor con las dificultades que en este momento presenta en su aplicación a muestras patrón y muestras reales de obras de arte.

EL MÉTODO DE LA TERC-BUTILDIMETILSILILTRIFLUOROACETAMIDA (MTBSTFA)

Se trata de un reactivo de sililación desarrollado con la intención de derivatizar grupos funcionales orgánicos nucleófilos (como -OH, -NH, -CONH o -COOH) o bien protegerlos para tareas de síntesis orgánica. Con respecto a sus homólogos trimetilsililados tiene la ventaja de que es más estable por que el gran impedimento estérico del grupo terc-butilo impide la fácil hidrólisis ácida del derivado sililado. Su uso ya había sido descrito para aminoácidos pintura, aunque el trabajo se ceñía exclusivamente a aglutinantes proteicos en muestras patrón (10).

El método consiste en llevar a cabo una hidrólisis ácida de la muestra, con posterior evaporación con corriente de nitrógeno y tratamiento con una mezcla de piridina seca, MTBSTFA y trietilamina que actúa como catalizador. Se calienta a 60 °C durante 30 min y se inyectan entre 1 y 3 µL en condiciones splitless. El método es lo suficientemente simple como para que merezca la pena ser ensayado evaluando esencialmente la reproducibilidad de los resultados y la estabilidad de los derivados sililados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis cromatográfico importan dos parámetros. El primero es la cantidad de aglutinante relativa al peso de la muestra, que indica la abundancia de un determinado aglutinante en una muestra (análisis cuantitativo). El segundo es la identificación del aglutinante, lo que normalmente se hace en base a las proporciones relativas de determinados componentes del mismo, o fragmentos del mismo obtenidos tras una hidrólisis (análisis cualitativo). Ambos parámetros pueden obtenerse mediante el pesado de la muestra (usando en algunos casos microbalanzas) y mediante la introducción de una sustancia de referencia denominada patrón interno.

El patrón interno es una sustancia que se añade a la muestra en cantidad conocida para medir la cantidad obtenida tras el método analítico (coeficiente de recuperación) y poder así saber si ha habido pérdidas de algún analito durante la hidrólisis o derivatización. Permite además la realización del análisis de área relativa de cada uno de los picos de los analitos que conduce a la determinación de la proporción relativa de aminoácidos o azúcares y que por tanto conduce finalmente a la identificación del aglutinante. El área total de los picos de los analitos, referido al área del patrón interno recuperado permite obtener la cantidad total de aglutinantes presentes, e incluso su proporción relativa en mezclas. Para este trabajo preliminar se ha escogido un único patrón interno para todos los tipos de aglutinantes. Es la norleucina, que es el mismo que se ha utilizado hasta ahora para el análisis de aminoácidos. Somos conscientes de que existe una analogía química importante entre la norleucina y los aminoácidos esenciales y de que hay que elegir otras sustancias para el resto de filmógenos, pero este trabajo se desarrollará más adelante.

Las condiciones descritas en el trabajo previo mencionado, se aplicaron primeramente a aminoácidos patrón puros, incluyendo al patrón interno de norleucina y a ácidos grasos. Se separaron mezclas de todos ellos en diferentes condiciones. Posteriormente se probaron condiciones de hidrólisis y evaporación, llegándose al método que en el apartado siguiente se describe en la parte experimental. Los mayores problemas se plantearon en la evaporación de las muestras, que fuera lo suficientemente exhaustiva como para eliminar residuos de ácido clorhídrico atrapado. Por otro lado, la separación de algunos picos en el cromatograma como el del ácido palmítico y el del ácido glutámico, tan esenciales para numerosas determinación, dio algún problema que hizo que se modificara el método publicado (10) del que partimos.

La estabilidad de los derivados es total en la primera hora a temperatura ambiente, lo que permite analizar tres muestras en un mismo lote de derivatización, con tiempos de análisis de 20 minutos aproximadamente.

La detección cromatográfica es un parámetro muy importante a la hora de trabajar con muestras reales, pues condiciona la sensibilidad y en gran parte la identificación correcta de los picos. El detector usado es un FID (detector de ionización de llama), aunque claramente el más idóneo para muestras reales es el MSD (detector de espectrometría de masas), dado que con muestra real la probabilidad de coelución con sustancias desconocidas es muy elevada.

El análisis de sustancias patrón no ofreció ningún problema. Se analizaron muestras de leche, caseína, cola animal, clara de huevo, yema de huevo, y aceites secantes y se trazaron los gráficos de % de aminoácidos y % de ácidos grasos para cada una de las sustancias. El resultado del análisis cuantitativo de aminoácidos y ácidos grasos de algunos de estos patrones está en la figuras 1 y en la tabla 2.

Aminoácido	Cola animal	Clara de huevo	Yema de huevo	Leche
Glicina	33,30	4,60	3,70	3,00
Alanina	8,10	9,40	5,60	4,70
Valina	4,20	11,20	9,30	8,00
Leucina	3,70	10,70	10,40	10,90
Isoleucina	1,20	8,90	5,90	7,50
Prolina	15,00	3,90	5,60	12,40
Fenilalanina	1,60	6,40	4,40	5,60
Tirosina	0,00	1,50	2,40	5,80
Serina	3,00	7,20	12,50	3,10
Metionina	1,80	2,30	2,20	2,30
Lisina	4,10	10,40	5,60	7,90
Ác. aspártico	6,00	10,60	12,30	6,60
Ác. Glutámico	9,30	12,90	20,10	22,20
Hidroxiprolina	8,70	0,00	0,00	0,00

Tabla 2. Porcentajes en peso de los aminoácidos reproducibles en los distintos tipos de sustancias aglutinantes analizadas. Medido respecto a la norleucina como patrón interno.

De la figura 2 que representa la superposición del porcentaje de aminoácidos para los cuatro tipos esenciales de sustancias filmógenas proteicas indica que estas pueden diferenciarse en el más favorable de los casos que son los patrones frescos ya descritos.

El análisis de muestras problema tiene de entrada varios problemas que hay que solventar. En pintura mural la concentración de sales calcicas (esencialmente cloruro de calcio) que se obtienen tras la hidrólisis ácida y la escasez de aglutinante hacen que sólo se vean aminoácidos en muestras favorables con elevadas proporciones de proteína en su composición. Para muestras de pintura de caballete o escultura policromada no existe ese problema pues la proporción de aglutinante de las capas de pinturas de este tipo suele ser más elevada y la proteína sobrevive en mejores condiciones que en la pintura mural.

Sirvan como ejemplos dos casos extremos en los que la técnica en su versión más simple funciona de formas completamente distintas dependiendo del tipo de muestra a analizar.

El primer caso es el análisis de pintura de caballete. En particular el análisis de la preparación de una tabla flamenca anónima de colección particular en la que ya sabíamos de la presencia de cola animal por otros estudios llevados a cabo sobre muestras de similares características y por los ensayos de tinción selectiva y el IR que detectan la presencia de proteína. El IR en particular indican una elevada proporción de creta, pero se adivinan los hombros y señales de la proteína, como parte de los componentes minoritarios. La hidrólisis de una muestra de 0'23 mg de peso rindió un cromatograma como el que se muestra en la figura 3. La presencia de cola animal es clara a parte de la coincidencia aproximada del perfil de aminoácidos de la muestra respecto a un patrón de cola animal por la presencia clara de hidroxiprolina y un porcentaje de glicina superior al 15%.

Obsérvese cómo en el mismo cromatograma aparece información sobre la fracción grasa de la muestra, poniendo de manifiesto de forma adicional, la presencia de aceite de linaza, procedente de la capa aislante aplicada sobre la preparación y que impregna la misma (véanse los picos correspondientes a los ácidos palmítico y esteárico a la derecha de la figura 3). En la figura 4 aparece el perfil de porcentajes de aminoácidos para esta muestra superpuesto al de la cola animal. Puede apreciarse una clarísima coincidencia, sobre todo en los aminoácidos de la mitad izquierda de la gráfica.

El segundo caso que describimos es el análisis de una muestra de pintura mural. El aspecto de la muestra claramente indica que se trata de un temple, por su pulverulencia y porosidad. Las tinciones selectivas ponen de manifiesto que efectivamente debe existir una proteína en su composición. El IR pone de manifiesto la presencia de calcita y yeso en elevadas proporciones en la superficie de la muestra, No se aprecia con claridad la presencia de proteína en el espectro de IR. El tratamiento de esta muestra mediante hidrólisis y derivatización directa con MTBSTFA generó un cromatograma sin picos (figura 5), ni tan siquiera asignables a otras sustancias como la glucosa, necesariamente presentes en muestras de pintura mural por la colonización microbiológica. La causa de esta falta de respuesta es, a nuestro entender, la elevada proporción de sales y la escasa proporción de aminoácidos que hace que el rendimiento de la derivatización sea escaso y por debajo del límite de detección de la separación cromatográfica. Para evitar este problema y poder trabajar a mayor sensibilidad en pintura mural se están llevando a cabo experimentos separados de mezcla de calcita y cola animal midiendo límites de detección, para después poder subirlos realizando desalaciones previas con sistemas de microfiltración que permitan la eliminación de sales. También se intentan conseguir extractos de las muestras con el fin de detectar restos de proteínas o aminoácidos solubles en diferentes medios.

El trabajo también se centra en este momento en una segunda línea de detección simultánea de hidratos de carbono (monosacáridos tras la hidrólisis), que ya vemos factible.

CONCLUSIONES

La aplicación de la hidrólisis y derivatización con MTBSTFA a muestras patrón de proteínas y aceites proporciona una herramienta de caracterización cualitativa y cuantitativa de filmógenos de esas características, ya que permite diferenciarlos, incluso cuando algunos de ellos están mezclados, como es el caso de la detección simultánea de aceites y proteínas. Se está trabajando para hacer extensiva esta identificación a filmógenos del tipo de hidratos de carbono.

Su aplicación a muestras es, como siempre, algo más compleja y aunque ya se han conseguido identificaciones exitosas en casos fáciles (esencialmente pintura de caballete y escultura policromada), la asignatura pendiente sigue siendo la pintura mural, en la que la escasez de aglutinante orgánico (normalmente por biodegradación) y

la elevada proporción de sales (esencialmente cloruro de calcio tras la hidrólisis) dificulta la identificación por falta de sensibilidad y un más que probable efecto negativo en el rendimiento de la derivatización y la hidrólisis.

PARTE EXPERIMENTAL

Las muestras y los patrones fueron pesados en microbalanza. La derivatización de patrones de aminoácidos y ácidos grasos se llevó a cabo en las siguientes condiciones. Se pesaron 1 mg de aminoácido y 1 mg de norleucina y se mezclaron en un vial, añadiendo posteriormente 100 μL de piridina seca, 70 de *tert*-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) y 10 de trietilamina (TEA). Se selló el vial y se calentó en estufa a 60 °C durante 30 min. La mezcla de sólidos se termina disolviendo. Se inyectó 1 μL en modo splitless, con división 60/1. Se midieron los factores de respuesta relativos a la norleucina y los tiempos de retención de los aminoácidos y los ácidos grasos principales (alanina, glicina, treonina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, metionina, hidroxiprolina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácidos acelaico, ácido acelaico, ácido palmítico, ácido esteárico) que se tabulan en la tabla 9. La cromatografía se realizó en un cromatógrafo Clarus 500 de Perkin Elmer usando una columna SGE-1701 de 25 m, 0,35 mm DI de cianopropilsilicona, con nitrógeno como gas portador a 1,5 ml/min y un programa de temperatura desde 120 °C (2 min), 10°C/min hasta 270 °C (15 min). El detector es de ionización de llama.

Se llevó a cabo también una hidrólisis ácida de 1 mg de sustancia patrón (cola animal, leche, clara de huevo, yema de huevo, aceite de linaza y aceite de nueces) al que se le añadió 0,05 mg (aproximadamente) de norleucina con 100 μL de HCl 6M a 110 °C durante 24 hrs en vial cerrado. Se deja enfriar y se evapora a vacío hasta sequedad a una temperatura de 45 °C y presión de 10^{-3} torr. Se añadieron las mismas cantidades de reactivos que para los patrones puros y se inyectó 1 μL con relación de split 20/1.

Se analizaron 30 muestras de material real procedente de diferentes obras de arte identificadas como temples por otras técnicas (IR y tinciones selectivas). Se pesó al menos 1 mg de muestra y se le añadió 0,01 mg (por mg de muestra) de norleucina a partir de una disolución acuosa de 1 g/L. A continuación se hidrolizó con 100 μL de HCL 6 M y se evaporó a sequedad en las condiciones ya referidas. La derivatización se llevó a cabo con 30 μL de piridina, 20 de MTBSTFA y 3 de TEA. Se inyectó 1 μL con una relación de split 20/1.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- E. MARTIN. "Some improvements in techniques of analysis of paint media". *Stud. in Conserv.* 22, (1977), 63-67
- 2.- L. MASSCHELEIN – KLEINER. *Contribution to the study of aged proteinaceous media" Conservation and Restoration of Pictorial Art*. N. Bromelle y P. Smith (Editores). Butterworths. Londres 1976. 84-87
- 3.- M. T. MARTÍN PATINO, E. PARRA, M.D. GAYO, F. MADRUGA Y J. SAAVEDRA "Artificial paint or patina on the sandstone of the Ramos Gate at the Catedral Nueva in Salamanca" *Stud. in Conserv.* 40 (1995), 190-205
- 4.- J. P. ZANETTA Y G. VICENDON "Gas – liquid chromatography of the N (O)-heptafluorobutirates of the isoamyl esters of aminoacids". *J. of Chromatogr.* 76, (1973), 91-99
- 5.- W. NOWIK. "Acides amines et acides gras sur un même chromatogramme. Un autre regard sur l'analyse des liants en peinture". *Stud. Conserv.* 40 (1995), 120-125
- 6.- B. LINDBERG, J. LÖNGRENN Y S. SVENSSON. *Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem.* 31, (1975), 185-240
- 7.- B. A. BIDLINGMEYER, S. A. COHEN Y T.L. TARVIN. "Rapid analysis of aminoacids using precolumn derivatization". *J. Chromatogr.* 336, (1984), 93-115
- 8.- D. W. HILL, F. H. WALTERS, T. D. WILSON Y J. D. STUART. "High performance liquid chromatography determination of aminoacids in the picomole range". *Anal. Chem.* 51, (1979), 338
- 9.- S. MOORE Y W. H. STEIN. "Chromatography of aminoacids on sulphonated styrene resins". *J. Biol. Chem.* 192, (1951), 663
- 10.- M. P. COLOMBINI, R. FUOCO, A. GIACOMELLI Y B. MUSCATELLO. "Characterization of proteinaceous binders by microwave assisted acid hydrolysis and GC-MS determination of aminoacids". *Stud. in Conserv.* 43 (1998), 33-41.

FIGURAS

Fig. 1.- De arriba abajo, cromatograma de aminoácidos y ácidos grasos de un patrón de cola animal, leche, clara y yema de huevo. Los compuestos analizados están marcados con la notación internacional para los aminoácidos. Para los ácidos grasos la clave es: AZELAI, derivado sililado del ácido acelaico; PALM, derivado sililado del ácido palmítico, ESTEAR, derivado sililado del ácido esteárico.

Fig. 2.- Perfil de aminoácidos de los cuatro tipos de aglutinantes proteicos importantes: cola animal, clara de huevo, yema de huevo y caseína

Fig. 3.- Cromatograma de aminoácidos y ácidos grasos de la preparación de creta de una tabla flamenca anónima del siglo XVI.

Fig. 4.- Perfil de aminoácidos de la cola animal junto al de la muestra de preparación de creta de una tabla flamenca anónima.

Fig. 5.- Cromatograma de aminoácidos y ácidos grasos del recubrimiento moderno de los paramentos verticales de la Capilla de S. Juan Bautista. Iglesia del Salvador (Valladolid)

CURRÍCULUM VITAE

Enrique Parra es doctor en Ciencias Químicas desde 1992. Actualmente es profesor titular en la Universidad Alfonso X el Sabio en el departamento de Tecnología Industrial.

Beatriz García es diplomada en Restauración desde 2002. Actualmente es la coordinadora de restauración científica de la empresa LARCO Química y Arte S.L.