

Evaluación de los cambios inducidos al azul de índigo (*Indigosfera tinctoria*) por envejecimiento artificial acelerado

Tello Burgos, Natalia¹; López Montes, Ana M.¹; Ballesta Claver, Julio²; Collado Montero, Francisco¹; Castillo Valdivia, M^a Esther²; Espejo Arias, Teresa¹; Blanc García, M^a Rosario².

¹Dpto. de Pintura, Facultad de Bellas Artes de la Universidad de Granada, Avd. Andalucía s/n. 18071 Granada (España)

²Dpto. De Química Analítica, Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, Avd. Fuentenueva s/n 18071, Granada, (España)
(Natalia Tello Burgos: ntello@correo.ugr.es)

Introducción

El azul índigo es un colorante extraído de la planta *Indigosfera tinctoria* cuyos componentes principales son el índigo, indolinona, indirrubin, triptantrín y ácido linoléico [1]. Existen evidencias de su utilización desde el 6000 a. C. para teñir textiles pero sin embargo, su identificación en obras de arte (pintura y documento gráfico) se ha llevado a cabo en escasas ocasiones debido quizá a la complejidad de su composición o a los cambios que puede sufrir por las condiciones de conservación o por su envejecimiento natural. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es evaluar los cambios físicos y químicos del azul índigo simulando los procesos de envejecimiento natural para ayudar a su identificación en obras de arte a pesar de las alteraciones que haya podido sufrir.

Metodología

El envejecimiento de las muestras se ha realizado en una cámara climática de envejecimiento artificial controlado (Solarbox 3000eRH) sometiendo las muestras a una temperatura constante de 80°C, 65 % de H_R y una irradiancia de 550 Wm⁻² con filtro indoor (norma ISO 5630-3:1996 e ISO 11241:2004) a intervalos de envejecimiento de 24h, 48h, 72h y 144h.

Se prepararon dos tipos de muestras: viales con una disolución de índigo en ácido acético (0,03g/10mL) y capas de color aplicadas con y sin aglutinante (goma arábiga) sobre un papel de cáñamo sin encolantes ni colorantes.

Las muestras se sometieron a cuatro condiciones de envejecimiento en los siguientes grupos:

- Muestras de referencia (REF): guardadas en oscuridad en condiciones estables de humedad y temperatura (30% H_R, 25°C).
- Muestras en oscuridad (OSC): introducidas en la cámara de envejecimiento pero protegidas de la luz.
- Muestras a la luz (LUZ): introducidas en la cámara de envejecimiento.
- Muestras de exterior (EXT): expuestas a la intemperie. Los días de trabajo de campo el índice de radiación ultravioleta global era máximo.

Las técnicas empleadas para el estudio y evaluación del índigo fueron:

Colorimetría. Las medidas colorimétricas se realizaron sobre las muestras de índigo (IND) e índigo con goma arábiga (IND-GA) sobre papel con un espectrofotómetro Minolta CM 2600d (geometría de medición: d/8; rango de longitudes de onda: 360 nm-740 nm; paso de longitud de onda: 10 nm) suponiendo un observador patrón 10° (CIE 1964), iluminante patrón D65 (CIE 1967), área de medida/iluminación SAV: 3mm, reflexión especular incluida y excluida (SCI/SCE), 0% UV + 100% UV, espacio de color/datos colorimétricos: CIE 1976 L*a*b* y CIE 1976 L*C*h [2]. Se han realizado las mediciones de color absoluto en CIE L*a*b* y CIE L*C*h de todas las condiciones de envejecimiento y se han calculado las diferencias de color (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔC^* , ΔH^* , ΔE^*_{ab}) con respecto a la muestra patrón.

Espectrofotometría UV-vis. Se estudiaron las variaciones de absorbancia de las muestras de índigo en disolución de ácido acético con un espectrofotómetro Agilent 8453E con un rango de medición entre 190 y 1100 nm.

Fluorescencia. Los estudios de fluorescencia se llevaron a cabo mediante el espectrofluorímetro Shimadzu RF-150 con las muestras diluidas en ácido acético barriendo un rango de entre 250 a 900 nm.

Electroforesis capilar. Las muestras de índigo sobre papel se analizaron con un equipo Agilent HP-3D con un capilar de 64,5 cm de longitud y 50 μ m de diámetro interno. La disolución electroforética estaba compuesta por borato sódico 40 mM a pH 9.2. El voltaje aplicado fue de 30 Kv en polaridad positiva. La temperatura estuvo constante a 25°C. La muestra se inyectó por presión de 50mbar durante 13 segundos. La detección se llevó a cabo *on-line* con un

detector de diodos instalado en el equipo ofreciendo información espectral en pasos de 2 nm entre 190 y 600 nm durante todo el análisis electroforético [3].

Las muestras de índigo en disolución se estudiaron directamente sin ningún tipo de tratamiento. El estudio colorimétrico se realizó directamente sobre las muestras de índigo e índigo con goma arábica sobre papel inmediatamente después de cada proceso de envejecimiento. Para el estudio electroforético la extracción del colorante conllevó un proceso de extracción: fragmentos de 25x10mm se sumergieron en ácido acético (99,8% pureza) en un baño de ultrasonidos 45 min. La disolución coloreada se pasó a través de un filtro de nylon (0,2 m), se evaporó hasta sequedad a 60°C con corriente de N₂ y después se reconstituyó en 0,5mL de dodecil sulfato sódico (SDS) 0,1M.

Resultados y discusión

Según el estudio colorimétrico observamos que la claridad (L^*) es el parámetro que más se modifica con respecto al patrón de referencia destacando un incremento progresivo en función del número de horas de envejecimiento siendo siempre mayor en el caso de índigo sin goma arábica (IND). Las muestras expuestas a la luz y en intemperie, tanto IND como IND-GA, fueron las que más se aclararon (Figura 1A). El croma o colorido (C^*) incrementa en el caso de las muestras con aglutinante y decrece generalmente en muestras sin aglutinante, tendencias que se siguen con el tiempo de envejecimiento. Por tanto, podemos relacionar el mayor aumento de L^* en las muestras de IND con un menor C^* . A medida que la muestra se aclara se percibe con menor colorido.

La medición del ángulo de tono (h_{ab}) y el cálculo de la diferencia de tono (H^*) nos confirma que las variaciones de tono son mayores en las muestras IND respecto a las muestras IND-GA para todos los periodos de envejecimiento, con un viraje en todos los casos del azul al verde (descenso de H^*) siendo las muestras envejecidas en la cámara con exposición a la luz y las de exterior las que mayores diferencias de tono registran. Las variaciones de color total (E^*ab) se incrementa progresivamente a medida que aumentan las horas de envejecimiento siendo las muestras IND-GA las más estables (Figura 1B).

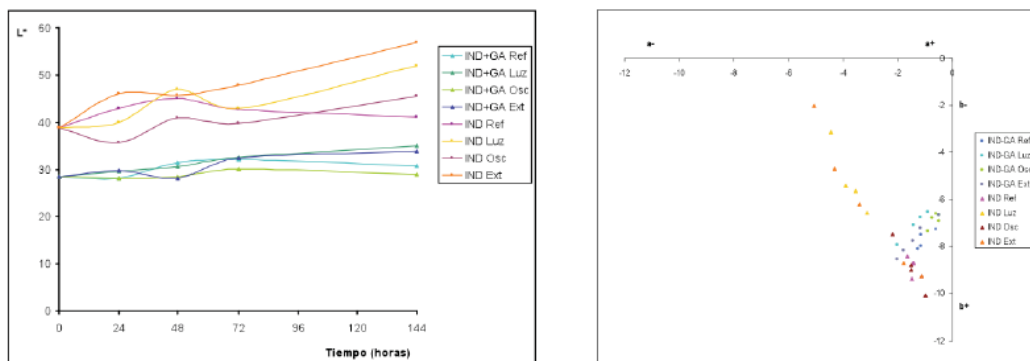


Figura 1. A) Variaciones de L^* ; B) Representación CIE $L^*a^*b^*$ de muestras sobre papel.

Las muestras de papel sin color sufrieron ínfimas modificaciones de claridad (ligero oscurecimiento del papel), croma (descenso) y tono (ligero amarilleamiento) que podrían haber contribuido mínimamente al viraje tonal del azul aunque consideramos que esta influencia es desestimable al igual que la influencia del envejecimiento de la goma arábica, ya que en estudios anteriores se ha comprobado su estabilidad [4].

En el estudio de absorbancia de las disoluciones, las muestras que se mantuvieron protegidas de la luz (REF y OSC) conservaron los máximos de absorbancia característicos del índigo a 286, 348 y 623 nm. Las muestras envejecidas en la cámara se volvieron de color amarillo pasadas 24 h y sus espectros de absorbancia presentaron dos nuevos máximos a 250 (llegando éste a saturarse) y 307 nm perdiéndose las curvas a 348 y 623 nm. Deducimos que estos cambios se inducen por la acción de la luz visible y ultravioleta independientemente de la temperatura a la que se conserven (Figura 2).

La materia orgánica presenta una estructura molecular que al incidir luz ultravioleta genera una emisión de color muy vivo, fenómeno denominado fluorescencia. Esta emisión se puede

generar fácilmente utilizando una simple luz negra portátil y se emplea para la detección de materia orgánica. La técnica consiste en el que un rayo de luz de longitud de onda muy energética de la región del ultravioleta, atraviesa la muestra provocando que la molécula la absorba y se excite. La molécula, al no poder retener tanta energía devuelve una porción en forma de luz visible de cualquier color. Esta emisión es característica del material empleado y sirve como detección de la especie que se quiere estudiar. La ventaja de utilizar esta técnica es que no todas las sustancias son fluorescentes, por lo que sirve para detectar unas moléculas frente a otras que se encuentran conjuntamente en una mezcla. Es también muy sensible por lo que muy pequeñas cantidades de la muestra pueden ser detectadas.

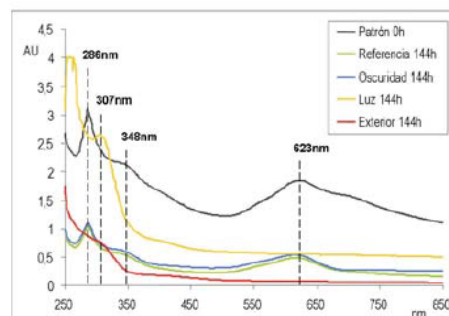


Figura 2. Espectros UV-vis

El estudio fluorescente en disolución permite confirmar la descomposición de la muestra de índigo con la radiación incidente. Para ello se realizaron los siguientes estudios:

Efecto del tiempo: la muestra de índigo presenta dos máximos de excitación a 307 y 347 nm. A lo largo del tiempo y en ausencia de luz, la excitación a 347 nm desaparece lentamente hasta obtener un máximo de excitación a 307 nm, no cambiando a penas el máximo de emisión a 407 nm, indicando la formación de la forma reducida soluble leuco en agua del índigo [5]. En disolución, la molécula de índigo presenta dos estructuras, la forma leuco y la forma ceto en igual proporción (Figura 3). En un medio ácido y polar, es más probable la formación progresiva de la forma reducida leuco, molécula que es menos estable a la radiación que la forma ceto.

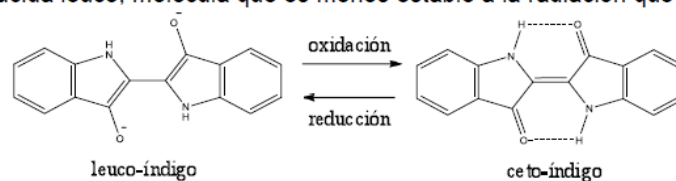


Figura 3. Formas leuco y ceto del índigo.

Efecto de la temperatura: realizando un estudio a oscuridad se favorece la oxidación de la molécula de índigo mediante el oxígeno disuelto para formar dehidroíndigo ($\lambda_{ex}=348$ nm, $\lambda_{em}=417$ nm), pico de absorción observado en los estudios realizados mediante espectroscopía UV-visible, evidenciándose la existencia de la molécula de dehidroíndigo (Figura 4) y la forma ceto, ya que las bandas de absorción coinciden en 348 y 600 nm, como indican Rondao y col. [5].

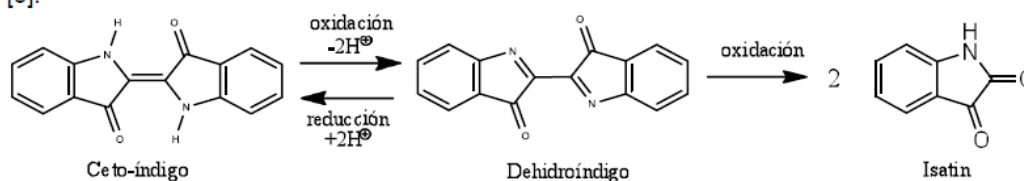


Figura 4. Oxidación de índigo a dehidroíndigo y su posterior oxidación a isatin.

Efecto de la radiación incidente: Este estudio se realizó: (a) irradiando a distintas longitudes de onda suministradas por la radiación solar; o (b) a una longitud de onda fija de 550 nm. (a) Respecto a la radiación solar, al ser más energética, conduce a una la foto-degradación oxidativa más exhaustiva de la mezcla azul de índigo. En la Figura 5A puede verse como a una exposición de 24 horas se forma la molécula de dehidroíndigo. Sin embargo a las 48 horas, el espectro cambia mostrándose otro espectro de excitación ($\lambda_{ex}=315$ nm) y emisión ($\lambda_{em}=380$ nm). Esta foto-degradación puede dar lugar a la formación de isatin de una manera más rápida por el empleo de ácido acético como disolvente. A las 72 horas, la intensidad de fluorescencia va disminuyendo con el tiempo debido a que la exposición a esta radiación más energética ocasiona la foto-degradación de la molécula de isatin a otros derivados como el ácido

antranílico [6]; (b) la irradiación a 550 nm impide la foto-degradación de isatin. Primeramente se observa que a las 24 h de irradiación a esta longitud de onda (Figura 5B) se produce la conversión directa de indigo a isatin. Conforme aumenta el tiempo de exposición, aumenta la concentración de isatin debido al aumento de la intensidad de fluorescencia del compuesto. Como una molécula de indigo genera dos de isatin, la intensidad de fluorescencia es doblemente mayor trascurridas 144 h, no ocurriendo la foto-degradación anteriormente mencionada en el apartado (a) ya que se incide con una radiación menos energética.

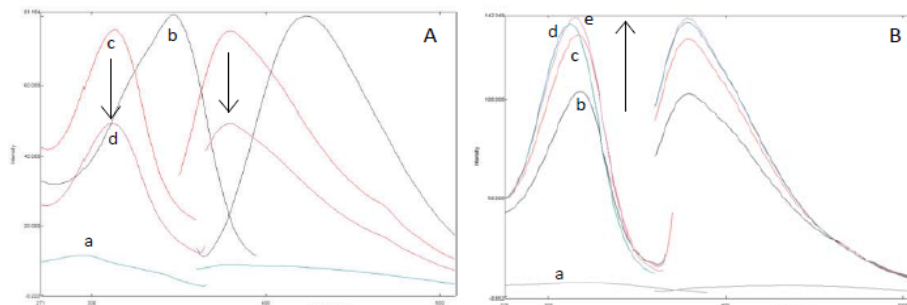


Figura 5. Efecto de la radiación en la muestra de indigo: A) Radiación solar: a) blanco; b) 24 h, obtención de dehidroindigo ($\lambda_{ex}=347$ nm, $\lambda_{em}=423$ nm); c) 48 horas, obtención de isatin ($\lambda_{ex}=315$ nm y $\lambda_{em}=380$ nm); d) 72 h, degradación de isatin. B) Radiación a 540 nm: a) blanco; b) 24 h, obtención de isatin; c) 48 h; d) 72 h; e) 144 h. Se observa de esta gráfica que a mayor tiempo de radiación, mayor formación de isatin.

El estudio electroforético de las muestras nos permite evidenciar la formación de dehidroindigo a partir de las moléculas de indigo. Las muestras de papel expuestas a la luz no llegaron a degradarse por completo posiblemente por la resistencia que adquiere al fijarse más internamente sobre las fibras del papel debido a la estructura de la molécula [5] por lo que no llegamos a identificar el pico electroforético de isatin.. En las muestras REF y OSC también se observa esta transformación de manera más progresiva como puede observarse en los datos de la tabla (Tabla 1).

Tabla 1. Variaciones de la concentración de indigo y dehidroindigo en muestras envejecidas.

	REFERENCIA					LUZ			
	0h	24h	48h	72h	144h	24h	48h	72h	144h
Indigo (%)	77,5	64,8	61,3	34,6	29,2	70,9	62,9	30,2	21,1
Dehidroindigo (%)	22,5	35,2	38,7	65,4	70,8	29,1	37,1	69,8	78,9

Conclusiones

El indigo contiene elementos que pueden degradarse por acción del oxígeno y de la luz (tanto visible como ultravioleta) en disolución o fijado sobre un soporte. Sin embargo, esta degradación puede verse reducida por la presencia de aglutinantes y por la protección que le confieren las fibras de un soporte.

Bibliografía

- [1] Mohn, T.; Potterat, O.; Hamburger, M. *Planta Med.* 2007, 73 (2), 151-156
- [2] CIE *Colorimetry*, Publication 15:2004 (3rd. Edition), Viena, CIE Central Bureau, 2004.
- [3] López-Montes, A., Blanc, R., Espejo, T., Huertas-Perez, J.F., Navalón, A., Vílchez, J.L. "Electrophoresis" 28 (2007) 1243-1251.
- [4] Castillo-Valdivia, M.E., López-Montes, A., Vílchez, J.L., Espejo, T., Blanc, R. "Caracterización de la goma arábiga y estudio de los cambios inducidos por envejecimiento artificial" 16ª Conferencia Trienal de ICOM-CC, Lisboa (Portugal) 2011.
- [5] Rondao, R.; Seixas de Melo, J. S.; Bonifácio, V. D. B.; Melo, M. J. "Dehydroindigo, the Forgotten Indigo and Its Contribution to the Color of Maya Blue". *The Journal of Physical Chemistry A* 2010, 114 (4), 1699-1708.
- [6] Mawatari, K. i.; Segawa, M.; Masatsuka, R.; Hanawa, Y.; Iinuma, F.; Watanabe, M. "Fluorimetric determination of isatin in human urine and serum by liquid chromatography postcolumn photoirradiation". *Analyst*, 2001, 126 (1), 33-36.