

**BIODETERIORO  
FÚNGICO Y BACTERIANO  
DE RESINAS TERPÉNICAS  
UTILIZADAS EN PINTURA  
Y OTRAS ARTES PLÁSTICAS**

**JULIO ROMERO-NOGUERA**

**Tesis Doctoral**

Granada 2007

**Universidad de Granada Departamento de Pintura**



# **BIODETERIORO FÚNGICO Y BACTERIANO DE LAS RESINAS TERPÉNICAS UTILIZADAS EN PINTURA Y OTRAS ARTES PLÁSTICAS**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR  
JULIO ROMERO NOGUERA

DIRECTORES DE TESIS

FERNANDO BOLÍVAR GALIANO (TUTOR)

DEPARTAMENTO DE PINTURA. UNIVERSIDAD DE GRANADA

MARIA ANTONIA FERNÁNDEZ VIVAS

INÉS MARTÍN SÁNCHEZ

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Facultas de Bellas Artes. Departamento de Pintura.

Universidad de Granada

2007



*A Alicia y a mi familia, por supuesto*



Esta tesis doctoral ha sido realizada dentro del programa de becas y contratos de Formación del Profesorado Universitario (FPU), del Ministerio de Educación y Ciencia.

El doctorando ha sido beneficiario de dos ayudas del Ministerio de Educación y Ciencia para la realización de estancias en el *Istituto Centrale per il Restauro* de Roma (Italia) durante 2005 (dos meses) y en el Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), sección de Florencia (Italia), durante 2006 (tres meses).

La investigación ha contado con la financiación del Proyecto de Investigación I+D+I “Caracterización del biodeterioro de materiales filmógenos contituyentes de barnices, aglutinantes y consolidantes utilizadas en obras de arte españolas (siglos XVI-XIX) y seguimiento de tratamientos” (Referencia: BQU2001-2776-C03-03), del Ministerio de Educación y Ciencia.

La principal publicación relacionada con la tesis doctoral ha sido hasta el momento:

“Study of the microbiodegradation of terpenoid resin-based varnishes from easel painting using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry”. Doménech-Carbó MT, Osete-Cortina L, de la Cruz-Cañizares J, Bolívar-Galiano F, Romero-Noguera J, Fernández-Vivas MA, Martín-Sánchez I. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385 (7) (2006): 1265–1280.



## *Agradecimientos*

*A mis tres directores, las Dras. Inés Martín Sánchez y M<sup>a</sup> Antonia Fernández Vivas y el Dr. Fernando Bolívar Galiano, por su asesoramiento, apoyo, y haber puesto a mi disposición los recursos materiales necesarios para la realización de esta tesis doctoral.*

*Al Dr. José Miguel Ramos López, del servicio de Cromatografía y Espectrometría de Masas del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, por el gran interés mostrado por el presente estudio y sus importantes aportaciones al mismo.*

*A la Dra. Teresa Doménech Carbó, Catedrática de la Universidad Politécnica de Valencia, y su equipo, por el trabajo realizado en parte de los resultados de la tesis.*

*Al Dr. Stefano Ventura, investigador principal del ISE, (Istituto per lo Studio degli Ecosistemi) del CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), sección de Florencia (Italia), por su amabilidad, nivel científico, y constante disposición a colaborar con nuestro grupo de investigación.*



## *Resumen*

Las resinas terpénicas son productos de origen natural que por sus propiedades ópticas y su capacidad adhesiva y filmógena cumplen una importante función técnica, protectora y estética como componentes de medios aglutinantes y capa final de acabado y conservación en obras de arte pictóricas y escultóricas.

Difieren notablemente en cuanto a su procedencia y composición, si bien todas son mezclas orgánicas de sustancias originadas a partir del isopreno, estableciéndose dos grupos principales, diterpenos y triterpenos, que constan de cuatro y seis unidades de isopreno, respectivamente.

Los procesos de envejecimiento de estas sustancias constituyen uno de los mayores problemas para la conservación de obras de arte. Las resinas cambian su composición y propiedades con el tiempo, materializándose dichas transformaciones en fenómenos como el amarilleo, patrones de craquelado y microfractura (los pasmados del barniz), aumento de la fragilidad y cambios en la solubilidad, por lo que en la mayoría de casos se hace necesaria su eliminación total o parcial. Dado su dificultad y carácter irreversible, las operaciones de limpieza están consideradas como etapas críticas en el proceso de restauración de la obra de arte, a las que se llega por un insuficiente conocimiento de los complejos procesos degradativos que afectan a estos materiales y de los procedimientos para evitarlos.

Esta tesis doctoral se centra en el estudio del desarrollo de microorganismos sobre los barnices terpénicos naturales de mayor uso artístico y en las alteraciones químicas que son capaces de producir. Para ello se han seleccionado seis resinas: colofonia y trementina veneciana (diterpénicas predominantemente abietánicas), sandárac y copal de Manila (diterpénicas predominantemente labdánicas) y dammar y almáciga (triterpénicas) y sobre estos materiales se ha inoculado diversos hongos y bacterias procedentes de colección y de obra real, frecuentemente citados como agentes de biodeterioro en materiales artísticos, de cara a evaluar su grado de proliferación y capacidad de alteración química. Las técnicas de análisis empleadas han sido microscopía, cromatografía de gases-espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y pirólisis-cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Por último, se ha incluido un estudio del empleo de biocidas de amplio uso en restauración de bienes culturales (cloruro de benzalconio, naftenato de tributil estaño y ortofenilfenol) para evitar estos fenómenos, y sus posibles interacciones con los barnices.



## *Riassunto*

Le resine terpeniche sono prodotti naturali che per le loro proprietà ottiche e capacità adesive e filmogene svolgono una importante funzione tecnica, protettiva ed estetica come componenti de *media* agglutinanti e strato finale di rifinitura e conservazione nelle opere di arte pittoriche ed scultoriche

Si differenziano di forma notevole secondo la procedenza e composizione, sebbene tutte siano miscele organiche di sostanze originate dal isopreno. Si possono stabilire due gruppi principali: diterpeni e triterpeni, che constano di quattro e sei unità di isopreno rispettivamente.

I processi d'invecchiamento di queste sostanze sono tra i più importanti problemi per la conservazione di opere d'arte. Le resine cambiano la loro composizione e proprietà col tempo, producendo fenomeni come l'ingiallimento, microfrazioni, aumento della fragilità e cambi nella solubilità, ed è a causa di queste alterazioni che frequentemente si procede con la loro eliminazione totale o parziale. Vista la difficoltà ed irreversibilità, questi lavori di pulizia sono considerati critici nel processo di restauro delle opere d'arte e spesso vengono messi in pratica per una insufficiente conoscenza dei complessi processi degradativi di questi materiali e dei procedimenti per evitarli.

Lo scopo di questa tesi doctoral è studiare lo sviluppo dei microorganismi sui vernici terpenici naturali più utilizzati ed i processi chimici di alterazione che possono produrre. A questo fine abbiamo selezionato sei resine: colofonia e tramentina veneziana (diterpeniche abietaniche), sandaraca e copale Manila (diterpeniche labdaniche) e dammar e mastice (triterpeniche), e su questi materiali abbiamo inoculato diversi funghi e batteri procedenti di collezione e opere di arte, spesso citati come causanti di biodeterioramento, col proposito di studiare la loro capacità di crescita e alterazione chimica.

Le tecniche di analisi utilizzate sono state microscopia, gascromatografia, spettrometria di massa, spettrofotometria infrarosso Fourier, e pirolisi-gascromatografia/ spettrometria di massa.

In ultimo, è stato incluso anche uno studio sull'effetto dei biocidi più usati nel restauro dei beni culturali (benzalcolonio cloruro, naftenato di tri-n-butil stagno ed ortofenifenolo) al fine di evitare questi processi e conoscere i loro possibile interazioni con i vernici.



<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Las resinas terpénicas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Técnicas instrumentales empleadas .....</b>	<b>24</b>
1.2.1	Cromatografía de gases.....	24
1.2.1.1	Técnicas de derivatización .....	24
1.2.1.2	Instrumentación.....	26
1.2.2	Espectrometría de masas.....	29
1.2.2.1	Instrumentación.....	30
1.2.3	Pirólisis –GC-MS.....	32
1.2.4	Espectroscopia infrarroja .....	33
1.2.4.1	Intrumentación .....	35
	<b>Referencias .....</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>RESINAS DITERPÉNICAS ABIETÁNICAS: COLOFONIA Y TREMENTINA VENECIANA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>43</b>
3.1.1	Colofonia .....	43
3.1.2	Trementina de Venecia .....	45
3.1.3	Procesos de deterioro .....	47
<b>3.2</b>	<b>Material y métodos .....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Barnices .....	52
3.2.2	Microorganismos estudiados .....	52
3.2.3	Preparación de las muestras.....	53
3.2.3.1	Soportes de cultivo .....	53
3.2.3.2	Obtención de esporas fúngicas.....	53
3.2.3.3	Obtención de suspensiones bacterianas.....	53
3.2.3.4	Inoculación de microorganismos en los soportes y cultivo .....	54
3.2.4	Técnicas de análisis .....	54
3.2.4.1	Control de crecimiento .....	54
3.2.4.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) .....	54
<b>3.3</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>55</b>
3.3.1	Control de crecimiento.....	55
3.3.2	Cromatografía de gases/espectrometría de masas.....	57
3.3.2.1	Colofonia.....	58
3.3.2.2	Trementina veneciana .....	65
	<b>Referencias .....</b>	<b>75</b>

## **4 RESINAS DITERPÉNICAS LABDÁNICAS: SANDÁRACA Y COPAL DE MANILA ..... 79**

<b>4.1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>79</b>
4.1.1	Sandáracas .....	79
4.1.2	Copal de Manila .....	81
4.1.3	Procesos de deterioro.....	83
<b>4.2</b>	<b>Material y métodos.....</b>	<b>86</b>
4.2.1	Barnices.....	86
4.2.2	Microorganismos estudiados .....	86
4.2.3	Preparación de las muestras.....	87
4.2.3.1	Soportes de cultivo.....	87
4.2.3.2	Obtención de esporas fúngicas.....	87
4.2.3.3	Obtención de suspensiones bacterianas.....	87
4.2.3.4	Inoculación de microorganismos en los soportes y cultivo.....	88
4.2.4	Técnicas de análisis .....	88
4.2.4.1	Control de crecimiento.....	88
4.2.4.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	88
4.2.4.3	Pirólisis-cromatografía de gases/espectrometría de masas (Py-GC-MS).....	89
4.2.4.4	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier .....	90
<b>4.3</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>91</b>
4.3.1	Control de crecimiento .....	91
4.3.2	Cromatografía de gases/espectrometría de masas .....	92
4.3.2.1	Sandáracas.....	93
4.3.2.2	Copal de Manila.....	98
4.3.3	Pirólisis-cromatografía de gases/espectrometría de masas .....	103
4.3.3.1	Sandáracas.....	104
4.3.3.2	Copal de Manila.....	107
4.3.4	Espectroscopia infrarroja.....	110
	<b>Referencias.....</b>	<b>121</b>

## **5 RESINAS TRITERPÉNICAS: DAMMAR Y ALMÁCIGA ..... 125**

<b>5.1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>125</b>
5.1.1	Dammar .....	125
5.1.2	Almáciga .....	128
5.1.3	Procesos de deterioro.....	132
5.1.3.1	Reacciones de oxidación.....	132
5.1.3.2	Procesos de polimerización.....	134
<b>5.2</b>	<b>Material y métodos.....</b>	<b>135</b>
5.2.1	Barnices.....	135
5.2.2	Microorganismos estudiados .....	135
5.2.3	Preparación de las muestras.....	136
5.2.3.1	Soportes de cultivo.....	136
5.2.3.2	Obtención de esporas fúngicas.....	136

5.2.3.3	Obtención de suspensiones bacterianas.....	136
5.2.3.4	Inoculación de microorganismos en los soportes y cultivo.....	137
5.2.4	Técnicas de análisis.....	137
5.2.4.1	Control de crecimiento.....	137
5.2.4.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	137
<b>5.3</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>138</b>
5.3.1	Control de crecimiento.....	138
5.3.2	Cromatografía de gases/ espectrometría de masas.....	139
5.3.2.1	Dammar.....	140
5.3.2.2	Almáciga.....	150
	<b>Referencias.....</b>	<b>165</b>
<b>6</b>	<b>TRATAMIENTOS BIOCIDAS.....</b>	<b>169</b>
<b>6.1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>169</b>
6.1.1	Cloruro de benzalconio.....	171
6.1.2	Metatín N 5810/101.....	172
6.1.3	Preventol ON.....	173
<b>6.2</b>	<b>Material y métodos.....</b>	<b>174</b>
6.2.1	Preparación de los barnices.....	174
6.2.2	Microorganismos estudiados.....	174
6.2.3	Preparación de las muestras.....	174
6.2.4	Condiciones de cultivo.....	175
6.2.5	Técnicas de análisis.....	175
6.2.5.1	Control de crecimiento.....	175
6.2.5.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	175
<b>6.3</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>176</b>
6.3.1	Control de crecimiento.....	176
6.3.2	Cromatografía de gases /espectrometría de masas.....	178
6.3.2.1	Colofonia.....	178
6.3.2.2	Trementina veneciana.....	182
6.3.2.3	Sandáracas.....	186
6.3.2.4	Copal de Manila.....	188
	<b>Referencias.....</b>	<b>191</b>

<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>195</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>199</b>
	<b>ANEXO 1. ESPECTROS DE MASAS (DITERPENOS) .....</b>	<b>203</b>
	<b>ANEXO 2. ESPECTROS DE MASAS (TRITERPENOS) .....</b>	<b>211</b>
	<b>ANEXO 3. ESPECTROS DE MASAS (PIRÓLISIS).....</b>	<b>217</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA GENERAL .....</b>	<b>223</b>

---

# 1 Introducción general

## 1.1 Las resinas terpénicas

Las resinas terpénicas de origen natural han sido empleadas para los más diversos usos desde tiempos muy antiguos. Como materiales artísticos cumplen una importantísima función técnica, protectora y estética, determinada por sus propiedades ópticas y su capacidad adhesiva y filmógena, siendo ampliamente utilizadas por artistas y restauradores como componentes de medios pictóricos y capa final de acabado y protección.

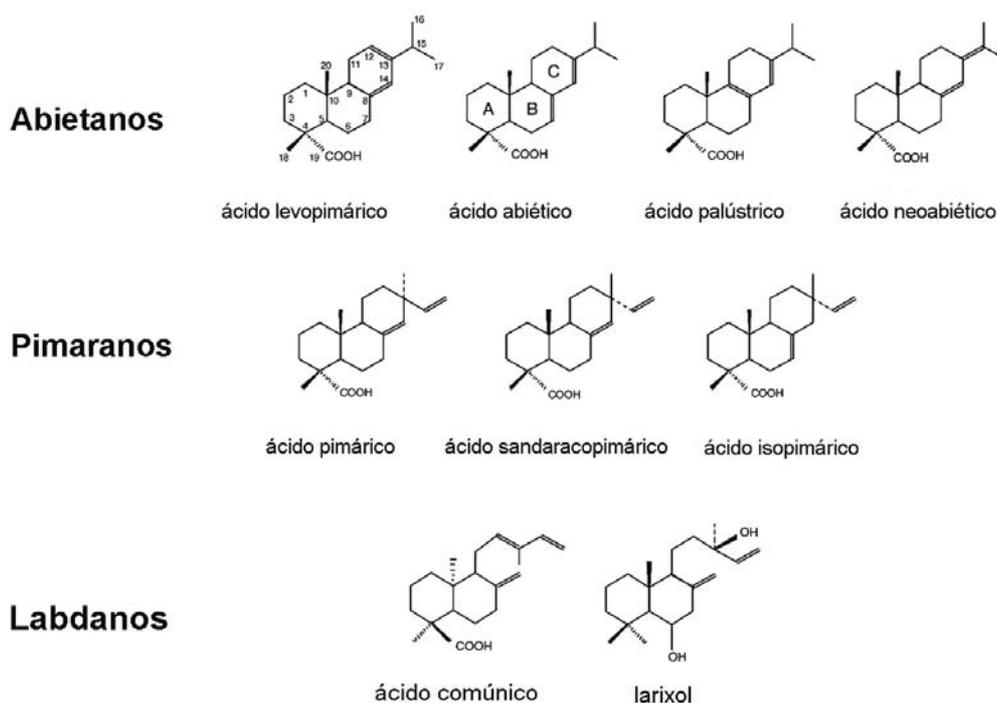
Difieren notablemente en cuanto a su procedencia y composición, si bien pueden agruparse en categorías con características químicas comunes. Todas se originan a partir del isopreno, estableciéndose cuatro grupos principales según el tamaño de las moléculas: las monoterpénicas están formadas por 2 isoprenos, mientras que las de tipo sesquiterpeno, diterpeno y triterpeno constan de 3, 4 y 6 unidades de isopreno, respectivamente. En un mismo producto de origen natural no aparecen nunca a la vez diterpenos y triterpenos (Mills & White 1994).

Los barnices de uso artístico están englobados en las dos últimas categorías de sustancias, las únicas que tienen capacidad de producir películas sólidas, siendo los monoterpenos y sesquiterpenos líquidos más o menos viscosos, entre los que destaca por su gran importancia industrial la esencia de trementina, obtenida por destilación de la resina de pino (Masschelein-Kleiner 1992).

## Diterpenos

Los productos más empleados son la colofonia y la trementina veneciana (fam. Pináceas), siendo también importantes la sandárica (fam. Cupresáceas), el copal de Manila (fam. Araucáceas) o los barnices procedentes de leguminosas, entre los que se encuentran diversos copales o el bálsamo de Copaiba (Mills & White 1994; Masschelein-Kleiner 1992).

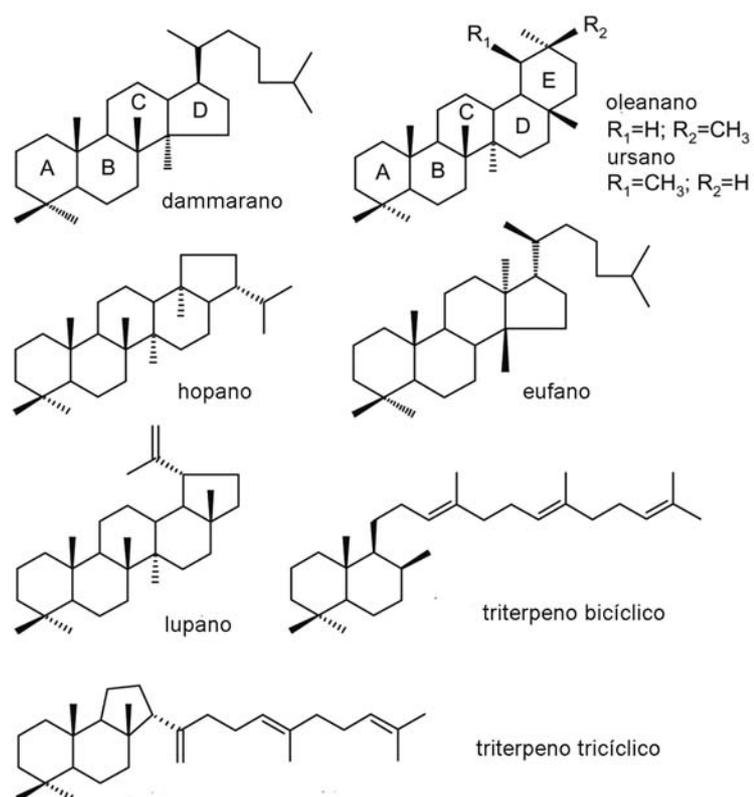
Las resinas de coníferas se componen de diterpenos tricíclicos de tipo abietano y en menor medida pimarano, mientras que la sandárica y el copal de Manila están constituidas principalmente por una estructura polimérica formada a partir del ácido comúnic, diterpeno bicíclico de estructura labdánica (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994) (Figura1).



**Figura 1** Principales componentes de las resinas diterpénicas

## Triterpenos

Las resinas triterpénicas más empleadas son el dammar (fam. Dipterocarpaceas) y el mástic o almáciga (fam. Anacardiáceas). Químicamente son mezclas complejas de sustancias sintetizadas por ciertas plantas a partir del escualeno que presentan un esqueleto hidrocarbonado de 30C, normalmente de tipo tetracíclico o pentacíclico (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994). Las principales estructuras químicas descritas aparecen en la Figura 2.



**Figura 2** Principales componentes de las resinas triterpénicas

## *Historia*

El uso de resinas terpénicas como materiales artísticos está ampliamente documentado. En la Edad Media fueron muy populares recetas como la *vernice comune* o la *vernice liquida*, preparadas en caliente para solubilizar a altas temperaturas resinas como la colofonia, el mastic o la sandáraca en aceite de linaza (Palomino 1947; Arteni & Sánchez Posada 1984; Cennini 1988; Da Vinci 1995; Doerner 1998). A causa de su intenso amarilleo y oscurecimiento con el paso del tiempo, los barnices al aceite han sido paulatinamente desplazados a favor de recetas preparadas en frío, como los barnices al alcohol, de uso frecuente a partir del siglo XVI, en los cuales las resinas de pináceas, cupresáceas o leguminosas se aplicaban disueltas en vino, aprovechando su afinidad con el etanol (Doerner 1998). El desarrollo industrial de las técnicas de destilación en el siglo XIX generalizó el empleo de los barnices a la trementina, que es la forma más común de encontrarlos en la actualidad.

Las resinas naturales de mayor calidad son el dammar y la almáciga o mástic. Esta última, por ser de origen mediterráneo, viene siendo empleada desde muy antiguo como barniz, y durante los siglos XVIII y XIX como *media* aglutinante mezclado con aceite de linaza (melgip), si bien el uso de estas mezclas está hoy desaconsejado ya que pese a sus calidades materiales producen a medio plazo todo tipo de defectos en la película pictórica (Mayer 1985). El dammar, pese a ser un producto de popularidad relativamente reciente (se usa en Occidente sólo a partir de la segunda mitad del siglo XIX) es muy apreciado como material artístico y ha desplazado al mástic en muchos casos, ya que está considerado como el mejor barniz de origen natural debido a la calidad de las películas que forma, su escasa tendencia al amarilleo y sus excepcionales propiedades ópticas (Mayer 1985; Doerner 1998).

El resto de resinas recibe hoy día un uso más limitado. La colofonia, a pesar de su tendencia al amarilleo y carácter quebradizo, continúa empleándose como barniz y adulterante de otros productos debido a su bajo coste, mientras que la sandáraca, pese a su importancia histórica, es hoy poco utilizada a causa de su gran dureza. La trementina veneciana es un importante aditivo en *media* pictóricos debido a su carácter plastificante, que provoca en los cuadros suaves efectos como de esmaltado y favorece las mezclas y transiciones suaves en la pintura, pero no puede emplearse como barniz directo, ya que seca demasiado lentamente, presenta tendencia al amarilleo y las películas que forma por sí sola son más bien quebradizas (Mayer 1985; Doerner 1998).

Otras resinas naturales de cierta importancia son los copales, término éste algo confuso, ya que ha sido empleado para denominar al copal de Manila, soluble en alcohol y de características similares a la sandáraca, y también a ciertos barnices muy duros y en general de escasa calidad compuestos de resinas fósiles muy insolubles que deben ser preparados por mezcla en caliente con aceites secantes (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994).

### *Procesos de deterioro*

Los procesos de envejecimiento de los barnices constituyen uno de los mayores problemas para la conservación de obras de arte pictóricas y escultóricas. Las resinas cambian su composición y propiedades con el tiempo, materializándose dichas transformaciones en fenómenos como el amarilleo, patrones de craquelado y microfractura (los pasmados del barniz), aumento de la fragilidad y cambios en la solubilidad. Las alteraciones a nivel visual resultan fundamentales para la apreciación de la obra de arte, mientras que los cambios químicos interfieren considerablemente en el trabajo de los restauradores, ya que llevan a la formación de productos polimerizados o más polares que los originales, que en general resultan mucho más difíciles de remover en caso de hacerse necesaria una limpieza, con el consiguiente riesgo añadido para la integridad de la capa pictórica.

El envejecimiento de resinas terpénicas ha sido estudiado en importantes trabajos (Van der Doelen (PhD thesis) 1999; Van den Berg *et al.* 2000; Scalarone *et al.* 2003; entre otros) que analizan la composición de barnices antiguos procedentes de obras de arte, o bien enfocan la cuestión desde el punto de vista fotoquímico, estudiando los cambios, generalmente oxidativos, sufridos en procesos de envejecimiento acelerado “*in vitro*” con radiaciones. Sin embargo, estos experimentos cuentan con la limitación de estudiar el problema desde un único punto de vista, no abarcando todos los posibles factores que intervienen en la degradación de estos materiales a lo largo del tiempo.

Entre ellos, uno de los grandes olvidados es el efecto que los microorganismos puedan tener de cara a la transformación de estas sustancias, casi siempre presentes en la composición de los objetos artísticos y generalmente en contacto directo con el medio externo como veladuras finales de acabado y capa de protección. Aparte de la presente tesis doctoral y un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación (Doménech-Carbó *et al.* 2006), sólo existen datos al respecto en el caso de la colofonia (Liss *et al.* 1997; Martin *et al.* 1999 entre otros), si bien no referidos directamente a su empleo como material artístico, sino como residuo tóxico del proceso de fabricación del papel.

## Introducción

Tampoco existe suficiente bibliografía descriptiva de microorganismos destacados como degradadores de las resinas terpénicas. En los trabajos dedicados a la detoxificación de la colofonia se han descrito bacterias y algún hongo seleccionados por sus especiales capacidades degradativas, pero salvo excepciones (*Artrhobacter sp*, *Bacillus sp*) no son habituales en la naturaleza y entornos museísticos.

Ante la falta de datos previos, se ha optado por seleccionar parte de los microorganismos utilizados en los experimentos de la presente tesis doctoral (once hongos y tres bacterias) mediante amplia revisión de la bibliografía existente acerca del biodeterioro de bienes culturales. Se han consultado importantes estudios sobre la actividad de agentes de biodeterioro en obras pictóricas, alteración de los diversos materiales utilizados, microorganismos más frecuentes, procesos de colonización y sistemas de identificación aplicables, si bien ninguno de ellos específicamente dirigido al biodeterioro de barnices terpénicos. (Ross 1963; Strzelczyk 1981; Giacobini *et al.* 1983; Bravery 1988; Agraval *et al.* 1989; Giacobini *et al.* 1988, 1991; Inoue & Koyano 1991; Caneva *et al.* 1994; Montes Estellés 1994; Bolívar 1995; Seves *et al.* 1996, 2000; Ciferri, 1999; Walsh 2001). También se han revisado trabajos dedicados a tratamientos de control del biodeterioro y mencionan especies consideradas como comunes en bienes culturales: (Heim *et al.* 1969; Valentín 1990; Valentín *et al.* 1996), y estudios sobre deterioro microbiológico en otros materiales artísticos, especialmente en papel (Arai 2000) y pintura mural, campo que presenta similitudes con respecto a la pintura de caballete y en el que resulta importante el deterioro bacteriano. (Petushkova & Lyalikova 1986; Giacobini *et al.* 1991).

Asimismo, se han incluido en el estudio cuatro hongos aislados de las obras “Alegoría de la muerte” (P.Toma, siglo XVII) y “San Francisco de Asís” (autor desconocido siglo XVII), en depósito en el Museo de Bellas Artes de Granada. Dichos cuadros han sido realizados mediante la técnica de óleo sobre lienzo y se encuentran muy afectados por fenómenos de biodeterioro al haber estado sometidos durante largo tiempo a un almacenaje inadecuado, en contacto con altos niveles de humedad (Figura 3).



“S. Francisco de Asís”  
(siglo XVII)



“Alegoría de la muerte”  
(siglo XVII)

**Figura 3.** Obras del Museo de Bellas Artes de Granada “San Francisco de Asís” y “Alegoría de la muerte” y puntos de toma de muestras.

## 1.2 Técnicas instrumentales empleadas

La técnica más empleada para el estudio de los terpenos naturales es la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), debido a su combinación de sensibilidad y versatilidad de uso. Esta técnica aúna las características del alto poder de resolución de la cromatografía de gases con la alta sensibilidad suministrada por el espectrómetro de masas, conformando un método altamente poderoso para la identificación y cuantificación de moléculas orgánicas volátiles.

### *1.2.1 Cromatografía de gases*

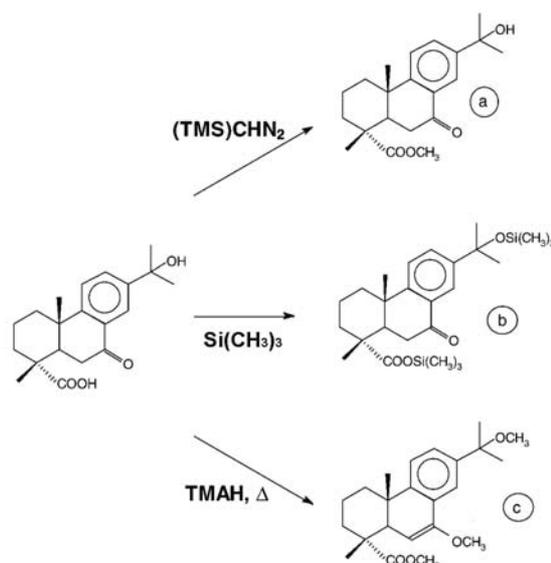
La cromatografía de gases es una técnica analítica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en una columna, produciéndose la elución por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, siendo su única función la de transportarlo a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), que utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte. Ésta última es la que se utiliza más ampliamente, y se suele llamar simplemente cromatografía de gases (GC), siendo la técnica cromatográfica empleada en la realización de la presente tesis doctoral.

Tiene dos importantes campos de aplicación. El primero sería su capacidad para resolver (separar) mezclas orgánicas complejas, y el segundo como método de determinación cuantitativo y cualitativo de los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto dadas unas determinadas condiciones (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), o el volumen de retención, mientras que integrando las áreas de cada compuesto, y empleando si es necesario los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o proporción de cada analito en la muestra.

#### *1.2.1.1 Técnicas de derivatización*

El estudio de resinas terpénicas por GC implica su volatilidad y estabilidad térmica en condiciones analíticas, lo que excluye a sustancias de peso molecular muy elevado, tales como la fracción polimérica de la resina de sandárica o los barnices de

copal. Para incrementar la volatilidad y estabilidad en fase gaseosa de los analitos se han desarrollado un buen número de técnicas de derivatización (figura 4).



**Figura 4.** Productos de derivatización del ácido 15-hidroxi-7-oxo dehidroabiético empleando (a) trimetilsilildiazometano (TMS) diazometano, (b) bis(trimetilsili) trifluoroacetamida (BSTFA), (c) hidróxido de trimetilamonio (TMAH)

La más empleada en el análisis de barnices artísticos ha sido la derivatización con diazometano gas ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) sobre grupos carboxilo, y su variante con trimetilsilildiazometano ( $\text{CHN}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) que ha prácticamente sustituido a la anterior. En esta técnica, el reactivo reacciona con metanol, formando trimetilsililmetanol y diazometano, que finalmente metila los grupos carboxilo de la muestra. Según Van der Berg *et al.* (2000) y Scalarone *et al.* (2002) presenta el problema de no resolver sustancias altamente oxidadas, como el ácido 15-hidroxi-7-oxo-dehidroabiético.

Otro método bastante utilizado es la trimetilsililación, efectiva sobre los grupos carboxilo e hidroxilo. Se suelen emplear como reactivos de sililación el bis(trimetilsili) trifluoroacetamida (BSTFA) o el hexametildisilazano (HMDS), que ha mostrado un buen comportamiento en el análisis de resinas terpénicas en combinación con pirólisis-GC-MS (Osete-Cortina & Doménech-Carbó 2005).

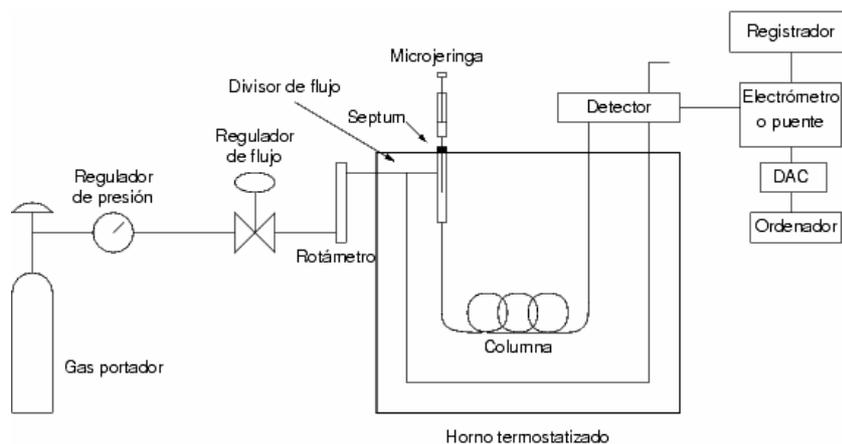
## Introducción

La técnica permite distinguir entre diterpenos libres y ésteres formados durante el proceso de envejecimiento, si bien los espectros de masas suelen contener menos información que con otras técnicas de derivatización, dado que el patrón de fragmentación predominante es la pérdida de un grupo metilo (Van den Berg *et al.* 2000).

Un sistema alternativo es la metilación térmicamente asistida con hidróxido de trimetilamonio (TMAH). Se realiza mezclando la sustancia a analizar con la solución de TMAH y evaporando el agua, con lo que se forman las sales de tetrametilamonio, que posteriormente por calentamiento dan lugar a los productos metilados en grupos carboxilo, hidroxilo y carbonilo. En combinación con pirólisis es muy empleada para análisis de mezclas complejas. La técnica no emplea silicio y por tanto no aumenta tanto el peso molecular de los derivatizados, por lo que en general es más empleada que la sililación. Sin embargo puede presentar problemas, ya que por una parte parece ser menos efectiva para derivatizar grupos hidroxilo, y por otra favorece, debido a la alcalinidad de las soluciones de TMAH, una serie de reacciones secundarias (isomerización, deshidratación, y rotura de enlaces hidrolizables) que pueden llevar a la aparición de nuevas sustancias no presentes en la muestra original (Pastorova *et al.* 2000; Scalarone *et al.* 2002).

### 1.2.1.2 Instrumentación

Un cromatógrafo de gases consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector (figura 5) (Skoog & Leary 1994).



**Figura 5.** Esquema de un cromatógrafo de gases

### *Gas portador*

El gas portador debe ser un gas inerte, para prevenir su reacción con el analito o la columna. Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono, y la elección de este gas en ocasiones depende del tipo de detector empleado. Las presiones de entrada varían entre 10 y 25 psi, lo que da lugar a caudales de 25 a 150 mL/min en columnas de relleno y de 1 a 25 mL/min en columnas capilares.

### *Sistema de inyección de muestra*

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada y de forma rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; efecto que se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa de varios microlitros para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea, que está a una  $T^a$  de 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil

### *Columnas*

En GC se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Las del segundo tipo son las más comunes en la actualidad debido a su mayor rapidez y eficiencia. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 50 metros, y están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

### *La fase estacionaria*

Las propiedades necesarias para una fase estacionaria líquida inmovilizada son:

- Características de reparto (factor de capacidad  $\kappa'$  y factor de selectividad  $\alpha$ ) adecuados al analito.
- Baja volatilidad, debiendo ser el punto de ebullición de la fase estacionaria al menos 100°C mayor que la máxima temperatura alcanzada en el horno.
- Baja reactividad.
- Estabilidad térmica, para evitar su descomposición durante la elución.

## *Introducción*

Existen como mucho una docena de disolventes con estas características y para elegir uno debe además tenerse en cuenta la polaridad del analito, ya que a mayor polaridad del analito, mayor polaridad deberá tener la fase estacionaria. Las fases estacionarias más empleadas son las de polietilenglicol o las diversas variedades de siloxanos. Generalmente, en columnas comerciales la fase estacionaria se presenta enlazada y entrecruzada como una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado.

## *Sistemas de control de temperatura*

La temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Para ello, debe ajustarse con una precisión de décimas de grado. Dicha temperatura depende del punto de ebullición de la sustancias a estudiar, y por lo general se ajusta a un valor igual o ligeramente superior a él, oscilando el tiempo de elución entre 2 y 30-40 minutos. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, como en el caso que nos ocupa, se ajusta la llamada rampa de temperatura, con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas, dependiendo de su correcto ajuste la correcta separación de los diferentes analitos. En general se puede afirmar que los componentes de mayor peso molecular y polaridad presentan tiempos de retención mayores en la columna utilizada. Es recomendable utilizar temperaturas bajas para la elución, ya que aunque a mayores temperaturas el proceso es más rápido, se corre el riesgo de descomponer el analito. En el caso de los terpenos, el principal problema radica en la presencia de grupos hidroxilo, que pueden sufrir procesos de deshidratación por un exceso de temperatura.

## *Detector*

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Las características de un detector ideal son:

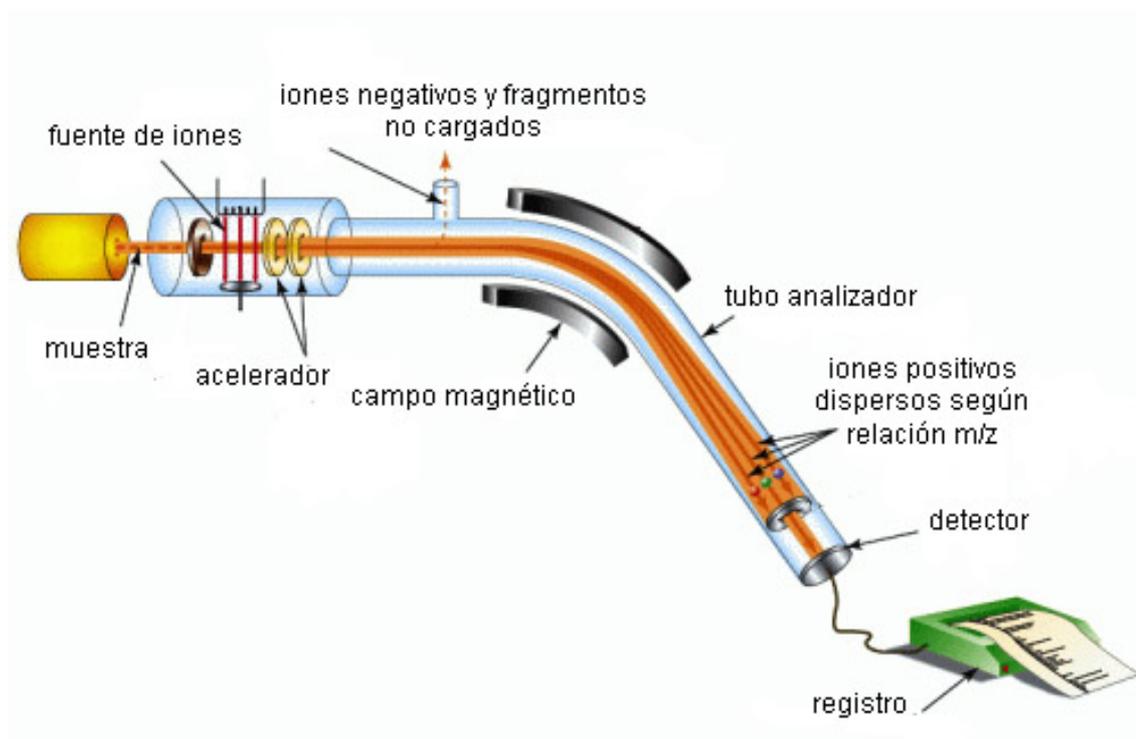
- Sensibilidad: Es necesario determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre  $10^{-8}$  y  $10^{-15}$  g/s de analito.
- Respuesta lineal al analito con un rango de varios órdenes de magnitud.
- Tiempo de respuesta corto, independiente del caudal de salida.
- Intervalo de temperatura de trabajo amplio, desde temperatura ambiente hasta unos  $350-400^{\circ}\text{C}$ .
- Estabilidad y reproducibilidad: es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.

- Respuesta semejante para todos los analitos, o respuesta selectiva y altamente predecible para un reducido número de analitos.

Los más usados son el detector de ionización de llama, de conductividad térmica, termoiónico, de captura de electrones o de emisión atómica y sobre todo el acoplamiento a un espectrómetro de masas, procedimiento empleado en la realización de la presente tesis doctoral.

### 1.2.2 Espectrometría de masas

El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con una gran precisión la composición de diferentes sustancias químicas e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica, y obtener información cualitativa (masa molecular del compuesto analizado así como obtener información estructural del mismo) y cuantitativa (Skoog & Leary 1994).



**Figura 6.** Principales componentes de un espectrómetro de masas

## *Introducción*

### *1.2.2.1 Instrumentación*

Un espectrómetro de masas consta (Skoog & Leary 1994) de las siguientes partes (Figura 6):

- Sistema de entrada de muestras.
- Fuente de iones.
- Acelerador.
- Analizador.
- Detector.

#### *Sistema de entrada de muestras*

Un hecho característico de los espectrómetros de masas es la necesidad de un sistema de vacío adecuado para mantener bajas presiones en todos los componentes del instrumento. En la entrada de muestras, un micromol o menos de ésta pasa al estado gaseoso por calentamiento a unos 400°C y se introduce lentamente en la cámara de ionización con la mínima pérdida de vacío. En los análisis realizados en la presente tesis doctoral el espectrómetro de masas se ha acoplado de forma directa a la columna cromatográfica.

#### *Fuente de ionización*

Es el elemento del espectrómetro que ioniza el material a ser analizado. Las más utilizadas son las de fuentes de Impacto Electrónico (EI) en las que se realiza el bombardeo de la muestra con una corriente de electrones a alta velocidad. Alternativamente, se puede llevar a cabo por energía térmica o eléctrica, iones, moléculas o fotones. En cualquier caso, la sustancia pierde algunos electrones y se rompe dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Siempre que una misma molécula se ionice en las mismas condiciones nos dará el mismo tipo y número de fragmentos, que constituyen un patrón característico de su composición.

#### *Sistema acelerador*

En el sistema acelerador las partículas ionizadas producidas por el impacto de los electrones son obligadas a atravesar una primera ranura aceleradora por una pequeña diferencia de potencial. Entre esta primera y una segunda ranura existe una diferencia de potencial muy elevada que les imprime su velocidad final. Una tercera ranura actúa como colimador del haz de partículas.

### *El analizador de masa*

Los iones acelerados son conducidos a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético o eléctrico para dispersar las partículas cargadas según su relación masa-carga. La separación de los diferentes iones de masa  $m$  y carga  $z$  se basa en la relación  $m/z = H^2 r^2 / 2V$  en la que  $H$  es la intensidad del campo magnético;  $r$  el radio de deflexión del tubo analizador y  $V$  es el potencial de aceleración utilizado.

Existen diversos tipos de analizadores: de sector magnético, de tiempo de vuelo, de filtro de masas de cuadrupolo, o de trampa de iones, además de otros analizadores experimentales. El más comúnmente usado es el denominado de cuadrupolo, que se compone de 4 barras alargadas en formación cuadrada, conectadas eléctricamente entre si en pares opuestos. A dichos pares (polos) se les aplica una tensión de radiofrecuencia variable que sintoniza con un determinado ión. Cuando existe sintonía entre el ión que está pasando por ellas y la frecuencia aplicada, dicho ión continúa su camino hacia el detector, siendo desviados todos los demás (Skoog & Leary 1994).

### *Detector*

Los iones procedentes del sistema analizador van llegando según su relación  $m/z$  al detector, el cual generalmente está constituido por un cátodo emisor que al recibir el impacto producido por las partículas cargadas emite electrones (electromultiplicador de dínodos). Estos electrones son acelerados hacia un dínodo, el cual emite varios electrones más al recibir el impacto de cada electrón. Este proceso se repite varias veces hasta obtenerse una cascada de electrones que llega al colector lográndose una corriente fuertemente amplificada, que pasa a un sistema registrador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

El pico del espectrograma que aparece con valor más elevado de  $m/z$  corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar y recibe el nombre de masa patrón. Esta masa patrón nos permite determinar con precisión la masa molecular, siempre que se opere con una tensión de ionización no excesivamente elevada, la cual produciría la fragmentación total de la molécula. El pico mayor del espectro de masas se llama pico base. Normalmente la altura de este pico se toma como valor cien y las intensidades de los demás picos se expresan en porcentajes de la intensidad del pico base (Skoog & Leary 1994).

### *1.2.3 Pirólisis –GC-MS*

La pirólisis acoplada a cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (Py/GC/MS) es un método instrumental que permite la caracterización de complejos macromoleculares no volátiles ni tratables por otras técnicas. Difiere de la GC/MS en el tipo de muestra a analizar y en el método en que es introducida en el sistema GC/MS. En lugar de ser inyectada directamente en una solución orgánica, unos pocos mg de la sustancia original (o en el caso de materiales con un alto contenido en carbono menos de 1 mg) son analizados directamente. El análisis suele ir precedido de una extracción con disolvente con el objeto de eliminar los componentes libres de bajo peso molecular, que suelen complicar los resultados analíticos. Tras la extracción, las muestras son insertadas en una cámara pirolítica de cuarzo, que es fuertemente calentada en un entorno libre de oxígeno durante un tiempo prefijado (por ejemplo 610 °C durante 10 s). La estructura macromolecular se rompe por acción térmica dando lugar a un patrón de fragmentación característico de cada sustancia. Dichos fragmentos pasan entonces a un sistema de análisis (normalmente GC/MS) para ser estudiados igual que cualquier otro compuesto.

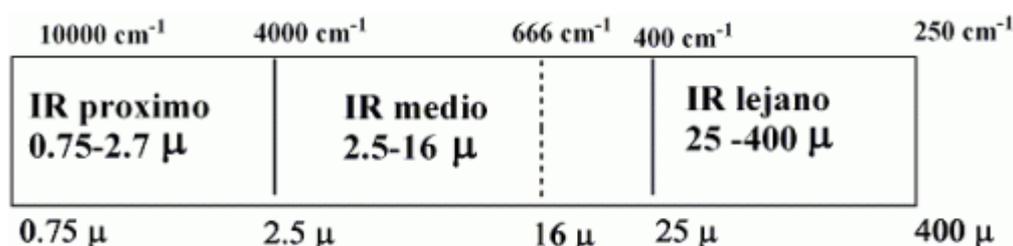
En el caso de algunas macromoléculas, es recomendable introducir un reactivo químico que tras la rotura térmica reaccione con la molécula de forma más específica, como por ejemplo produciendo sobre los enlaces de tipo éster, produciendo así mezclas de fragmentos derivatizados, más estables y volátiles para el posterior análisis por GC/MS en un proceso conocido como quimiólisis térmicamente asistida. Reactivos típicos de derivatización son el hidróxido de trimetil amonio (TMAH) o el hexametildisilazano (HMDS) (Scalarone *et al.* 2003; Osete-Cortina & Domenech-Carbó 2005).

La técnica ha sido empleada en trabajos relacionados con el estudio de sustancias filmógenas con gran éxito (Shedrinsky 1989, Pastorova *et al.* 1997, Scalarone *et al.* 2002, Scalarone *et al.* 2003, Osete-Cortina & Domenech-Carbó 2005, entre otros), permitiendo el análisis de productos de alto peso molecular, como los polímeros acrílicos o la fracción labdánica de policomunato de las resinas de copal de Manila o sandárac.

### 1.2.4 Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja es sumamente útil para determinaciones cualitativas de compuestos orgánicos y para deducir estructuras moleculares a partir de sus grupos funcionales tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos.

La porción infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano, medio y lejano (Figura 7), así nombrados por su relación con el espectro visible. El infrarrojo lejano (aproximadamente  $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) suele ser el usado en espectroscopia para estudiar las vibraciones fundamentales, mientras que el infrarrojo cercano ( $14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) puede excitar sobretonos o vibraciones armónicas.



**Figura 7.** Zona de infrarrojos del espectro electromagnético. Datos en número de onda ( $\nu = 1/\lambda\text{ cm}^{-1}$ ) y longitud de onda  $\lambda$  ( $\mu\text{m}$ )

La espectroscopia infrarroja se basa en la absorción de energía a frecuencias específicas correspondientes a niveles de energía cuantizados, que coinciden con una vibración determinada de algún enlace dentro de la molécula. Dichos movimientos vibratorios pueden ser de dos tipos básicos:

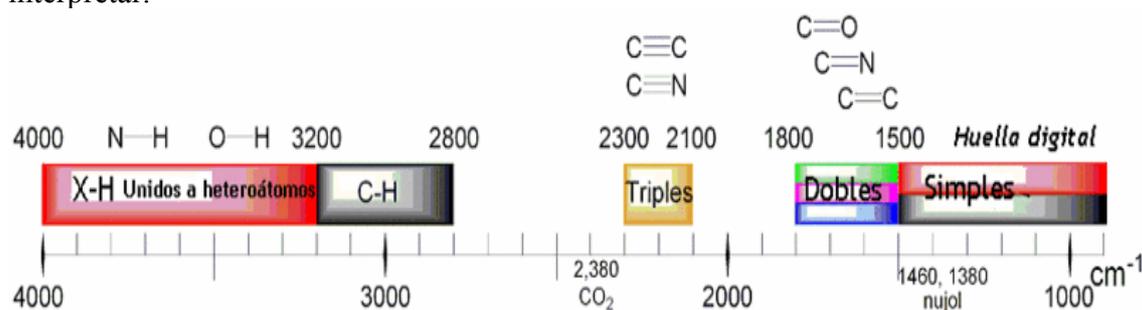
- De tensión: Simétrico y asimétrico
- De flexión: Balanceo, aleteo tijereteo y torsión

El espectro de IR de una muestra se obtiene registrando la cantidad de energía absorbida en cada longitud de onda de la radiación IR incidente, lo que puede lograrse escaneando el espectro con un rayo monocromático que va cambiando de longitud de onda en un intervalo de tiempo o usando una transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez, procedimiento utilizado en el presente estudio. Así, se puede trazar un espectro de transmitancia o absorbancia que

## Introducción

permite la interpretación de los enlaces presentes a través de la energía absorbida en el infrarrojo por la muestra (Skoog y Leary 1994).

La técnica funciona exclusivamente con enlaces covalentes, y como tal es de gran utilidad en química orgánica. Espectros nítidos se obtienen de muestras con pocos enlaces activos al IR y altos niveles de pureza, mientras que estructuras moleculares más complejas llevan a más bandas de absorción y a espectros difíciles de interpretar.



**Figura 8.** Correlaciones absorción-enlace químico en espectroscopía infrarroja. (4000 a 2900  $\text{cm}^{-1}$ : Tensión de C-H, O-H y N-H ; 2500 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ : Tensión de triples enlaces y dobles enlaces acumulados; 2000 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ : Tensión de C=O, C=N y C=C ; 1500 a 600  $\text{cm}^{-1}$ : Zona de la huella dactilar (Flexión de enlaces CH,CO,CN,CC)

Dentro de la región del I.R. Fundamental existen dos regiones, la llamada de los grupos funcionales (4000 $\text{cm}^{-1}$  a 1300  $\text{cm}^{-1}$ ), y la región de la huella dactilar, de 1300  $\text{cm}^{-1}$  a 670  $\text{cm}^{-1}$  (figura 8). En la región de los grupos funcionales la posición del pico de absorción depende solamente de los grupos funcionales presentes y no de la estructura molecular completa. En cambio, los picos en la región dactilar son dependientes de la estructura molecular completa.

### Preparación de las muestras

Las muestras sólidas se pueden preparar principalmente de dos maneras. La primera es moler la muestra con un agente aglomerante para la suspensión (usualmente nujol) en un mortero de mármol o ágata, realizándose la medición por aplicación de una fina película de la mezcla en las placas de sal. El segundo método, usado en el presente estudio, consiste en triturar finamente una cantidad de muestras con una sal especialmente purificada (usualmente bromuro de potasio). Esta mezcla en polvo se comprime en una prensa de troquel mecánica para formar un pellet translúcido a través del cual puede pasar la radiación (Skoog y Leary 1994).

#### *1.2.4.1 Instrumentación*

Un equipo de espectroscopia infrarroja consta de las siguientes partes (Skoog & Leary 1994):

##### *Fuentes*

La fuente infrarroja común es un sólido calentado eléctricamente a temperatura entre 1500° y 2000° K. En los instrumentos de IR comerciales se usan tres tipos de fuentes: la fuente Global, el emisor de Nernst y la fuente de filamento incandescente.

##### *Monocromadores*

Un monocromador infrarrojo consiste en un sistema variable de ranuras de entrada y salida, uno o más elementos dispersantes y varios espejos para reflejar y enfocar el haz de radiación. Los más empleados son los prismas de cloruro de sodio cristalino.

##### *Detectores*

La medición de radiación infrarroja resulta difícil debido a la baja intensidad de las fuentes disponibles y a la poca energía del fotón infrarrojo. Como consecuencia de estas propiedades, la señal eléctrica de un detector infrarrojo es pequeña y su medición requiere grandes factores de amplificación. Los detectores utilizados en infrarrojo son: detectores térmicos (termopares, bolómetros y celda de Golay) y los basados en fotoconducción (Skoog & Leary 1994).

## *Introducción*

## Referencias

Agraval OP, Dhawan S, Garg KL (1989). Microbial deterioration of paintings: A review. Intach Conservation Centre, Lucknow, India, pp 1-51

Arai H (2000). Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46:181-188.

Arteni SC, Sánchez Posada M (1984). From handcraft to mass production: notes on the manufacture of oil painting materials, in: Proceedings of the 7th Triennial Meeting of the ICOM Committee for Conservation, Copenhagen.

Bolívar Galiano FC (1995). Los Agentes de Biodeterioro del Patrimonio Pictórico, Textil y Gráfico. *Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 12: 50-51.

Bravery AF (1998). Biodeterioration of paint. A state of the art comment. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 466- 485.

Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (1994). *La biología nel restauro*. Nardini editore. Florence, pp 92-95.

Cennini C (1998). *El libro del Arte*. Akal, Madrid, p 141.

Ciferri O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3): 879-885.

Da Vinci L (1995). *Tratado de pintura*, 3º Ed. Akal, Madrid, p141.

Doerner M (1998). *Los materiales de pintura y su empleo en el arte*. 1ª ed. Reverté, Barcelona, pp 94-100.

Doménech-Carbó MT, Osete-Cortina L, de la Cruz Cañizares J, Bolívar-Galiano F, Romero-Noguera J, Fernández-Vivas MA, Martín-Sánchez I (2006). Study of the microbiodegradation of terpenoid resin-based varnishes from easel painting using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chemistry*, 385 ( 7): 1265 – 1280.

Giacobini, C, De Cicco MA, Tiglie I, Accardo G (1988). Actinomycetes and Biodeterioration in the Field of Fine Art. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 418-423.

Giacobini C, Pedica M, Spinucci M (1991). Problems and Future Projects on the Study of Biodeterioration: Mural and Canvas Paintings. In. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International*

## Introducción

*Conference on the Biodeterioration of Cultural Property. Mc Millan India Ltd, New Delhi. Cap 31, pp 275-286.*

Heim R, Francoise F, Nicot J (1968). "Combatting Moulds Which Develop on Cultural Properties in Tropical Climates." *Conservation of Cultural Properties with Special Reference to Tropical Climates. Lausanne, Switzerland: UNESCO, pp 45-48.*

Inoue M, Koyano M. (1991) Fungal Contamination of Oil Paintings in Japan. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 28: 23-35.

Liss SN, Bicho PA, Saddler JN (1997). Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can J Microbiol* 75: 599-611 (and references cited therein)

Martin VJJ, Yu Z, Mohn WW (1999). Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. *Arch. Microbiol*, 172: 131-138

Masschelein-Kleiner L (1992). *Liants, vernis et adhésifs anciens*. Institut Royal du Patrimoine Artistique. Bruxelles, pp 86-100.

Mayer R (1985). *The artist's handbook of materials and techniques*. 1ª ed. Blume, Madrid, pp 156-185.

Mills JS, White R (1994). *The Organic Chemistry of Museum Objects*. Butterworths, London, pp 99-108.

Montes Estellés RM (1994). Estudio de la contaminación fisicoquímica y microbiológica, en el conjunto patrimonial de la basílica de la Virgen de los Desamparados de Valencia. *Comunicaciones técnicas, libro segundo. II Congreso Nacional de Medio Ambiente*. Madrid, 21-25 noviembre 1994, pp 23-37.

Osete-Cortina L, Doménech-Carbó MT (2005). Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *Journal of Chromatography A*, 1065 (2): 265-278.

Palomino A (1947). *El museo pictórico y escala óptica*. Aguilar, Madrid, p 745.

Pastorova I, van der Berg KJ, Boon JJ, Verhoeven JW (1997). Análisis of oxidised diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMHA. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 43: 41-57.

Petushkova JP, Lyalikova NN (1986) Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Studies in Conservation*, 31: 65-69.

Ross RT (1963). Microbiology of paint films. *Adv. Appl. Microbiology*, 5: 217- 234.

Scalarone D, Lazzari M, Chiantore O (2002). Ageing behaviour and pyrolytic characterisation of diterpenic resins used as art materials: colophony and Venice turpentine. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 64: 345–361.

Scalarone D, Lazzari M, Chiantore M (2003). Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 68-69: 115-136.

Seves A, Sora S, Ciferri O. (1996). The microbial colonization of oil paintings. A laboratory investigation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 37 (3-4): 215-224.

Seves A, Romano H, Scilione G, Maifreni T, Sora S. (2000). A laboratory investigation of the microbial degradation of cultural heritage (ICMC). In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G (Eds.), *Of microbes and art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, pp 121-133.

Shedrinsky AM, Wampler TP, Indictor N, Baer NS (1989). Application of analytical pyrolysis to problems in art and archaeology: A review. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 15: 393-412.

Skoog DA, Leary JJ (1994). *Análisis Instrumental*. McGraw-Hill, Madrid.

Strzelczyk AB (1981). Paintings and Sculptures. In: Rose AH (Ed.), *Microbial deterioration*. Academic Press, London, pp 203-234.

Valentín N (1990). Contaminación biológica en materiales arqueológicos y su erradicación por medio de tratamientos no tóxicos. *Cuadernos del Instituto de Conservación de Bienes Culturales, Madrid*, pp 113-120.

Valentín N, Vaillant M, Guerrero H. (1996). Control integrado de plagas en bienes culturales de países de clima mediterráneo y tropical. XI Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales. Castellón, 3-6 octubre. Ed Diputación de Castellón: pp 205-215.

Van den Berg KJ, Boon JJ, Pastorova I, Spetter LFM (2000). Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in old Masters paintings. *Journal of Mass Spectrometry*, 35: 512-533.

Van der Doelen GA (1999) “Molecular studies of fresh and aged triterpenoid varnishes”. PhD thesis. University of Amsterdam, Amsterdam.

Walsh JH (2001). Ecological considerations of biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48: 16-25.

## *Introducción*

---

## 2 Objetivos

El principal propósito de la presente tesis doctoral es estudiar la capacidad que pueden presentar hongos y bacterias para transformar las resinas terpénicas, aumentando así el conocimiento de un importante factor en la conservación de estos materiales artísticos que ha sido escasamente investigado hasta el momento. La comprensión de estos fenómenos puede resultar de gran importancia, ya que los cambios en las propiedades de los barnices afectan profundamente a la apariencia de las obras de arte, y sólo son subsanables mediante su eliminación en operaciones de limpieza irreversibles y frecuentemente traumáticas, a las que se llega por un insuficiente conocimiento de los complejos procesos degradativos que les pueden afectar y de los procedimientos para evitarlos.

### Objetivos generales

- 1) Estudio de las alteraciones producidas por hongos y bacterias frecuentemente relacionadas con el biodeterioro de bienes culturales sobre los barnices terpénicos naturales más empleados en técnicas artísticas, divididos en tres capítulos:
  - Resinas diterpénicas abietánicas (colofonia y trementina veneciana)
  - Resinas diterpénicas labdánicas (sandárac y copal de Manila)
  - Resinas triterpénicas (dammar y almáciga)
  
- 2) Estudio del efecto del empleo de biocidas de amplio uso en restauración para evitar estos fenómenos y sus posibles interacciones con los barnices.



---

## 3 Resinas diterpénicas abietánicas: colofonia y trementina veneciana

### 3.1 Introducción

#### 3.1.1 Colofonia

La colofonia es la resina obtenida de algunas especies de pinos (familia *Pinaceae*, *Pinus* spp) ampliamente distribuidas por todo el Hemisferio Norte: Europa, Asia y América (Mills & White 1994). El nombre parece provenir etimológicamente de “cola sonora” (fónica) aludiendo a su empleo en los arcos de violín, aunque también puede estar relacionado con la ciudad griega de Colofón (Mayer 1985).

Es un material claro, transparente y quebradizo que se vende hasta en quince grados según el color y contenido en impurezas. Se obtiene de la secreción de las células epiteliales protectoras de la planta, dependiendo su composición y producción de diversos factores como la especie, edad o región. En general, puede decirse que aproximadamente el 5-8 % de la madera seca de coníferas está constituida por sustancias extraíbles, produciendo un árbol adulto hasta 5 kg por año (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994).

La resina de mayor calidad está constituida por la fracción no volátil obtenida tras la destilación de la resina de pino natural (gem rosin), mientras que las formas más económicas se extraen con disolventes a partir de la madera (wood rosin) o como subproducto de la fabricación de celulosa para papel. Esta última categoría es más conocida por el término inglés “tall oil rosin” (Masschelein-Kleiner 1994).

## *Colofonia y trementina veneciana*

Es el producto diterpénico más utilizado, con múltiples aplicaciones en la industria que van desde la fabricación de jabones, pegamentos y barnices hasta soldaduras electrónicas de estaño, resina sólida para arcos de violín o fármacos. Su empleo como material artístico está ampliamente documentado desde la Edad Media, periodo en el que fueron muy utilizadas recetas como el *vernice comune*, preparado en caliente con colofonia y aceite de linaza como componentes principales (Arteni & Sánchez Posada 1984). En el Barroco fue también un material de uso común, tal y como describe Antonio Palomino en su tratado artístico “El Museo Pictórico y escala óptica” (Palomino 1947). En el siglo XIX, gracias al desarrollo de los procesos de destilación, se popularizaron las recetas a la trementina preparadas en frío, que continúan siendo la formulación más difundida en la actualidad. En el campo de la restauración se emplea en la técnica de reentelado a la cera-resina (Doerner 1998).

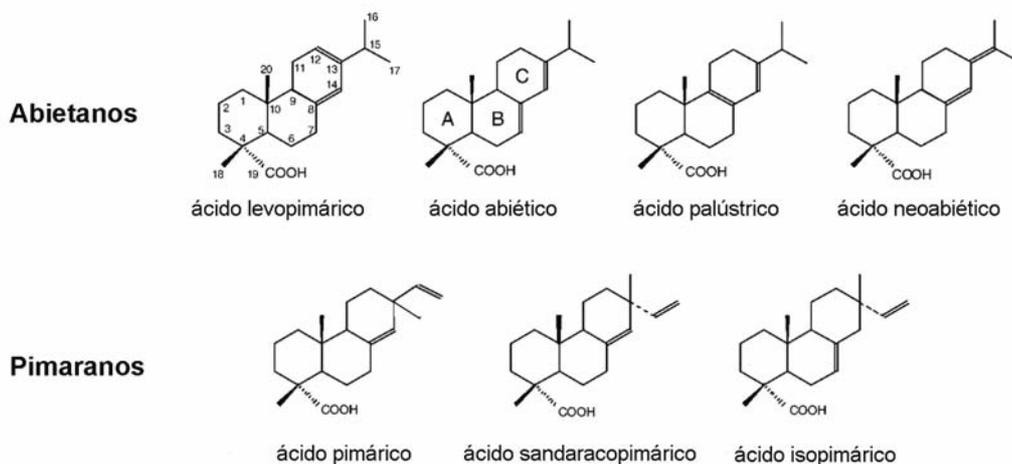
Aunque la colofonia es un material de que presenta ciertas deficiencias técnicas por su tendencia al amarilleo y carácter quebradizo, su empleo sigue siendo importante en nuestra época. El bajo coste de la colofonia en comparación con el de otras resinas naturales o artificiales de mayor calidad, tales como las acrílicas o el dammar, ha generalizado su uso como adulterante de productos y medium complejos tales como la trementina de Burdeos (*Pinus* sp.) y Strasburgo (*Abies* sp.), o el Bálsamo de Copaiba (Van den Berg *et al.* 2000).

### *Química*

La colofonia es una sustancia frágil, de aspecto vítreo y color de amarillo claro a pardo. Presenta carácter ácido y es soluble en alcoholes, ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos y aceites. Los componentes principales de la resina (aproximadamente el 90% del total) son diterpenos tricíclicos de tipo abietano y pimarano, siendo la cantidad relativa de estos últimos bastante menor. La diferencia básica entre ambos grupos radica en el sustituyente en posición C-13, que para abietanos es isopropil, y en pimaranos es de tipo vinílico o metílico (Figura 1).

Los abietanos de la resina fresca (ácido abiético, neoabiético, levopimarico y palústrico) son formas isoméricas que presentan sistemas de dobles enlaces conjugados fácilmente interconvertibles entre sí. Tienden a formar por oxidación un producto común, el ácido dehidroabiético (ácido 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-1-fenantrenocarboxílico), que presenta aromaticidad en el anillo C y es el componente principal de la colofonia no envejecida.

Aparte de la fracción terpénica, la resina presenta una pequeña cantidad de productos grasos y neutros insaponificables (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994).



**Figura 1** Principales diterpenos tricíclicos en las resina de colofonia y trementina veneciana

### 3.1.2 *Trementina de Venecia*

Es una resina semi-líquida obtenida de árboles de la especie *Larix* sp. (alerce), si bien la especie que rinde el producto de mayor calidad es *Larix decidua*, que crece en el Tirol. Como antiguamente todo el comercio tirolés se canalizaba a través de Venecia, el producto recibió la denominación de trementina veneciana (Doerner 1988). El nombre puede generar cierta confusión, dado que no es un producto de destilación, sino toda la secreción cruda, y viene dado por la tradición en su uso, ya que es anterior al significado moderno del término trementina, surgido en el siglo XIX con la popularización y perfeccionamiento a nivel comercial de las técnicas de destilado.

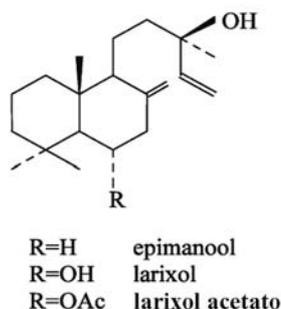
Es mencionada frecuentemente en recetas antiguas como aditivo para la pintura en mezclas de aceite de linaza hervido con sandáraca (vernice líquida), ya que mejora mucho los resultados obtenidos empleando sólo resina y aceite. También está documentado su uso en la preparación del pigmento verdoso resinato de cobre, citado en el manuscrito de Mayerne, del siglo XVII (Mayer 1985). Igualmente, es un componente de recetas para elaboración de veladuras en pintura al óleo o temple ampliamente difundidas en la actualidad. Su empleo ha estado siempre restringido

## Colofonia y trementina veneciana

como aditivo en mezclas por su carácter plastificante, que provoca en los cuadros suaves efectos como de esmaltado y favorece las mezclas y transiciones suaves en la pintura, pero no puede emplearse como barniz directo, ya que seca demasiado lentamente, presenta tendencia al amarilleo y las películas que forma son más bien quebradizas. En restauración aparece descrita en recetas como adhesivo en técnicas de reentelado (Mayer 1985; Doerner 1988).

## Química

La trementina veneciana tiene una composición química bastante similar a la de la colofonia. Como rasgo diferenciador presenta una importante cantidad de compuestos diterpénicos bicíclicos de tipo labdánico, como el epimanol, el larixol o el acetato de larixilo (Figura 2). Las dos últimos no se encuentran en ninguna otra resina diterpénica y actúan como marcadores de esta sustancia. También pueden encontrarse pequeñas cantidades de mono y sesquiterpenos, que confieren a este material un carácter más líquido que otras resinas (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994; Osete-Cortina *et al.* 2004).



**Figura 2.** Principales labdanos en la resina de colofonia y trementina veneciana

### 3.1.3 Procesos de deterioro

El envejecimiento de estas sustancias a nivel molecular es principalmente resultado de la oxidación de sus componentes.

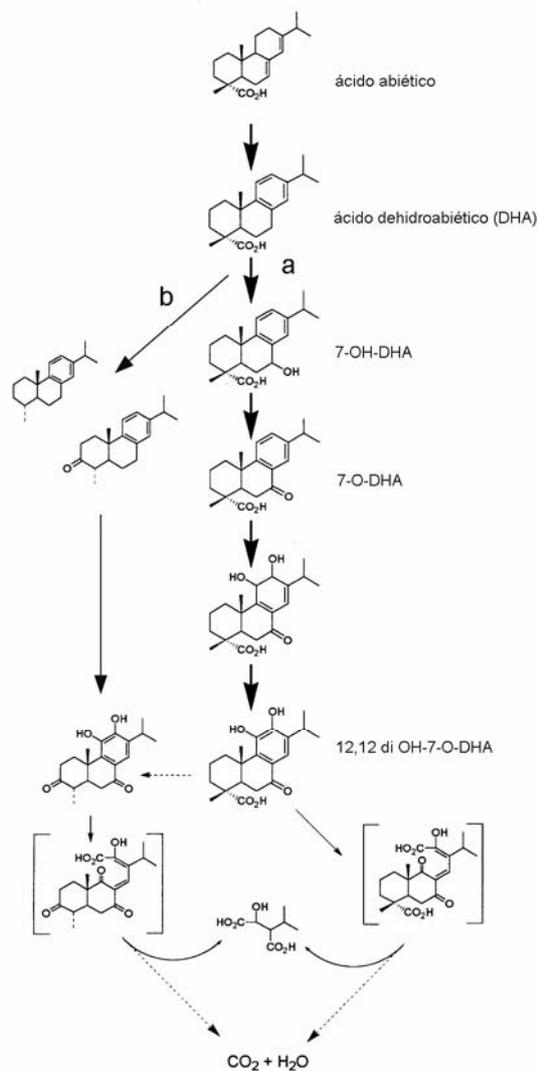
La escasa información relativa a los diterpenos de tipo pimarano muestra que son poco susceptibles de ser transformados por microorganismos, ya que no presentan sistemas de dobles enlaces conjugados y son por ello más estables ante procesos oxidativos (Liss *et al.* 1997; Martin *et al.* 1999). El único caso de degradación del ácido isopimárico (*Pseudomonas* sp.) ha sido descrito por Wilson *et al.* (1996) en un trabajo dedicado al proceso de fabricación del papel.

En cambio, se ha dedicado mucha más atención a la biodegradación de diterpenos abietanos, dada su importancia como productos contaminantes derivados de la industria papelera, habiéndose publicado en este campo importantes trabajos en los que se han descrito diversas rutas metabólicas degradativas.

Biellmann *et al.* (1973 a,b) han propuesto un modelo de biotransformación de abietanos para las bacterias *Pseudomonas* sp y *Alcaligenes eutrophus* basado en la determinación de intermediarios en medios de cultivo suplementados con inhibidores enzimáticos. Comienza (a) con la oxidación enzimática en la posición C-7, dando lugar a los productos 7-hidroxi-dehidroabiético y 7-oxo-dehidroabiético, y prosigue con la transformación del anillo aromático en un 11,12-difenol. Procesos oxidativos posteriores pueden llevar a la hendidura del anillo aromático, presumiblemente a través de la formación de un hemiacetal, y a la formación de productos simples derivados de ácido málico (Figura 3).

Una vía paralela (b), propuesta para *Flavobacterium resinovorum*, se inicia con la descarboxilación y oxidación enzimática en C-3 y C-7 del ácido dehidroabiético (DHA), pudiendo dichos productos verse afectados por nuevas hidroxilaciones en las posiciones C-15, C-11 y C-12 y evolucionar hasta sustancias análogas a las anteriormente descritas (Figura 3).

También Martin & Mohn (1999) y Martin *et al.* (1999) han descrito más recientemente procesos muy similares para *Pseudomonas abietaniphilia*, que es capaz de oxidar el ácido dehidroabiético hasta 7-oxo-11,12-dihidroxi-dehidroabiético, con posterior escisión del anillo aromático mediada por una dioxigenasa, y formación de derivados diácidos simples y dos sustancias cíclicas independientes: 4-metil-3-metilcarboxil-ciclohexanol y 4-metil-3-metilcarboxil-ciclohexanona.



**Figura 3** Resumen de las rutas metabólicas de degradación de abietanos según los trabajos de Biellmann et al. (*Flavobacterium resinovorum*, *Alcaligenes eutrophus* y *Pseudomonas* sp), y Martin & Mohn (*Pseudomonas abietaniphilia*)

Por tanto, la bibliografía existente mantiene con escasas variantes la posibilidad de oxidaciones en C7 como principal vía inicial de degradación enzimática de diterpenos por parte de las bacterias, seguida de posteriores hidroxilaciones en C-11, C-12 y degradación hasta productos sencillos. Los géneros descritos como

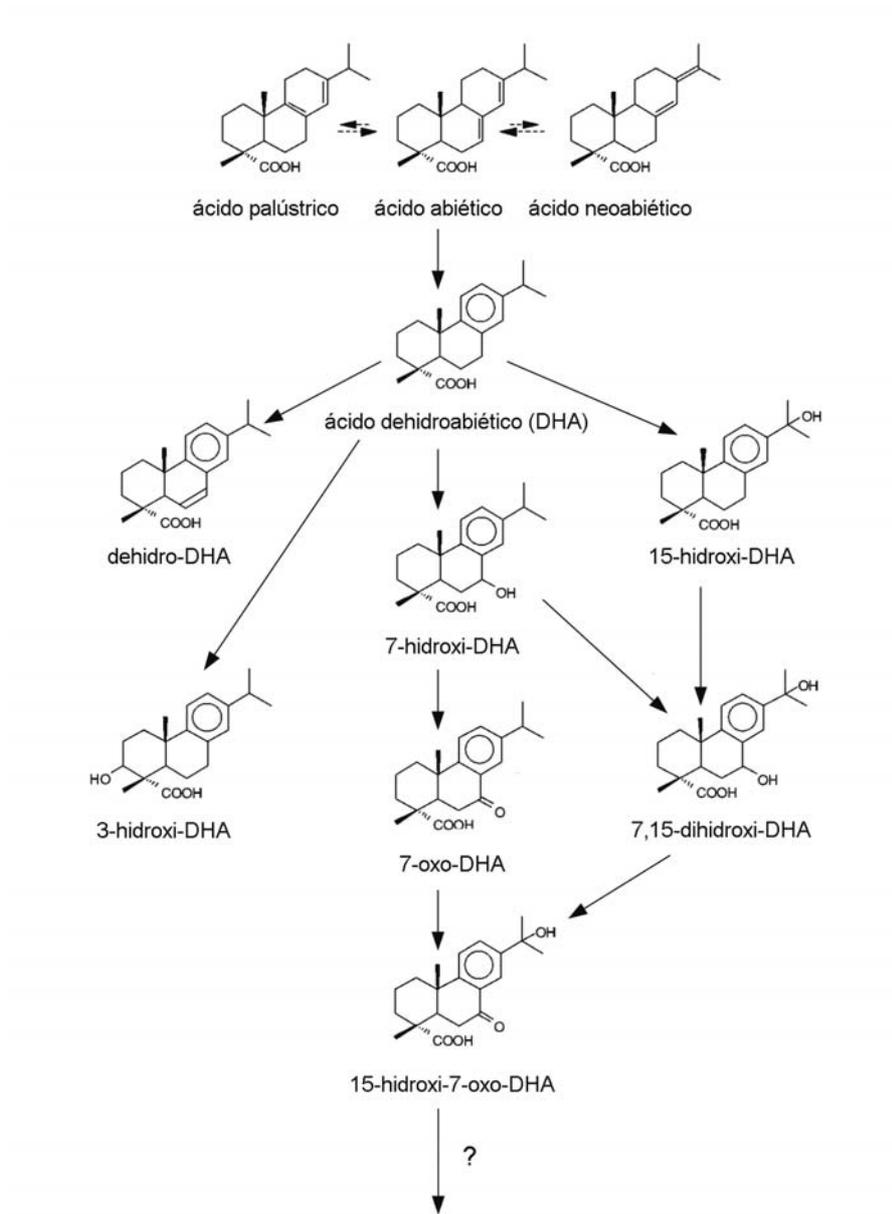
degradadores de abietanos en los trabajos mencionados y otros similares han sido: *Zooglea*, *Sphingomonas*, *Ralstonia Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus* y *Proteobacterium* (Liss *et al.* 1997; Martin *et al.* 1999).

En cuanto a los hongos, la información es más escasa, si bien se han publicado algunos trabajos similares a los comentados, también dedicados a procesos de detoxificación de productos contaminantes. Las reacciones descritas son básicamente procesos de oxidación (hidroxilación) en posiciones concretas, tales como las producidas por *Corticium sasaki* (C-3), *Fomes annosus* (C-1, C-15 y C-16), o *Mortieriella isabellina* (C-2, C-15 y C-16), mientras que en el caso de *Chaetomium cocchlides* se ha descrito la transformación del ácido dehidroabiético en el ácido 15,16-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-18-oico (Kutney *et al.* 1985, 1988; Liss *et al.* 1997 y artículos citados).

En el campo del biodeterioro de bienes culturales no hemos encontrado estudios específicamente dedicados al deterioro de diterpenos por microorganismos, a excepción del publicado por nuestro equipo de investigación (Doménech-Carbó *et al.* 2006) en el que se describen procesos oxidativos causados en la colofonia por ciertos hongos y bacterias, principalmente sobre las posiciones C-7 y C15.

Sí que se han publicado diversos trabajos que determinan los productos de oxidación encontrados en resinas sometidas a procesos de fotoenvejecimiento acelerado con radiaciones, o bien estudios analíticos de resinas envejecidas de forma natural en obras de arte, en los que no se especifica que hayan podido estar sometidas a procesos de biodeterioro. En ninguno de ellos se han encontrado formas tan fuertemente transformadas de los diterpenos de la colofonia como las descritas en los estudios dedicados a la industria papelera, producto de la actividad de microorganismos “degradadores profesionales” que normalmente no están presentes en entornos museísticos. Los compuestos más frecuentemente descritos en trabajos focalizados en materiales artísticos (Figura 4) son el ácido dehidroabiético, su derivado con un doble enlace más (ácido  $\Delta 6$  dehidro-dehidroabiético) y las formas oxidadas en posición 7 (ácidos 7-hidroxi-dehidroabiético y 7-oxo-dehidroabiético). También resulta destacable la presencia de productos polioxidados, principalmente en posiciones 3, 7 o 15 (Pastorova *et al.* 1997; Van den Berg *et al.* 2000; Scalarone *et al.* 2002; Doménech-Carbó *et al.* 2006).

Estos derivados terpénicos aparecen en diversas cantidades según el tipo de barniz y su antigüedad. De entre todos ellos, hay que señalar por su abundancia química a dos como los más importantes marcadores de resinas de coníferas envejecidas en obras de arte: el ácido 7-oxo-dehidroabiético y el ácido 15-hidroxi-7-oxo-dehidroabiético (Van den Berg *et al.* 2000).



**Figura 4.** Principales rutas de transformación de abietanos descritas en trabajos dedicados al deterioro de bienes culturales

La Tabla 1 recoge los cinco posibles estados de oxidación descritos para los componentes de la colofonia. El inicial comprende los derivados originales abietanos y pimaranos, y los niveles restantes corresponden a productos oxidados en grado ascendente, culminando en el estado 5, que corresponde al metabolito diterpénico más oxidado: el ácido 15-hidroxi-7-oxo-dehidroabiético (Pastorova *et al.* 1997; Van den Berg *et al.* 2000; Scalarone *et al.* 2002; Doménech-Carbó *et al.* 2006).

Estado de oxidación	1	2	3	4	5
	Pimarico	dDHA	15-OH-DHA	7-O-DHA	15-OH-7-O-DHA
	Sandaracopim.	DHA	7-OH-DHA		
	Isopimárico				
	AA				

**Tabla 1** Principales estados de oxidación de la serie de los abietanos. (AA=Ácido abiético; DHA=Ácido dehidroabiético; dDHA= Ácido dehidro-dehidroabiético; 7-OH-DHA=Ácido-7-hidroxi-dehidroabiético; 7-O-DHA=Ácido-7-oxo-dehidroabiético).

## 3.2 Material y métodos

### 3.2.1 Barnices

El barniz de colofonia se preparó a partir de resina de colofonia de pino marca Talens (distribuida por Productos de Conservación, Barcelona, España) disuelta en esencia de trementina rectificada (Titán) en la proporción de 100 g de barniz por 175 ml de esencia de trementina. La trementina veneciana empleada también ha sido de Talens, y se ha empleado diluida ligeramente (80% v/v) con esencia de trementina rectificada para aumentar su fluidez.

### 3.2.2 Microorganismos estudiados

Mediante amplia revisión de la bibliografía existente acerca del biodeterioro de bienes culturales (Ross 1963; Heim *et al.* 1968; Strzelczyk 1981; Giacobini *et al.* 1983; Bravery 1988; Agraval *et al.* 1989; Valentín 1990; Giacobini *et al.* 1988,1991; Inoue & Koyano 1991; Caneva *et al.* 1994; Montes Estellés 1994; Bolívar 1995; Petushkova & Lyalikova 1986; Seves *et al.* 1996; Valentín *et al.* 1996; Ciferri 1999; Arai 2000; Walsh 2001, entre otros) se han seleccionado para el estudio los siguientes microorganismos, todos ellos procedentes de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo-CECT:

#### Hongos

*Aspergillus niger* (An) (CECT-2088, ATCC 9029), *Aureobasidium pullulans* (Au) (CECT-2703, ATCC 9348), *Cladosporium cladosporioides* (Cc) (CECT 2110, ATCC 16022) *Penicillium chrysogenum* (Pc) (CECT-2306, ATCC 8537), *Rhizopus oryzae* (Ro) (CECT-2339, ATCC 11145), *Mucor rouxii* (Mr) (CECT-2655, ATCC 24905), y *Trichoderma pseudokoningii* (Tp) (CECT-2937)

#### Bacterias

*Streptomyces cellulofans* (Sc) (CECT-3242 ATCC 29806), *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) (CECT-493, ATCC 23842) y *Arthrobacter oxydans* (Ao) (CECT-386, ATCC 14358)

Se han incluido también en el estudio cuatro hongos procedentes de las obras pictóricas al óleo sobre lienzo del Museo de Bellas Artes de Granada “Alegoría de la muerte” (P. Toma) y “S. Francisco de Asís” (autor desconocido), ambas del siglo XVII y muy afectadas por procesos de biodeterioro. Los microorganismos han sido identificados como *Aspergillus versicolor*, *Phoma herbarum*, *Chrysonilia sitophila* y *Cladosporium* sp.

### *3.2.3 Preparación de las muestras*

#### *3.2.3.1 Soportes de cultivo*

Se han empleado portaobjetos de vidrio de tamaño estándar (24x80mm), barnizados a pincel con las resinas estudiadas en tres capas finas sucesivas. Estos soportes imitan las características de una superficie barnizada, pero eliminan las posibles interferencias que causan los materiales orgánicos que podemos encontrar en obras de arte reales. Los soportes así preparados se han dejado secar en oscuridad durante 90 días.

#### *3.2.3.2 Obtención de esporas fúngicas*

Los liofilizados de cepas de colección se rehidrataron en medio de cultivo líquido CM (extracto de levadura 5g, extracto de malta 5g, glucosa 10g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 4.5), y se incubaron durante 48h a temperatura de 28°C y humedad relativa del 75%. Transcurrido este tiempo, se inocularon en medio sólido agar malta, de Oxoid (extracto de malta 30g, peptona micológica 5g, agar 15g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 5.4). Cultivos con crecimiento sugestivo de esporulación se resuspendieron en 2 ml de Tween 80 (Aldrich) 0,1%. Tras dos ciclos de lavado/centrifugación, los pellets fueron resuspendidos en 2 ml de agua destilada y filtrados a través de lana de vidrio para eliminar cualquier resto de micelio. Se obtuvieron así suspensiones puras de esporas en agua destilada. Tras recuento en cámara de Neubauer, éstas se ajustaron a la concentración de 10<sup>6</sup> esporas/ml.

#### *3.2.3.3 Obtención de suspensiones bacterianas.*

Los liofilizados de cepas de colección se rehidrataron en medio de cultivo líquido TSB (digerido pancreático de caseína 17g, digerido papaínico de harina de soja 3g, NaCl 5g, fosfato potásico dibásico 2.5 g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 7.3), sembrándose a las 48 horas de incubación en medio de cultivo sólido TSA, de Oxoid (triptona 15g, peptona de soja 5g, NaCl 5g, agar 15g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 7.3), con la excepción de *Streptomyces cellulofans*, inoculado en agar patata, de Oxoid (extracto de patata 4g, dextrosa 20g, agar 15 g H<sub>2</sub>O 1l, pH 5.6). A partir de estos cultivos se prepararon inóculos en medio TSB, y se mantuvieron 24 horas en incubación. Después se centrifugaron y lavaron con agua destilada para eliminar cualquier posible resto de medio de cultivo y se resuspendieron en agua destilada. Mediante curva de crecimiento los inóculos se ajustaron a 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> células/ml.

## *Colofonia y trementina veneciana*

### *3.2.3.4 Inoculación de microorganismos en los soportes y cultivo*

Por cada hongo se inoculó un portaobjetos con dos gotas de 75 microlitros (con una superficie de alrededor de 1 cm<sup>2</sup> por gota), a concentración 10<sup>6</sup> esporas/ml. Por cada bacteria se inoculó un portaobjetos con dos gotas de 75 microlitros, ambas a la misma concentración, de las suspensiones descritas en el apartado anterior.

Las condiciones de cultivo, para hongos y bacterias, fueron 28°C de T<sup>a</sup> y humedad relativa del 75% durante 15 días en oscuridad.

## *3.2.4 Técnicas de análisis*

### *3.2.4.1 Control de crecimiento*

Se ha realizado un seguimiento microscópico a los cultivos fúngicos, con el fin de estudiar la producción de micelio a partir de la suspensión inicial de esporas en agua destilada. Todos los cultivos fúngicos fueron observados a tiempo cero, 24 horas, 48 horas, cinco, diez y quince días con un microscopio Nikon Eclipse TS100 equipado con cámara digital Nikon DS-5M.

### *3.2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)*

Tras el período de incubación, las muestras correspondientes a los patrones, hongos con crecimiento y bacterias se obtuvieron raspando la superficie del barniz con un bisturí estéril, obteniéndose una cantidad aproximada de 5 mg por muestra. Se incluyó también un control sin microorganismos (portaobjetos barnizado e inoculado sólo con agua destilada), incubado en idénticas condiciones que el resto de muestras y dos controles inoculados con esporas fúngicas (*A.niger*) y bacterias (*A. oxydans*) muertas en autoclave. La derivatización se realizó con el agente transesterificador Meth. Prep. II (Alltech), compuesto de hidróxido de m-trifluorometil-fenil-trimetilamonio, que permite obtener los ésteres metílicos de los ácidos carboxílicos existentes en la muestra, y posteriormente se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas con el fin de estudiar los cambios en la composición.

El análisis se llevó a cabo con un sistema integrado compuesto por un cromatógrafo de gases Carlo Erba serie 8000 modelo 8060 (Thermo Instruments, USA) acoplado con un espectrómetro de masas Platform II (Waters, USA).

Para la cromatografía gaseosa se empleó una columna capilar HP-1 MS (fase estacionaria metilpolisiloxano, 30 m x 0.25 mm I.D x 0.25 µm de espesor). Las condiciones cromatográficas han sido: temperatura inicial de 120°C, e incremento a

razón de 10°C/min hasta 300°C e isoterma durante 20 min. El gas portador fue Helio, con un flujo de 1.2 ml/min y una presión de 14 Psi. Las muestras se inyectaron en modo splitless.

Para el análisis mediante espectrometría de masas, se usó una fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV). El rango de escaneo ha sido de m/z 50 a 500, con ciclos de 1s. El software utilizado en la adquisición y procesado de las muestras fue MassLynx v.4.0. Los espectros de masas se han adquirido en el modo total ion monitoring mode (Full Scan) y se ha empleado el área de los distintos picos aparecidos en el TIC para obtener información cuantitativa. Las temperaturas de la interfase y de la fuente de iones han sido respectivamente de 300 °C y 210 °C. Para la identificación de compuestos se ha usado la librería de espectros de masas Wiley, así como bibliografía especializada.

### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Control de crecimiento

Los datos de crecimiento de los hongos en las resinas estudiadas han sido los siguientes (Tabla 2):

#### Colofonia

	18 HORAS	48 HORAS	5 DIAS
<i>A. niger</i>	-	-	-
<i>A. pullulans</i>	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-
<i>C. sitophila</i>	+	+	+
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-
<i>Cladosporium sp</i>	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	-
<i>P. herbarum</i>	-	-	-
<i>R. oryzae</i>	-	-	-
<i>M. rouxii</i>	-	-	-
<i>T. pseudokoningii</i>	-	-	-

**Trementina veneciana**

	18 HORAS	48 HORAS	5 DIAS
<i>A. niger</i>	-	-	-
<i>A. pullulans</i>	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-
<i>C. sitophila</i>	+	+	+
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-
<i>Cladosporium sp</i>	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	++	++	++
<i>P. herbarum</i>	-	-	-
<i>R. oryzae</i>	-	-	-
<i>M. rouxii</i>	-	-	-
<i>T. pseudokoningii</i>	-	-	-

**Tabla 2.** Crecimiento de los hongos estudiados en los barnices de colofonia y trementina veneciana (- no desarrollo; + desarrollo escaso; ++ desarrollo)

Las imágenes obtenidas (Figuras 13-15) demuestran a nivel microscópico la formación de estructuras fúngicas a partir del inóculo original de esporas por parte de *C. sitophila* en las dos resinas y *P. chrysogenum* en trementina veneciana. En ningún caso se observaron cambios significativos más allá de los cinco días de incubación.

Es también importante destacar la aparición en tan corto período de tiempo de daños macroscópicos a los barnices producidos por los cultivos, consistentes en pasmados (microfisuras), craquelados, y cambios de tonalidad.

### 3.3.2 Cromatografía de gases/espectrometría de masas

En el análisis por GC-MS la cantidad relativa de cada uno de los ácidos con respecto a los demás se ha expresado en área de pico normalizada  $N_i$ , definida como porcentaje de área correspondiente a cada componente en relación al área total:

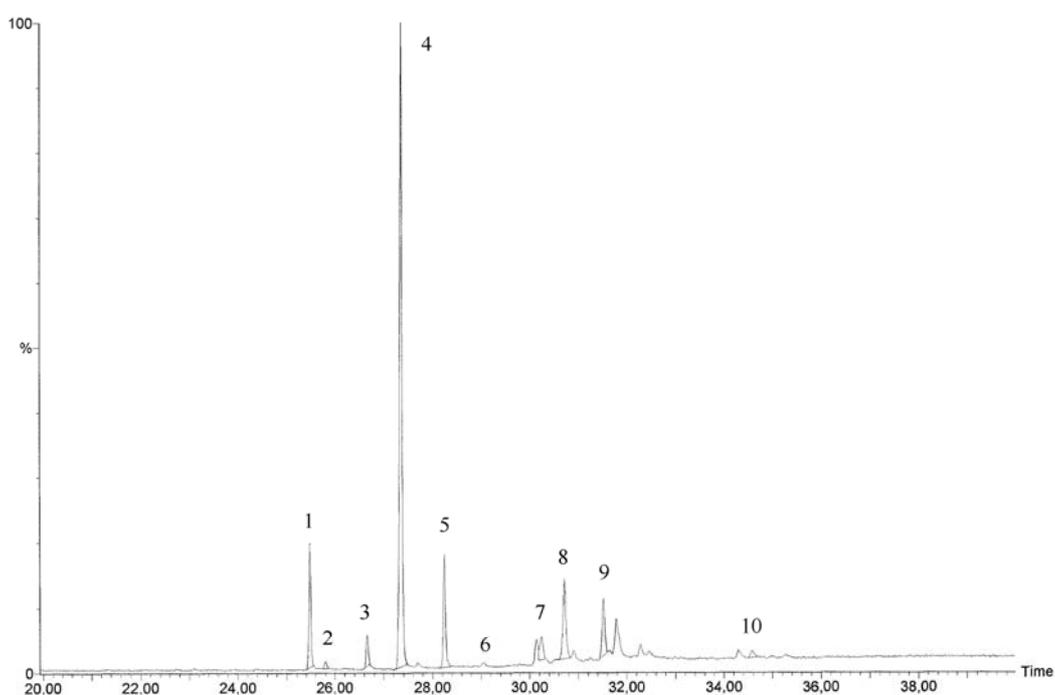
$$N_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100$$

Donde  $A_i$  es el pico de área de cada uno de los  $n$  compuestos encontrados en el cromatograma. Un control inoculado con una solución de agua destilada, incubado en idénticas condiciones, ha sido también analizado para obtener el patrón de composición de los barnices en ausencia de microorganismos. Para cuantificar los cambios en la composición se ha establecido el parámetro  $\Delta N_i$ , definido como el incremento o disminución de  $N_i$  para cada analito en relación a los valores correspondientes a la muestra patrón  $N_{i0}$ .

$$\Delta N_i = N_i - N_{i0}$$

3.3.2.1 *Colofonia*

En la resina de colofonia patrón (no inoculada) se han identificado los siguientes compuestos (figura 5 y tabla 3):



**Figura 5.** Cromatograma correspondiente al patrón de colofonia. (1) Ácido pimárico, metil éster; (2) Ácido sandaracopimárico, metil éster; (3) Ácido isopimárico, metil éster; (4) Ácido dehidroabiético (DHA), metil éster; (5) Ácido abiético (AA), metil éster; (6) Ácido dehidrodehidroabiético, metil éster; (7) Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético (7-OH-DHA), metil éster; (8) Ácido 15-hidroxi-dehidroabiético (15-OH-DHA), metil éster; (9) Ácido 7-oxo-dehidroabiético (7-oxo-DHA), metil éster; (10) Ácido 15-hidroxi-7-oxo-dehidroabiético (15-OH-7-oxo-DHA), metil éster y Ácido 15-dehidro-7-oxo-dehidroabiético, metil éster.

**Tabla 3.** Principales compuestos identificados mediante GC-MS en colofonia

Nº	$t_R$	Compuesto	Pm	ID
1	25,48	Ácido pimárico, metil éster	316	L
2	25,81	Ácido sandaracopimárico, metil éster	316	R
3	26,65	Ácido isopimárico, metil éster	316	R
4	27,35	Ácido dehidroabiético, metil éster	314	L
5	28,25	Ácido abiético, metil éster	316	L
6	29,10	Ácido dehidro-dehidroabiético, metil éster	312	R
7	30,24	Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético, metil éster	330	R
8	30,71	Ácido 15-hidroxi-dehidroabiético, metil éster	330	R
9	31,52	Ácido 7-oxo-dehidroabiético, metil éster	328	R
10	34,57	Ácido 15-hidroxi-7-oxo-dehidroabiético, metil éster	344	R

( $t_R$ : tiempo de retención; Pm = peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley y NIST Mass Spectra Library; R, Referencias)

#### *Identificación y patrones de fragmentación por espectrometría de masas*

La identificación de los compuestos se ha realizado según las base de datos de espectros de masas Wiley Mass Spectra Library y NIST (National Institute of Standards and Technology) (L) y los espectros de masas publicados en bibliografía (R) (Proefke & Rinehart 1992; Dethlefs *et al.* 1996; Pastorova *et al.* 2000; Van den Berg *et al.* 2000; Scalarone *et al.* 2002; Osete-Cortina *et al.* 2004; Osete-Cortina & Doménech-Carbó 2005).

Los espectros de masas de los diterpenos abietanos aparecen en el anexo 1. Se caracterizan por un patrón de fragmentación que principalmente incluye pérdida del grupo éster, pérdida del grupo metilo en C-20 y pérdida de agua a partir del hidroxilo, si aparece. Los principales fragmentos son los siguientes (Tabla 4 y Anexo 1):

Ion	AA	DHA	7-oxo-DHA
$M^{+}$	316	314	328
$[M-CH_3]^+$	301	299	313
$[M-COOCH_3]^+$		254	269
$[M-HCOOCH_3]^+$	256		268
$[M-CH_3-COOCH_3]^+$	241	239	253

Ion	15-OH-7-oxo-DHA*	OH-DHA**
M <sup>+</sup>	344	330
[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	329	315
[M-CH <sub>3</sub> -COOCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	269	255
[M-OH] <sup>+</sup>		312
[M-OH-CH <sub>3</sub> -COOCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>		237
<sup>+</sup> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	59	59

**Tabla 4.** Patrones de fragmentación de los principales diterpenos abietanos de la colofonia

\*A tR=34.57 en el patrón eluye una mezcla de 15-OH-7-O-DHA y su forma deshidratada en posición 15 (anexo 1), caracterizada por picos principales a 326 [M<sup>+</sup>] y 251 [M-CH<sub>3</sub>-COOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (Pastorova *et al.* 1997).

\*\* Los patrones de fragmentación de las formas hidroxiladas en 7 y 15 son iguales, habiéndose identificado las sustancias según su tiempo de retención (Van der Berg *et al.* 2000, Scalarone *et al.* 2002). La forma deshidratada en 6 del ácido dehidroabiético se ha identificado en función del tiempo de retención y de la no aparición del pico a m/z=330, que corresponde al ión molecular de los compuestos anteriormente citados (Anexo1).

Los resultados analíticos se muestran en las Figuras 6-8 y Tablas 5-6. La muestra patrón (no inoculada con microorganismos) presenta altas tasas de ácido dehidroabiético (58%), un porcentaje de ácido abiético del 9.76% y pequeñas cantidades de las formas oxidadas: 6.07 % de 7-oxo-DHA, 2.94 % de 7-OH-DHA, 9.46% de 15-OH-DHA y 0.95% de una mezcla de 7-oxo-15-OH-DHA y su forma deshidratada en posición 15 (tabla 5). Resultados similares se han hallado en el caso de las muestras inoculadas con esporas y bacterias inactivadas.

Estos valores cambian sustancialmente en las muestras tratadas con microorganismos. No se han registrado nuevos compuestos con respecto al patrón pero sí han variado las cantidades relativas de los componentes originales. La principal tendencia observada es un fuerte aumento de los diterpenos oxidados, especialmente del 7-oxo-DHA, aunque también del último pico, correspondiente a la coelución de la forma polioxidada 7-oxo-15-OH-DHA y su derivado resultante de la deshidratación del grupo hidroxilo. Este aumento se ve correspondido con una clara disminución de la cantidad relativa de los ácidos abiético y dehidroabiético, llegando el primero de ellos prácticamente a desaparecer en los cromatogramas correspondientes a las muestras inoculadas. Los diterpenos monohidroxilados (7-OH-DHA y 15-OH-DHA) han sufrido menos cambios, si bien su cantidad relativa sube ligeramente en los cultivos bacterianos (Tabla 5, Figuras 6-8).

*C. sitophila* ha sido el único hongo estudiado capaz de desarrollarse sobre barniz de colofonia. Los valores de DHA y AA correspondientes a esta muestra son de  $Ni(\%)=49.79$  e  $\Delta Ni=-8.21$ , habiéndose registrado aumentos de las formas oxidadas, especialmente del 7-oxo-DHA ( $Ni=17.87\%$ ,  $\Delta Ni=11.80$ ) y del pequeño pico correspondiente al 7-oxo-15-OH-DHA. Las formas hidroxiladas no han cambiado, lo que sugiere que este microorganismo oxida principalmente en posición 7 hasta formar una cetona.

Las bacterias han producido cambios aún mayores. *S. cellulofans* alcanza la tasa más baja de DHA de todas las muestras analizadas ( $Ni(\%)=20.09$ ,  $\Delta Ni=-37.91$ ), observándose valores similares para *B. amyloliquefaciens*. y *A. oxydans*. Se produce asimismo en estas muestras un fuerte aumento del 7-oxo-DHA, con valores de  $\Delta Ni$  en torno a 30, y del 7-oxo-15-OH-DHA, que en *Bacillus* llega a ser de  $\Delta Ni=+14.50$ , con resultados análogos en el resto de bacterias. Los derivados hidroxilados (7-OH-DHA y 15-OH-DHA) aumentan sólo ligeramente y de forma porcentualmente superior en la posición 7. Todo esto indica que las tres bacterias estudiadas son capaces de oxidar los abietanos originales en las posiciones 7 (preferente) hasta cetona y 15 (hasta alcohol).

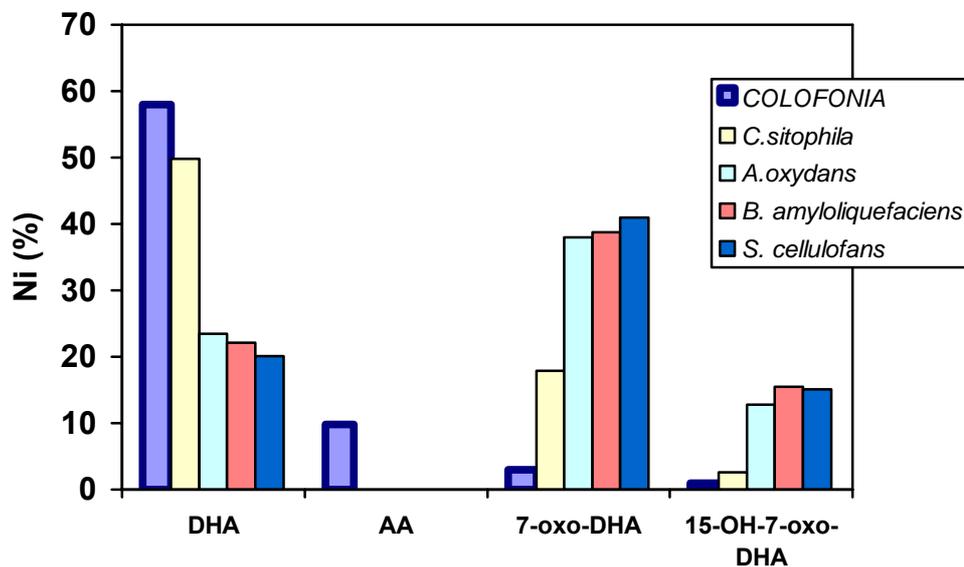
También se ha registrado en todos los casos la práctica desaparición del ácido abiético, presumiblemente por transformación en dehidroabiético y sus formas oxidadas. La oxidación de esta primera sustancia es un proceso que ocurre con cierta facilidad según lo descrito en trabajos precedentes (Van den Berg *et al.* 2000), pero que parece verse también favorecido en presencia de microorganismos dadas las diferencias halladas en los cromatogramas correspondientes a hongos y bacterias con respecto al patrón.

En cuanto a la fracción pimaránica, los cambios observados son poco importantes para los ácidos sandaracopimárico e isopimárico, mientras que el ácido pimárico muestra en los diversos microorganismos ligeros aumentos o disminuciones de dudosa significación (Tabla 6).

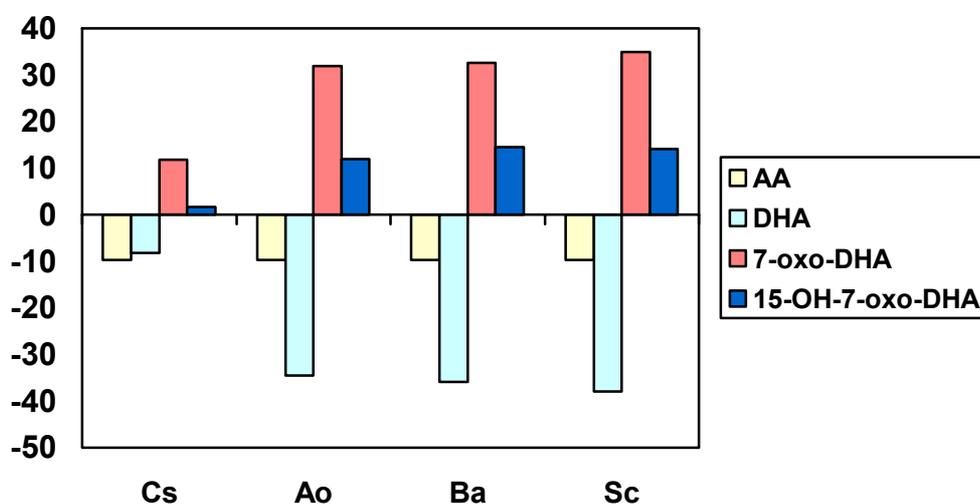
*Colofonia y trementina veneciana*

**Tabla 5.** Análisis por GC-MS de los diterpenos abietanos del barniz de colofonia en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $Ni$  e  $\Delta Ni$ , entre paréntesis).

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA	15-OH-7-oxo-DHA
<b>Colofonia</b>	<b>58.00</b>	<b>9.76</b>	<b>2.94</b>	<b>9.46</b>	<b>6.07</b>	<b>0.95</b>
<i>C.sitophila</i>	49.79 (-8.21)	0 (-9.76)	3.00 (-0.06)	7.30 (-2.16)	17.87 (+11.80)	2.57 (+1.62)
<i>A. oxydans</i>	23.45 (-34.55)	0 (-9.76)	6.36 (+3.42)	13.56 (+4.10)	37.98 (+31.91)	12.82 (+11.87)
<i>B.amyloliquefaciens</i>	22.16 (-35.84)	0 (-9.76)	5.58 (+2.64)	13.27 (+3.81)	38.71 (+32.64)	15.45 (+14.50)
<i>S. cellulofans</i>	20.09 (-37.91)	0 (-9.76)	5.78 (+2.84)	13.96 (+4.50)	41.00 (+34.93)	15.10 (+14.15)



**Figura 6.** Análisis por GC-MS (valores expresados en  $Ni\%$ ) del barniz de colofonia inoculado con microorganismos



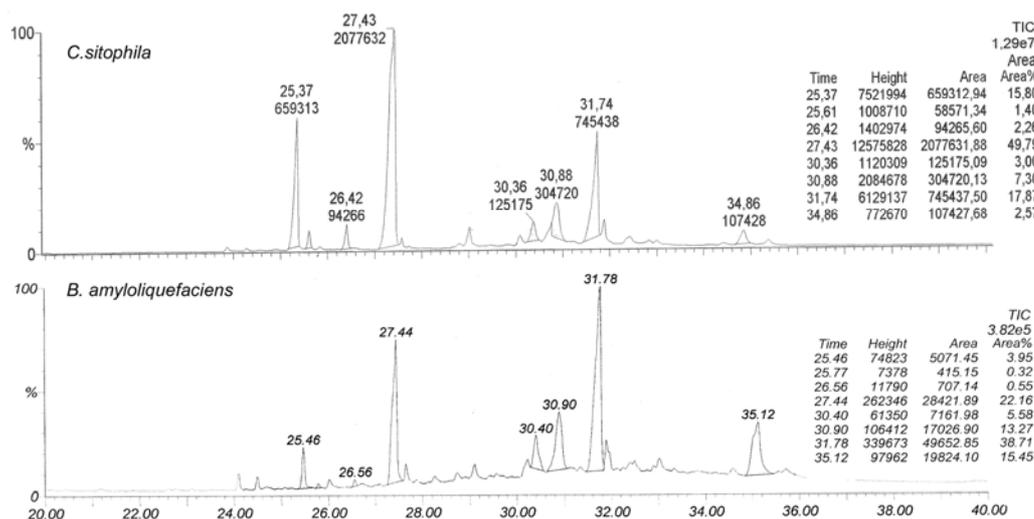
**Figura 7.** Análisis por GC-MS (valores expresados en  $\Delta Ni$ ) del barniz de colofonia inoculado con microorganismos (Cs=*C.sitophila*; Ao=*A.oxydans*; Ba=*B.amyloliquefaciens*; Sc=*S.cellulofans*)

**Tabla 6.** Análisis por GC-MS de los diterpenos pimaranos del barniz de colofonia en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $Ni$  e  $\Delta Ni$ , entre paréntesis).

	ac. Pimárico	ac. Sandaracopimárico	ac. Isopimárico
Colofonia	<b>9.46</b>	<b>0.74</b>	<b>2.63</b>
<i>C. sitophila</i>	15.80(+6.34)	1.40 (+0.66)	2.26 (-0.37)
<i>A. oxydans</i>	4.54 (-4.92)	0.50 (-0.24)	0,79 (-1.84)
<i>B.amyloliquefaciens</i>	3.90 (-5.56)	0.32 (-0.42)	0.55 (-2.08)
<i>S. cellulofans</i>	3.16 (-6.30)	0.28 (-0.46)	0.62 (-2.01)

El tipo de transformaciones encontradas se asemejan a las descritas en un estudio previo de alteración biológica en el barniz de colofonia (Doménech-Carbó *et al.* 2006) realizado en este caso con micelios (no esporas) de *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichoderma pseudokoningii*, y las mismas bacterias aquí ensayadas. Los análisis se realizaron mediante pirólisis-GC-MS y el principal cambio registrado, especialmente en las muestras inoculadas con bacterias, fue un aumento de las formas oxidadas en C7, si bien no tan claro como el descrito en el presente estudio. También se observó un aumento significativo del ácido  $\Delta 6$  dehidro-dehidroabiético, cosa que no ha ocurrido en este caso.

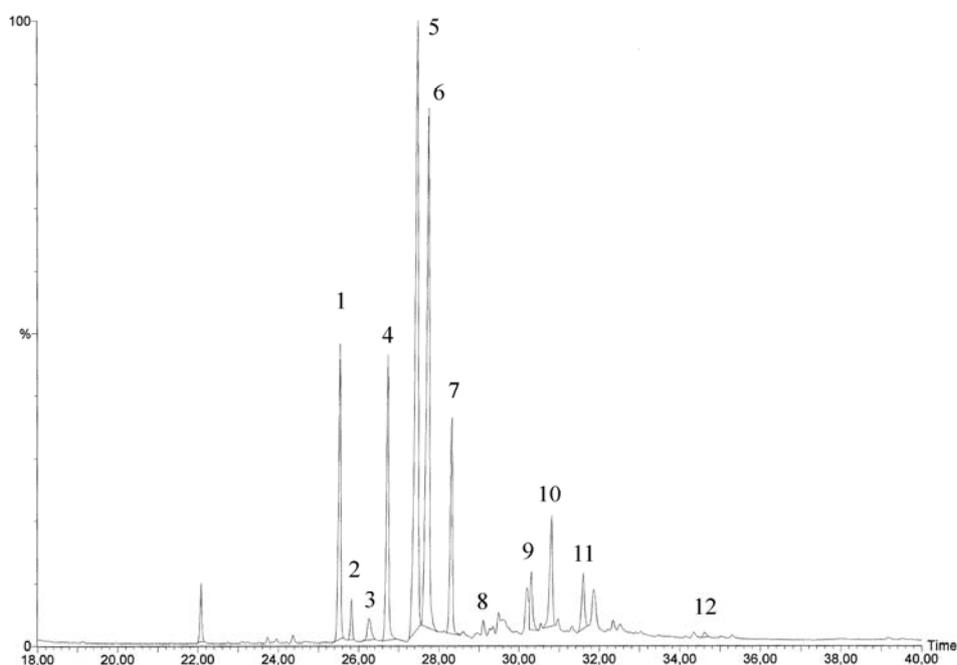
Igualmente, es importante destacar que los resultados coinciden con los obtenidos en trabajos dedicados al envejecimiento natural o artificial (por radiaciones) de materiales filmógenos diterpénicos (Pastorova *et al.* 1997; Van den Berg *et al.* 2000; Scalarone *et al.* 2002, entre otros), lo que sugiere que los microorganismos favorecen los procesos naturales de deterioro de los barnices. No se han encontrado en ningún caso formas tan fuertemente alteradas como las descritas en estudios dirigidos a la detoxificación de residuos de la industria papelera (Liss *et al.* 1997; Martin *et al.* 1999, entre otros), lo cual era de esperar ya que éstos se han realizado con microorganismos especialmente seleccionados para transformar abietanos y en medio líquido, en condiciones mucho más favorables que las elegidas en el presente estudio, que imitan en lo posible el proceso natural de biodeterioro de estas sustancias.



**Figura 8** Cromatogramas correspondientes a las muestras de barniz de colofonia inoculadas con *C. sitophila* y *B. amyloliquefaciens*

3.3.2.2 *Trementina veneciana*

En el barniz sin inocular se han identificado los siguientes analitos (Figura 9 y Tabla 7):



**Figura 9.** Cromatograma correspondiente al patrón de trementina veneciana. **(1)** Ácido pimárico, metil éster; **(2)** Ácido sandaracopimárico, metil éster; **(3)** Larixol; **(4)** Ácido isopimárico, metil éster; **(5)** Ácido dehidroabiético (DHA), metil éster; **(6)** Acetato de larixilo; **(7)** Ácido abiético (AA), metil éster; **(8)** Ácido dehidro-dehidroabiético, metil éster; **(9)** Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético (7-OH-DHA), metil éster; **(10)** Ácido 15-hidroxi-dehidroabiético (15-OH-DHA), metil éster; **(11)** Ácido 7-oxo-dehidroabiético (7-oxo-DHA), metil éster; **(12)** Ácido 15 hidroxi-7-oxo-dehidroabiético (15-OH-7-oxo-DHA), metil éster y Ácido 15-dehidro-7-oxo-dehidroabiético, metil éster

**Tabla 7.** Compuestos identificados mediante GC-MS en la trementina veneciana

Nº	$t_R$	Compuesto	Pm	ID
1	25,54	Ácido pimárico, metil éster	316	L
2	25,83	Ácido sandaracopimárico, metil éster	316	R
3	26,25	Larixol	306	R
4	26,73	Ácido isopimárico, metil éster	316	R
5	27,48	Ácido dehidroabiético, metil éster	314	R
6	27,76	Acetato de larixilo	348	R
7	28,32	Ácido abiético, metil éster	316	L
8	29,11	Ácido dehidro-dehidroabiético, metil éster	312	R
9	30,31	Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético, metil éster	330	R
10	30,80	Ácido 15-hidroxi-dehidroabiético, metil éster	330	R
11	31,59	Ácido 7-oxo-dehidroabiético, metil éster	328	R
12	34,60	Ácido 15-hidroxi-7-oxo dehidroabiético, metil éster	344	R

( $t_R$ : tiempo de retención; Pm = peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley Mass Spectra Library; R, Referencias)

#### *Identificación y patrones de fragmentación por espectrometría de masas*

Los componentes diterpénicos abietanos y pimaranos se han identificado siguiendo las mismas pautas comentados en el caso de la colofonia, y los labdanos larixol y acetato de larixilo en función de los datos publicados por Van den Berg *et al.* (2000), Scalarone *et al.* (2002) y Osete-Cortina *et al.* (2004), correspondiendo los iones más importantes de estos dos compuestos a la pérdida de agua por deshidratación de los alcoholes, y a la escisión de los grupos acetato y metilo (Tabla 8). Dada la similitud de los espectros de masas de ambas sustancias, la asignación de los picos en el cromatograma se ha realizado en función de los tiempos de retención descritos en la literatura. Posiblemente el larixol, que tiene dos grupos hidroxilo y por tanto es muy polar, eluye antes que su acetato por tratarse del producto de deshidratación monohidroxilado en 6 o en 13, existente en la muestra en esa forma.

**Tabla 8.** Patrones de fragmentación de los principales diterpenos labdanos de la trementina veneciana

Ion	Acetato larixilo	Larixol
M <sup>+</sup>	348*	306*
[M-AcOH] <sup>+</sup>	288	
[M-AcOH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	270	
[M-AcOH-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	255	
[M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		288
[M-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		270
[M-2H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>		255

\* no observable (intensidad < 0.5%)

En la trementina veneciana los resultados analíticos marcan una tendencia similar a la ya comentada para la colofonia, si bien de una forma bastante menos acentuada (Figuras 10-12 y Tablas 9,10). El patrón presenta tasas de ácido abiético y dehidroabiético de 8.18 y 31.25 (Ni%), respectivamente, un porcentaje de larixol del 25.51%, aproximadamente un diez por ciento de ácido pimárico e isopimárico y cantidades menores de los derivados oxidados. Los controles inoculados con esporas y bacterias inactivadas han mostrado una composición muy similar a la del patrón sin inocular.

En las muestras en las que se ha detectado crecimiento fúngico (*C. sitophila* y *P. chrysogenum*) y en las inoculadas con las bacterias *A. oxydans* y *B. amyloliquefaciens*, el pico correspondiente al ácido abiético desaparece y se produce un aumento del dehidroabiético, que aproximadamente coincide con el descenso del analito antes mencionado, lo que cabe relacionar con una conversión del abiético en dehidroabiético causada por el metabolismo oxidativo de los microorganismos estudiados.

En ninguna de las muestras inoculadas se aprecia un aumento de las formas oxidadas con respecto al patrón tan significativo como el observado para la colofonia. Tan sólo puede ser apreciable un ligero pero generalizado incremento de la cantidad relativa de 7-oxo-DHA, que llega a ser en *C. sitophila* de Ni%=5.73, con ΔNi=3.28. Este último microorganismo presenta además unas tasas superiores al resto para el

*Colofonia y trementina veneciana*

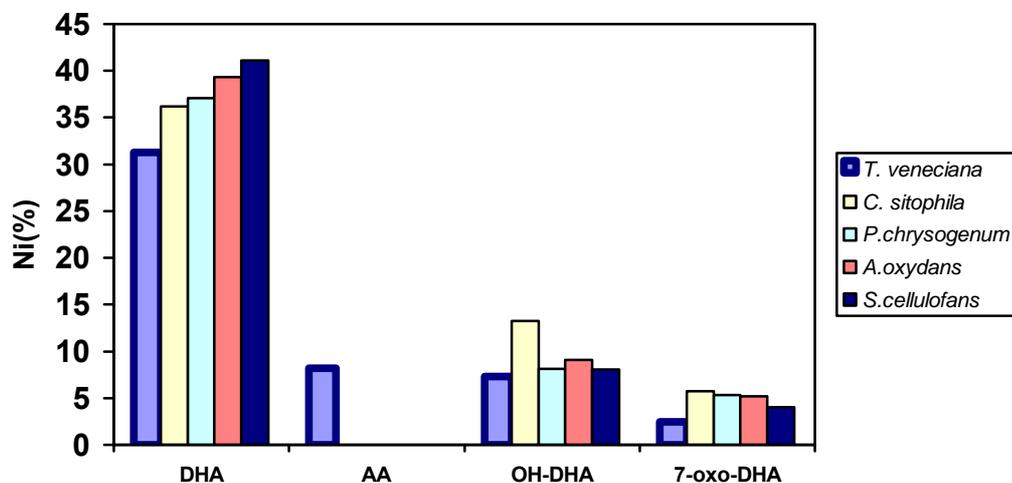
15-OH-DHA ( $Ni=9.60$ ,  $\Delta Ni=4.62$ ). No se han producido sustancias altamente oxidadas, del tipo ácido 15-OH-7-oxo-DHA, ya que el pico correspondiente a estos analitos no llega a pasar del carácter de traza en ninguno de las muestras analizadas.

Por tanto, el principal cambio observado es la conversión del ácido abiético en dehidroabiético, acompañada de una moderada tendencia a producir derivados oxidados en posición 7, y en el caso del hongo *C. sitophila* también en posición 15. *B. amyloliquefaciens* no ha mostrado cambios significativos con respecto al patrón sin inocular, lo que puede interpretarse como una ausencia de actividad biológica de este microorganismo sobre la trementina veneciana.

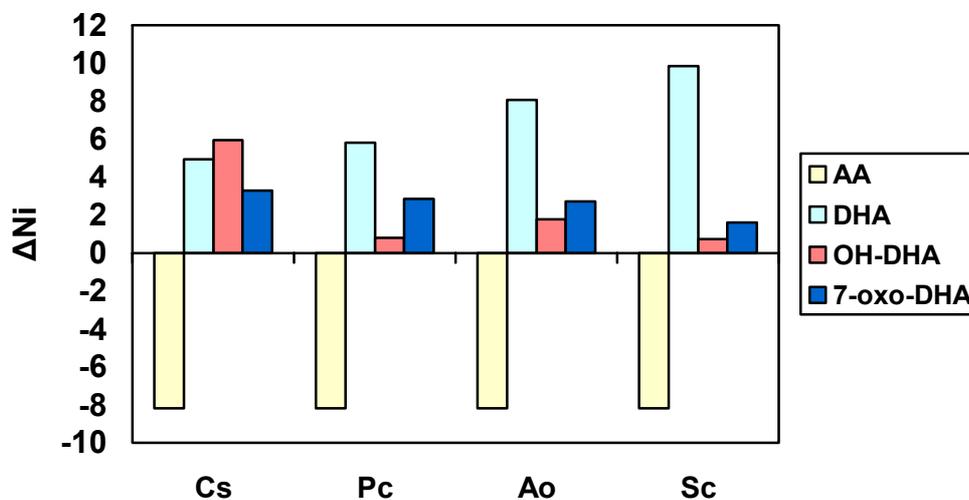
En cuanto a la fracción pimaránica, las variaciones son poco importantes respecto al patrón sin inocular, lo que está en consonancia con la inalterabilidad de estos compuestos mencionada en literatura.

**Tabla 9.** Análisis por GC-MS de los diterpenos abietanos de la trementina veneciana en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $Ni$  e  $\Delta Ni$ , entre paréntesis).

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA	15-OH-7-oxo-DHA
<b>T. veneciana</b>	<b>31.25</b>	<b>8.18</b>	<b>2.36</b>	<b>4.98</b>	<b>2.45</b>	<b>0.23</b>
<i>C. sitophila</i>	36.20 (+4.95)	0 (- 8.18)	3.67 (+1.31)	9.60 (+4.62)	5.73 (+3.28)	0.77 (+0.55)
<i>P. chrysogenum</i>	37.07 (+5.82)	0 (- 8.18)	2.17 (-0.19)	5.96 (+0.98)	5.31 (+2.86)	0.69 (+0.46)
<i>A. oxydans</i>	39.32 (+8.07)	0 (- 8.18)	2.20 (-0.16)	6.91 (+1.93)	5.16 (+2.71)	0.47 (+0.44)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	29.04 (2.21)	7.32 (-0.86)	1.63 (-0.73)	3.65 (-1.33)	2.41 (-0.04)	0.71 (+0.48)
<i>S. cellulofans</i>	41.09 (+9.84)	0 (- 8.18)	2.16 (-0.20)	5.90 (+0.92)	4.06 (+1.61)	0.36 (+0.13)



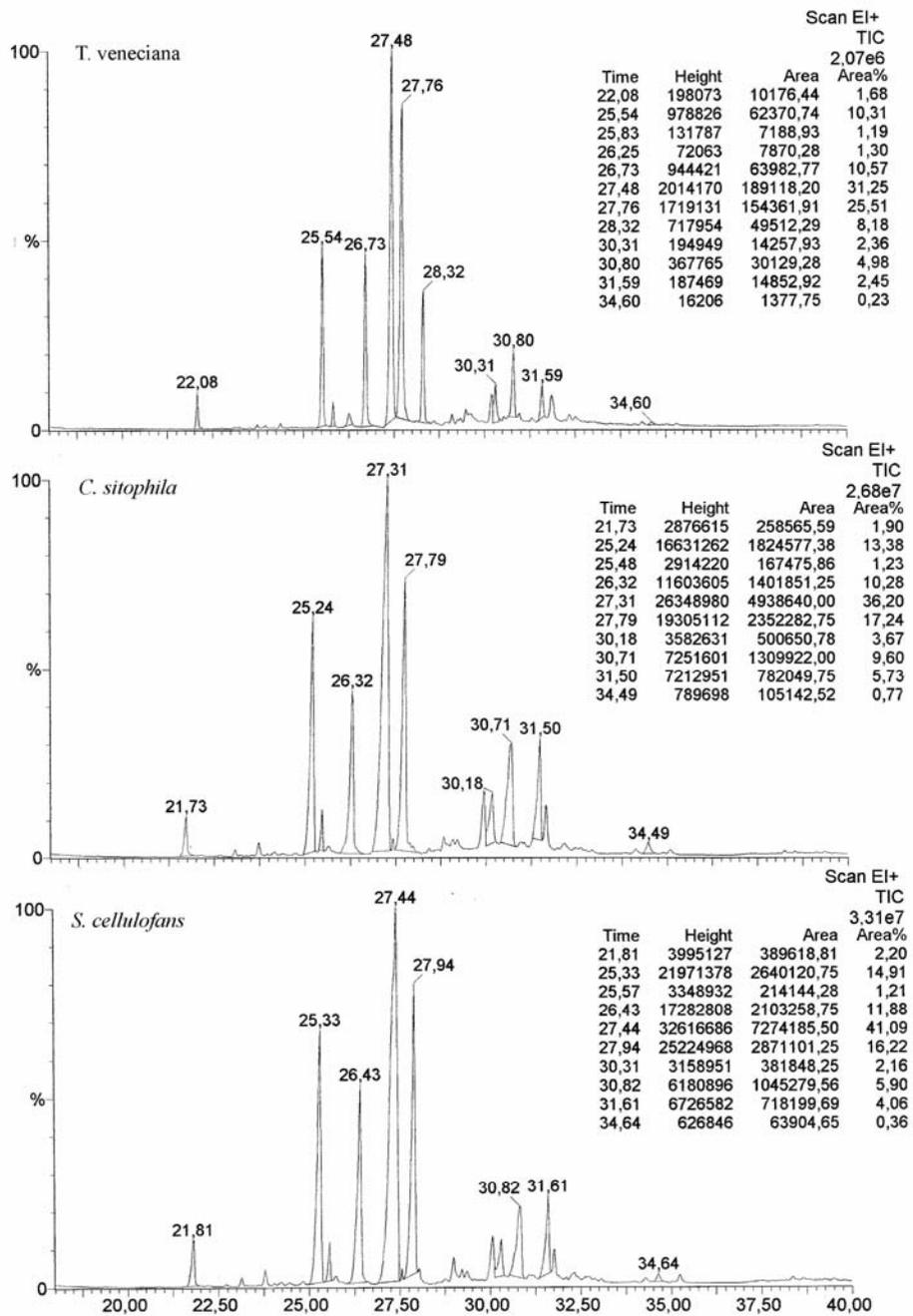
**Figura 10.** Análisis por GC-MS (valores expresados en Ni%) de la trementina veneciana inoculada con microorganismos (DHA=Ácido dehidroabiético; AA=Ácido abiético; OH-DHA=Σ Ácido 7-OH-dehidroabiético y 15-OH-dehidroabiético; 7-oxo-DHA=Ácido 7-oxo-dehidroabiético).



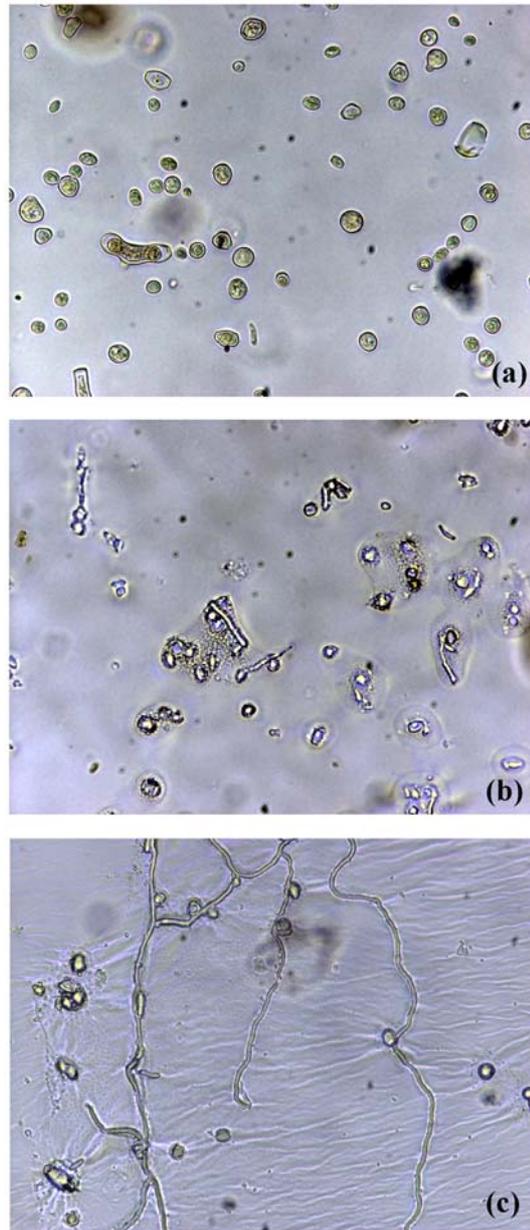
**Figura 11.** Análisis por GC-MS (valores expresados en ΔNi) del barniz de colofonia inoculado con microorganismos (*Cs*= *C. sitophila*; *Pc*=*P. chrysogenum*; *Ao*= *A. oxydans*; *Sc*=*S. cellulofans*; DHA=Ácido dehidroabiético; AA=Ácido abiético; OH-DHA=Σ Ácido 7-OH-dehidroabiético y 15-OH-dehidroabiético; 7-oxo-DHA=Ácido 7-oxo-dehidroabiético).

**Tabla 10.** Análisis por GC-MS de los diterpenos pimaranos y labdanos de la trementina veneciana en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis).

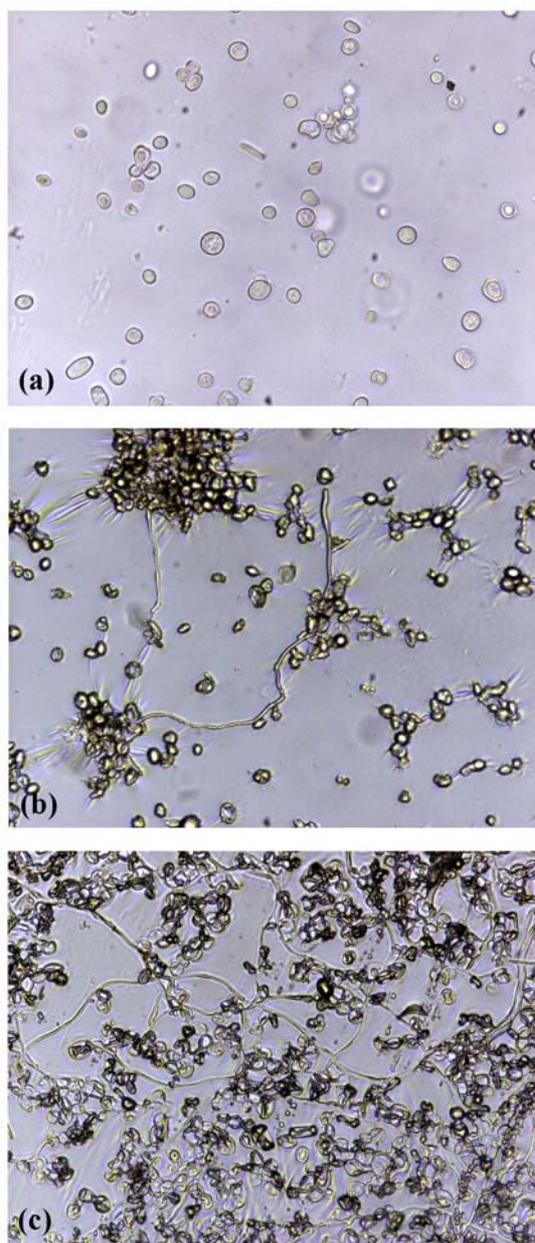
	Pimárico	Sandaracopimárico	Isopimárico	Ac Larixilo
<b>T. veneciana</b>	<b>10.31</b>	<b>1.19</b>	<b>10.57</b>	<b>25.51</b>
<i>C. sitophila</i>	13.38 (+3.07)	1.23 (+0.04)	10.28 (-0.29)	17.24 (-8.27)
<i>P. chrysogenum</i>	12.45 (+2.14)	1.02 (-0.17)	10.42 (-0.15)	22.22 (-3.29)
<i>A. oxydans</i>	14.47 (+4.16)	1.16 (-0.03)	10.91 (+0.34)	17.36 (-8.15)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	11.96 (+1.65)	1.44 (+0.25)	11.79 (+1.22)	24.78 (-0.73)
<i>S. cellulofans</i>	14.91 (+4.60)	1.21 (+0.02)	11.88 (+1.31)	16.22 (-9.29)



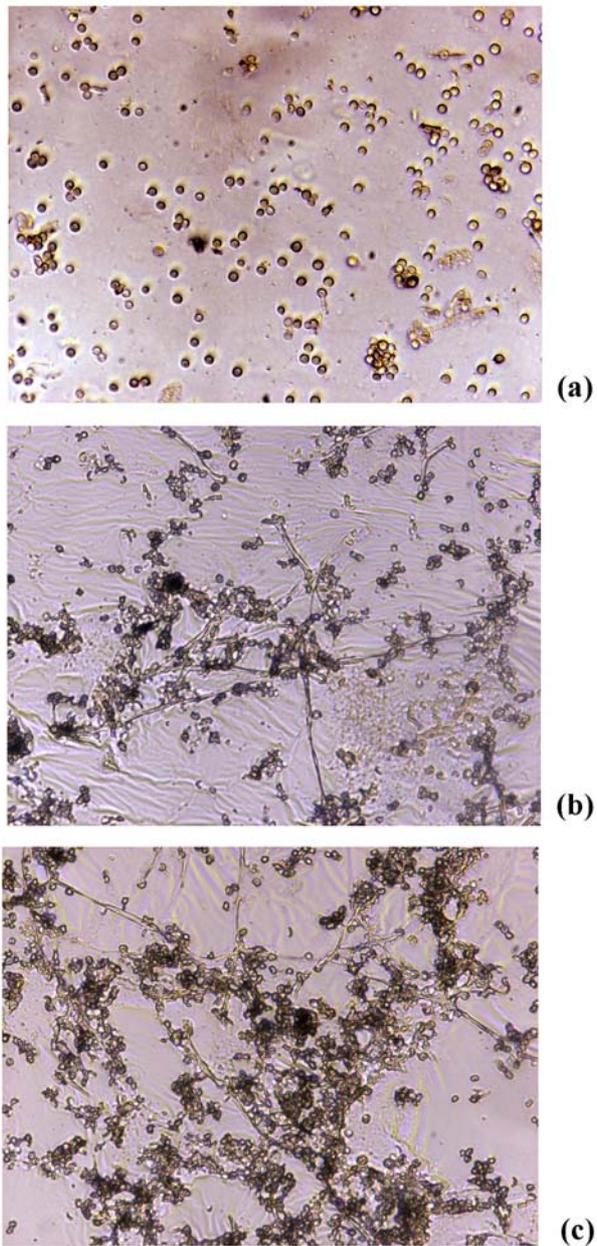
**Figura 12.** Cromatogramas correspondientes al patron de trementina veneciana y a las muestras inoculadas con *C. sitophila* y *S. cellulofans*



**Figura 13:** (a) *Chrysonilia sitophila* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de colofonia.



**Figura 14:** (a) *Chrysonilia. sitophila* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en trementina veneciana.



**Figura 15:** (a) *Penicillium chrysogenum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en trementina veneciana.

## Referencias

- Agraval OP, Dhawan S, Garg KL (1989). Microbial deterioration of paintings: A review. Intach Conservation Centre, Lucknow, India, pp 1-51.
- Arai H (2000). Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. *International biodeterioration & biodegradation*, 46: 181-188.
- Arteni SC, Sánchez Posada M (1984). From handcraft to mass production: notes on the manufacture of oil painting materials, in: Proceedings of the 7th Triennial Meeting of the ICOM Committee for Conservation, Copenhagen.
- Bicho PA, Martin V, Saddler JN (1995). Growth, induction and substrate specificity of dehydroabietic acid-degrading bacteria isolated from a kraft mill effluent enrichment. *Applied and environmental microbiology*, 61 (9): 3245-3250.
- Biellmann JF, Branlant G, Gero- Robert M, Poiret M (1973). Degradation bacterienne de l'acide dehydroabietique par *Flavobacterium resinovorum*. *Tetrahedron*, 29: 1227-1236.
- Biellmann JF, Branlant G, Gero- Robert M, Poiret M (1973). Degradation bacterienne de l'acide dehydroabietique par un *Pseudomonas* et una *Alcaligenes*. *Tetrahedron*, 29: pp 1237-1241.
- Bolívar Galiano FC (1995). Los Agentes de Biodeterioro del Patrimonio Pictórico, Textil y Gráfico. PH. *Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 12: pp 50-51.
- Bravery AF (1998). Biodeterioration of paint. A state of the art comment. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 466- 485.
- Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (1994). *La biología nel restauro*. Nardini editore, Firenze, pp 92-95.
- Ciferri O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and environmental microbiology*, 65 (3): 879-885.
- Dethlefs F, Gerbardtz KO, Stan HJ (1996). Gas Chromatography/Mass Spectrometry of 13 Resin Acids as their PFB Esters. *Journal of Mass Spectrometry*, 31: 1163-1168
- Doerner M (1998). *Los materiales de pintura y su empleo en el arte*. 1ª ed. Reverté, Barcelona, pp. 94-100.
- Doménech-Carbó MT, Osete-Cortina L, de la Cruz Cañizares J, Bolívar-Galiano F, Romero-Noguera J, Fernández-Vivas MA, Martín-Sánchez I (2006). Study of the

## *Colofonia y trementina veneciana*

microbiodegradation of terpenoid resin-based varnishes from easel painting using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chemistry*, 385 (7): 1265 – 1280.

Giacobini, C, De Cicco MA, Tiglie I, Accardo G (1988). Actinomycetes and Biodeterioration in the Field of Fine Art. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 418-423.

Giacobini C, Pedica M, Spinucci M (1991). Problems and Future Projects on the Study of Biodeterioration: Mural and Canvas Paintings. In. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on the Biodeterioration of Cultural Property*. Mc Millan India Ltd, New Delhi. Cap 31, pp 275-286.

Heim R, Francoise F, Nicot J (1968). "Combatting Moulds Which Develop on Cultural Properties in Tropical Climates." Conservation of Cultural Properties with Special Reference to Tropical Climates. Lausanne, Switzerland: UNESCO, pp 45-48.

Inoue M, Koyano M. (1991) Fungal Contamination of Oil Paintings in Japan. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 28: 23-35.

Kutney JP, Choi LSL, Hewitt GM, Salisbury PJ, Singh M (1985). Biotransformation of dehydroabietic acid with resting cell suspensions and Calcium alginate immobilized cells of *Mortierella isabellina*. *Applied an enviromental microbiology*, 49 (1): 96-100.

Kutney JP, Berset JD, Hewitt GM, Singh M (1988). Biotransformation of dehydroabietic, abietic and isopimaric by *Mortierella isabellina* immobilized in polyurethane foam. *Applied an Enviromental Microbiology*, 54 (4): 1015-1022.

Liss SN, Bicho PA, Saddler JN (1997). Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can J Microbiol*, 75: 599–611.

Martin WJJ, Mohn WW (1999). A novel aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase from the diterpenoid-degrading bacterium *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *Wat. Sci. Tech.*, 40 (11-12): 273-280.

Martin VJJ, Yu Z, Mohn WW (1999). Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. *Arch. Microbiol*, 172: 131-138.

Masschelein-Kleiner L (1992). *Liants, vernis et adhésifs anciens*. Institut Royal du Patrimoine Artistique, Bruxelles, pp 86-100.

Mayer R (1985). *The artist's handbook of materials and techniques*. 1<sup>a</sup> ed. Blume, Madrid, pp 156-185.

Mills JS, White R (1994). *The Organic Chemistry of Museum Objects*. Butterworths, London, pp 99-108.

Montes Estellés RM (1994). Estudio de la contaminación fisicoquímica y microbiológica, en el conjunto patrimonial de la basílica de la Virgen de los Desamparados de Valencia. *Comunicaciones técnicas, libro segundo. II Congreso Nacional de Medio Ambiente*. Madrid, 21-25 noviembre 1994, pp 23-37.

Osete-Cortina L, Doménech-Carbó MT, Mateo-Castro R, Gimeno-Adelantado JV, Bosch-Reig F (2004). Identification of diterpenes in canvas painting varnishes by gas chromatography–mass spectrometry with combined derivatisation. *Journal of Chromatography A*, 1024: 265-278.

Osete-Cortina L, Doménech-Carbó MT (2005). Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *Journal of Chromatography A*, 1065 (2): 265-278

Palomino A (1947). *El museo pictórico y escala óptica*. Aguilar, Madrid, p 745.

Pastorova I, van der Berg KJ, Boon JJ, Verhoeven JW (1997). Análisis of oxidised diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMHA. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 43: 41-57.

Petushkova JP, Lyalikova NN (1986). Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Studies in Conservation*, 31: 65-69.

Proefke ML, Rinehart KL (1992). Analysis of an egyptian mummy resin by mass spectrometry *Journal of American Society Mass of Spectrometry*, 3: 582-589

Ross RT (1963). Microbiology of paint films. *Adv. Appl. Microb.*, 5: 217- 234.

Scalarone D, Lazzari M, Chiantore O (2002). Ageing behaviour and pyrolytic characterisation of diterpenic resins used as art materials: colophony and Venice turpentine. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 64: 345–361.

Seves A, Sora S, Ciferri O. (1996). The microbial colonization of oil paintings. A laboratory investigation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37 (3-4): 215-224.

Seves A, Romano H, Scilione G, Maifreni T, Sora S. (2000). A laboratory investigation of the microbial degradation of cultural heritage (ICMC). In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G (Eds.), *Of microbes and art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, pp 121-133.

Strzelczyk AB (1981). Paintings and Sculptures. In: Rose AH (Ed.), *Microbial deterioration*. Academic Press, London, pp 203-234.

## *Colofonia y trementina veneciana*

Valentín N (1990). Contaminación biológica en materiales arqueológicos y su erradicación por medio de tratamientos no tóxicos. *Cuadernos del Instituto de Conservación de Bienes Culturales*, Madrid, pp 113-120.

Valentín N, Vaillant M, Guerrero H. (1996). Control integrado de plagas en bienes culturales de países de clima mediterráneo y tropical. XI Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales. Castellón, 3-6 octubre. Ed. Diputación de Castellón, pp 205-215.

Van den Berg KJ, Boon JJ, Pastorova I, Spetter LFM (2000). Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in old Masters paintings. *Journal of Mass Spectrometry*, 35: 512-533.

Walsh JH (2001). Ecological considerations of biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48: 16-25.

Wilson AEJ, Edward R, Moore B y Mohn WW (1996). Isolation and characterization of isopimaric acid-degrading bacteria from a sequencing batch reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9): 3146–3151.

---

## 4 Resinas diterpénicas labdánicas: sandáracas y copal de Manila

### 4.1 Introducción

#### 4.1.1 Sandáracas

La resina de sandáracas se obtiene de pinófitas de la familia de las Cupresáceas, principalmente de la sabina mora o alerce africano, un arbusto endémico de las regiones montañosas de Argelia, Túnez y Marruecos que recibe los nombres científicos de *Tetraclinis articulata* y *Callitris quadrivalis*. Del ciprés australiano (*Callitris* sp.) se obtiene la llamada sandáracas australiana y productos similares, si bien muy poco utilizados, pueden extraerse de *Juniperus* sp. y *Cupressus* sp. (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994). El término ha sido también empleado en la Edad Media para denominar a los pigmentos oropimente y masicote (Doerner 1998).

Ha sido ampliamente utilizada a lo largo de la historia con propósitos artísticos pese a contar con ciertos defectos como su tendencia al amarilleo, gran dureza y carácter quebradizo. Descrita ya por Dioscórides en el siglo I, algunos investigadores sospechan que es el ámbar mencionado en muchas recetas medievales (Mayer 1985). Su uso como barniz de protección formando parte de recetas al aceite preparadas en caliente aparece documentado en el manuscrito de Estrasburgo, del siglo XV, así como en estudios analíticos de importantes obras como el retablo de San Pedro el Mayor, del siglo XII, expuesto en la National Gallery de Londres (Masschelein-

## *Sandáracas y copal de Manila*

Kleiner 1992). Estas mezclas fueron conocidas en Italia con el nombre de vernice líquida, y frecuentemente incluían también productos como la trementina veneciana para aumentar su flexibilidad (Mayer 1985; Cennini 1988). Durante el siglo XVIII se popularizó la preparación de barnices al alcohol, la forma más natural de uso dada la buena solubilidad de la sandáracas en este disolvente (Mayer 1985; Doerner 1998).

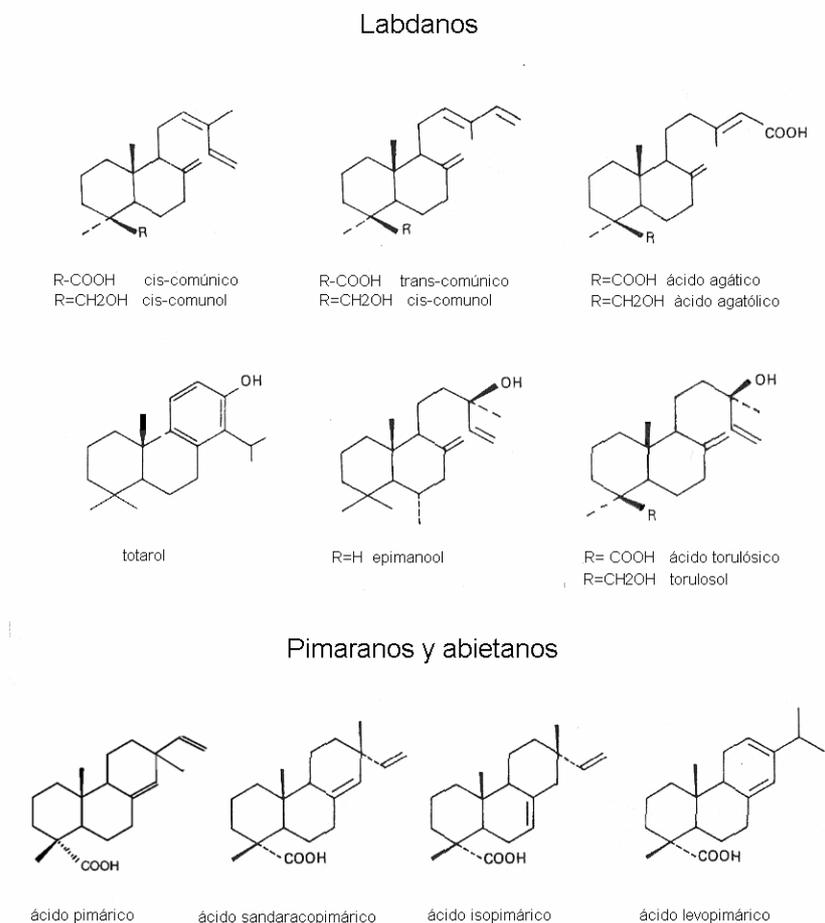
En la actualidad su empleo se ha restringido a técnicas concretas como el dorado (Doerner 1998) o como aditivo en mezclas para modular la rigidez de las películas, habiendo perdido importancia en favor de otros productos naturales o sintéticos. Los barnices duros, con fracción polimérica, tales como la sandáracas y los copales, presentan a los restauradores el problema de su amarilleo y la dificultad de eliminarlos en operaciones de limpieza, especialmente si han sido preparados en mezclas con aceites secantes (Scalarone *et al.* 2003).

### *Química*

Se presenta como una resina dura, en forma de fragmentos redondeados o cilíndricos de color amarillento a menudo cubiertos de un polvo blanquecino; es fácilmente soluble en acetona y alcohol y sólo parcialmente en esencia de trementina.

Las diversas resinas obtenidas de cupresáceas presentan bastantes peculiaridades en cuanto a su composición (Figura 1). El principal componente original-hasta un 70%-es el ácido comúnic, diterpeno bicíclico derivado del labdano que polimeriza espontáneamente, dando lugar al ácido policomúnic, que confiere a la sandáracas su carácter polar y la distingue netamente de otros productos como la colofonia.

Los diterpenos tricíclicos libres son principalmente de tipo pimarano, lo que marca otra importante diferencia con las resinas de Pináceas, ricas en abietanos. Los más abundantes son el ácido pimárico y especialmente el sandaracopimárico, que recibe este nombre por ser muy característico de este material y puede considerarse un marcador analítico de la presencia de sandáracas en una obra de arte. La cantidad de abietanos es poco significativa, pudiendo aparecer pequeñas cantidades de ácido levopimárico. Se ha descrito también la presencia minoritaria de productos fenólicos como el manool o el totarol (Mills & White 1987; Masschelein-Kleiner 1992; Scalarone *et al.* 2003, Osete-Cortina & Doménech-Carbó 2004).



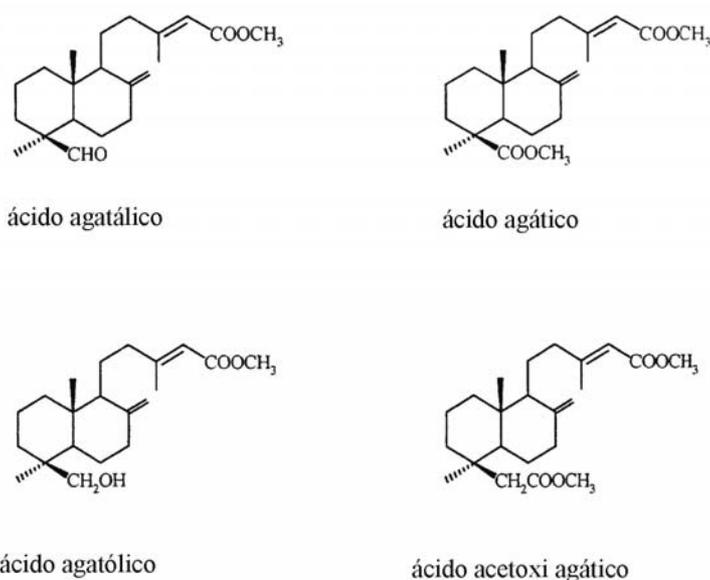
**Figura 1** Principales componentes de la sandárac y copal de Manila

### 4.1.2 Copal de Manila

El copal de Manila o copal soluble en alcohol es una resina diterpénica que procede de plantas de la familia de las Araucáceas. Los principales productores son árboles de gran porte del género *Agathis*, especialmente la especie *Agathis dammara*, también llamada *Agathis alba*, que es propia de Malasia y Polinesia. Se puede obtener por incisión de árboles vivos o del suelo en estado semifósil (Mills & White 1994).

## *Sandárac y copal de Manila*

El término copal puede inducir a confusión, ya que ha sido empleado para denominar a ciertos barnices muy duros compuestos de resinas fósiles insolubles en todos los disolventes comunes, y que deben ser preparados por mezcla en caliente con aceites secantes. Las mejores calidades son muy difíciles de encontrar, por lo que los barnices comercializados como copales presentan bastantes deficiencias técnicas a causa de su excesiva dureza y tendencia al oscurecimiento y agrietamiento. Por tanto, no debe confundirse el copal soluble en alcohol con otras resinas llamadas copales, ya que el término engloba a una gran variedad de productos, de procedencias y composición bastante dispar, y generalmente de baja calidad para todos los usos. El copal de Manila se emplea principalmente en las variedades más económicas de la goma-laca, esmaltes industriales y fijativos para dibujo artístico (Mayer 1985).



**Figura 2.** Acido agático y sus principales derivados

### *Química*

La resina está compuesta principalmente, al igual que la sandárac, de ácido comúnic polimerizado, lo que confiere a este material solubilidad en alcohol, determinando su dureza el mayor o menor grado de polimerización. Los componentes diterpénicos bicíclicos libres son principalmente de tipo labdano,

destacando el ácido agático (ácido labda-8(17),13(E)-dien-15,19-dioico) y diversos derivados del mismo, como el aldehído agático y el ácido agatólico (Figura 2). Más raramente, pueden encontrarse pequeñas cantidades de labdanos hidroxilados como el ácido torulósico. Resulta también importante la presencia de pimaranos como el ácido sandaracopimárico e isopimárico (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994).

#### *4.1.3 Procesos de deterioro*

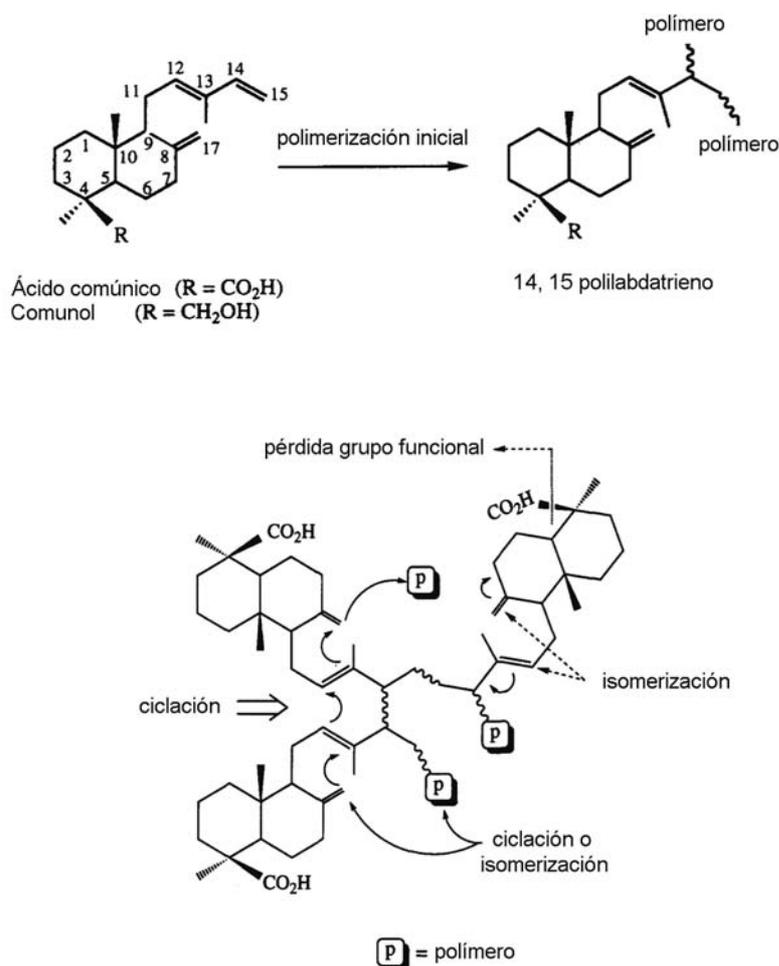
Pese a la importancia histórica de estos materiales, existen muy pocos estudios relacionados con su caracterización y degradación, y ninguno conocido por nosotros que aborde el estudio de su transformación por microorganismos en bienes culturales.

Comenzando por los componentes diterpénicos libres, los pimaranos son considerados materiales de una alta estabilidad frente al ataque de microorganismos (Liss *et al.* 1997; Martin *et al.* 1999), si bien se ha descrito (Wilson *et al.* 1996) un caso de degradación del ácido isopimárico por una *Pseudomonas* sp. En los diterpenos de tipo labdano se ha estudiado (Lin *et al.* 1998) un proceso de biooxidación para el ácido isocuprésico (ácido 15-hidroxilabda-8(17),13E-dien-19-oico), transformado por la microflora digestiva de ciertos rumiantes en ácido agático.

Scalarone *et al.* (2003) han publicado el único estudio que aborda el envejecimiento (no biótico) de estas resinas como materiales artísticos, realizado para el copal de Manila y una resina de sandáracas que más bien parece un copal, por presentar en su composición altas cantidades de ácido agático y sus derivados. Los cambios observados en los diterpenos libres en análisis realizado por GC/MS después de 600 horas de irradiación con lámpara de ultravioleta fueron escasos en los pimaranos, dimetil agatato y metil acetoxi agatolato. Sin embargo, se produjo una fuerte caída del metil agatolato, con aparición de un pico importante correspondiente al metil agatolato y la formación de los ácidos 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico y ácido 19-norlabda-4,8(20),13-trien-15-oico.

Los procesos de formación y transformación química de la fracción polimérica aparecen descritos en estudios geoquímicos en los que se describen procesos de maduración de resinas fósiles labdánicas (Anderson 1995; Clifford y Hatcher 1995).

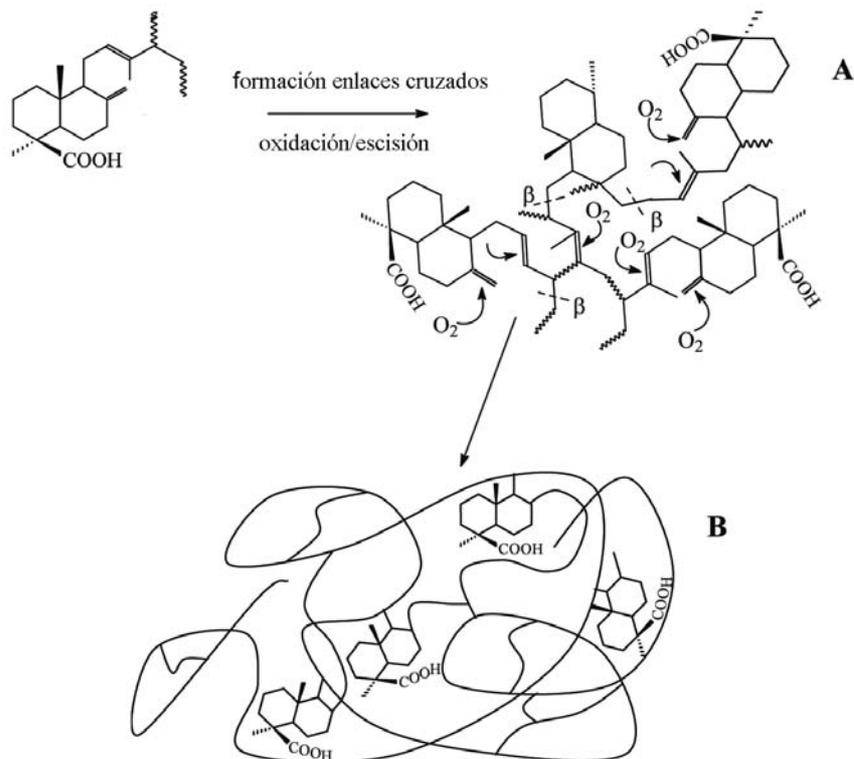
*Sandáracra y copal de Manila*



**Figura 3.** Esquema de polimerización del ácido comúnico

La polimerización se inicia apenas entra en contacto con el aire la resina exudada por la planta y se produce a través de mecanismos oxidativos sobre las insaturaciones de los monómeros de ácido comúnico, formándose radicales libres altamente reactivos. El proceso continúa con reacciones de isomerización, formación de enlaces cruzados y reacciones de ciclación inter e intramoleculares que dan finalmente lugar a una red polimérica de estructura multicíclica (Figura 3).

Scalarone *et al.* (2003) han estudiado el fotoenvejecimiento de la fracción polimérica de estas resinas mediante THM-GC/MS (Thermally assisted Hydrolysis and Metilation-GC/MS), FTIR (Fourier Transform Infra Red spectroscopy), SEC (Size Exclusion Chromatography) y DTMS (Direct Temperature Mass Spectrometry).



**Figura 4.** Esquema de degradación propuesto (Scalarone et al. 2003) para el policomunato. (A) Los dobles enlaces C=C son puntos de formación de enlaces cruzados y reacciones de escisión. (B) El polímero se transforma en una red de unidades bicíclicas conectadas mediante cadenas hidrocarbonadas.

Estos autores no han descrito derivados oxidados de los labdanos causados por procesos fotooxidativos, pero sí que se han hallado diferencias en la estructura química del polímero, que implican el aumento del número de enlaces cruzados y la transformación de dobles enlaces en enlaces simples, proceso que se ve acompañado de una disminución de su peso molecular explicada por la concurrencia de reacciones de escisión. Todo esto marcaría una tendencia del polímero a transformarse por fotoenvejecimiento en una red formada por monómeros bicíclicos unidos por puentes alquílicos (Figura 4).

## 4.2 Material y métodos

### 4.2.1 Barnices

Los barnices se prepararon a partir de resina de sandáracas de *Tetraclinis articulata*, y de resina copal de Manila de *Agathis dammara*, distribuidas por Caremi Pigmentos, Sevilla (España). Las resinas se disolvieron en etanol absoluto (Merck) en proporción una parte en peso de barniz por dos en volumen de alcohol.

### 4.2.2 Microorganismos estudiados

Mediante amplia revisión de la bibliografía existente acerca del biodeterioro de bienes culturales (Ross 1963; Heim *et al.* 1968; Strzelczyk 1981; Giacobini *et al.* 1983; Bravery 1988; Agraval *et al.* 1989; Valentín 1990; Giacobini *et al.* 1988, 1991; Inoue & Koyano 1991; Caneva *et al.* 1994; Montes Estellés 1994; Bolívar 1995; Petushkova & Lyalikova 1986; Seves *et al.* 1996; Valentín *et al.* 1996; Ciferri, 1999; Arai 2000; Walsh 2001, entre otros) se han seleccionado para el estudio los siguientes microorganismos, todos ellos procedentes de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo-CECT:

#### Hongos

*Aspergillus niger* (An) (CECT-2088, ATCC 9029), *Aureobasidium pullulans* (Au) (CECT-2703, ATCC 9348), *Cladosporium cladosporioides* (Cc) (CECT 2110, ATCC 16022) *Penicillium chrysogenum* (Pc) (CECT-2306, ATCC 8537), *Rhizopus oryzae* (Ro) (CECT-2339, ATCC 11145), *Mucor rouxii* (Mr) (CECT-2655, ATCC 24905), y *Trichoderma pseudokoningii* (Tp) (CECT-2937)

#### Bacterias

*Streptomyces cellulofans* (Sc) (CECT-3242 ATCC 29806), *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) (CECT-493, ATCC 23842) y *Arthrobacter oxydans* (Ao) (CECT-386, ATCC 14358)

Igualmente, se han incluido en el estudio cuatro hongos procedentes de las obras pictóricas al óleo sobre lienzo del Museo de Bellas Artes de Granada “Alegoría de la muerte” (P. Toma) y “S. Francisco de Asís” (autor desconocido), ambas del siglo XVII y muy afectadas por procesos de biodeterioro. Los microorganismos han sido identificados como *Aspergillus versicolor*, *Phoma herbarum*, *Chrysonilia sitophila* y *Cladosporium* sp.

### 4.2.3 Preparación de las muestras

#### 4.2.3.1 Soportes de cultivo

Se han empleado portaobjetos de vidrio de tamaño estándar (24x80mm), barnizados a pincel con las resinas estudiadas en tres capas finas sucesivas. Estos soportes imitan las características de una superficie barnizada, pero eliminan las posibles interferencias que causan los materiales orgánicos que podemos encontrar en obras de arte reales. Los soportes así preparados se han dejado secar en oscuridad durante 90 días.

#### 4.2.3.2 Obtención de esporas fúngicas

Los liofilizados de cepas de colección se rehidrataron en medio de cultivo líquido CM (extracto de levadura 5g, extracto de malta 5g, glucosa 10g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 4.5), y se incubaron durante 48h a temperatura de 28°C y humedad relativa del 75%. Transcurrido este tiempo, se inocularon en medio sólido agar malta, de Oxoid (extracto de malta 30g, peptona micológica 5g, agar 15g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 5.4). Cultivos con crecimiento sugestivo de esporulación se resuspendieron en 2 ml de Tween 80 (Aldrich) 0,1%. Tras dos ciclos de lavado/centrifugación, los pellets fueron resuspendidos en 2 ml de agua destilada y filtrados a través de lana de vidrio para eliminar cualquier resto de micelio. Se obtuvieron así suspensiones puras de esporas en agua destilada. Tras recuento en cámara de Neubauer, éstas se ajustaron a la concentración de 10<sup>6</sup> esporas/ml.

#### 4.2.3.3 Obtención de suspensiones bacterianas.

Los liofilizados de cepas de colección se rehidrataron en medio de cultivo líquido TSB (digerido pancreático de caseína 17g, digerido papaínico de harina de soja 3g, NaCl 5g, fosfato potásico dibásico 2.5 g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 7.3), sembrándose a las 48 horas de incubación en medio de cultivo sólido TSA, de Oxoid (triptona 15g, peptona de soja 5g, NaCl 5g, agar 15g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 7.3), con la excepción de *Streptomyces cellulofans*, inoculado en agar patata, de Oxoid (extracto de patata 4g, dextrosa 20g, agar 15 g H<sub>2</sub>O 1l, pH 5.6). A partir de estos cultivos se prepararon inóculos en medio TSB, y se mantuvieron 24 horas en incubación. Después se centrifugaron y lavaron con agua destilada para eliminar cualquier posible resto de medio de cultivo y se resuspendieron en agua destilada. Mediante curva de crecimiento los inóculos se ajustaron a 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> células/ml.

#### 4.2.3.4 *Inoculación de microorganismos en los soportes y cultivo*

Por cada hongo se inoculó un portaobjetos con dos gotas de 75 microlitros (con una superficie de alrededor de 1 cm<sup>2</sup> por gota), a concentración 10<sup>6</sup> esporas/ml. Por cada bacteria se inoculó un portaobjetos con dos gotas de 75 microlitros, ambas a la misma concentración, de las suspensiones descritas en el apartado anterior.

Las condiciones de cultivo, para hongos y bacterias, fueron 28°C de T<sup>a</sup> y humedad relativa del 75% durante 15 días en oscuridad.

#### 4.2.4 *Técnicas de análisis*

La técnica más empleada para el estudio de diterpenos es la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, debido a su combinación de sensibilidad y versatilidad de uso. Sin embargo, el análisis implica la volatilidad de la molécula a condiciones analíticas, lo que excluye el análisis de sustancias de peso molecular elevado, como el polímero de policomunato. Esto supone que mediante esta técnica sólo pueden analizarse los diterpenos libres de las resinas, debiendo emplearse medios alternativos para un estudio completo, como la pirólisis acoplada a espectrometría de masas o la espectroscopia de infrarrojos.

##### 4.2.4.1 *Control de crecimiento*

Se ha realizado un seguimiento microscópico a los cultivos fúngicos, con el fin de estudiar la producción de micelio a partir de la suspensión inicial de esporas en agua destilada. Todos los cultivos fúngicos fueron observados a tiempo cero, 24 horas, 48 horas, cinco, diez y quince días con un microscopio Nikon Eclipse TS100 equipado con cámara digital Nikon DS-5M.

##### 4.2.4.2 *Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)*

Tras el período de incubación, las muestras correspondientes a los patrones, hongos con crecimiento y bacterias se obtuvieron raspando la superficie del barniz con un bisturí estéril, obteniéndose una cantidad aproximada de 5 mg por muestra. Se incluyó también un control sin microorganismos (portaobjetos barnizado e inoculado sólo con agua destilada), incubado en idénticas condiciones que el resto de muestras y dos controles inoculados con esporas fúngicas (*A.niger*) y bacterias (*A. oxydans*) muertas en autoclave. La derivatización se realizó con el agente transesterificador Meth. Prep. II (Alltech), compuesto de hidróxido de m-trifluorometil-fenil-trimetilamonio, que permite obtener los ésteres metílicos de los ácidos carboxílicos existentes en la muestra, y posteriormente se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas con el fin de estudiar los cambios en la composición.

El análisis se llevó a cabo con un sistema integrado compuesto por un cromatógrafo de gases Carlo Erba serie 8000 modelo 8060 (Thermo Instruments, USA) acoplado con un espectrómetro de masas Platform II (Waters, USA).

Para la cromatografía gaseosa se empleó una columna capilar HP-1 MS (fase estacionaria metilpolisiloxano, 30 m x 0.25 mm I.D x 0.25  $\mu$ m de espesor). Las condiciones cromatográficas han sido: temperatura inicial de 120°C, e incremento a razón de 10°C/min hasta 300°C e isoterma durante 20 min. El gas portador fue Helio, con un flujo de 1.2 ml/min y una presión de 14 Psi. Las muestras se inyectaron en modo splitless.

Para el análisis mediante espectrometría de masas, se usó una fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV). El rango de escaneo ha sido de m/z 50 a 500, con ciclos de 1s. El software utilizado en la adquisición y procesado de las muestras fue MassLynx v.4.0. Los espectros de masas se han adquirido en el modo total ion monitoring mode (Full Scan) y se ha empleado el área de los distintos picos aparecidos en el TIC para obtener información cuantitativa. Las temperaturas de la interfase y de la fuente de iones han sido respectivamente de 300 °C y 210 °C. Para la identificación de compuestos se ha usado la librería de espectros de masas Wiley, así como bibliografía especializada.

#### 4.2.4.3 Pirólisis-cromatografía de gases/espectrometría de masas (Py-GC-MS)

Para el análisis por Py-GC-MS se han escogido los microorganismos *C. sitophila*, *P. chrysogenum*, *P. herbarum* y *A. oxydans* en copal de Manila y *C. sitophila*, *P. chrysogenum*, *R. oryzae* y *A. oxydans* en sandáracas. La preparación de los barnices y soportes, obtención de esporas fúngicas y suspensiones bacterianas, así como la inoculación de los microorganismos, se ha realizado según lo descrito en la sección 4.2.3. Las muestras se obtuvieron raspando la superficie del barniz con un bisturí estéril. Se incluyó también por barniz un patrón sin microorganismos (portaobjetos barnizado e inoculado sólo con agua destilada), incubado en idénticas condiciones que el resto de muestras.

Los experimentos se realizaron con un sistema integrado compuesto por un pirolizador CDS Pyroprobe 1000 (CDS Analytical Inc, USA) y un cromatógrafo de masas Agilent 6890N (Agilent Instruments, USA) acoplado con un espectrómetro de masas Agilent 5973 N.

### *Sandáracas y copal de Manila*

La pirólisis se realizó a 600°C durante 10 s, usando un pirolizador de Pt (coil type) precalibrado (CDS pyroprobe). La temperatura de la interfase y el sistema de entrada se ajustó a 250°C. Las muestras se colocaron en un microtubo de pirólisis de cuarzo, y fueron aseguradas con pequeñas porciones de lana de cuarzo con el fin de evitar desplazamientos. Se añadió a cada muestra 5-10 µl de hexametildisilazano (Sigma, Germany) como reactivo de derivatización.

Las muestras se inyectaron en el sistema GC-MS en modo split (ratio 1:80). La columna capilar empleada fue del tipo HP-5MS (fase estacionaria 5% fenil-95% metilpolisiloxano, 30 m x 0.25 mm I.D x 0.25 µm de espesor). Las condiciones cromatográficas han sido: temperatura inicial de 100 °C, e incremento a razón de 10 °C/min hasta 295 °C e isoterma durante 8 min. El gas portador fue Helio, con un flujo de 1.6 ml/min y una presión de 72.5 kPa.

Para el análisis mediante espectrometría de masas, se usó una fuente de ionización de impacto electrónico (70 eV). El rango de escaneo ha sido de m/z 20 a m/z 800, con ciclos de 1s. El software utilizado para integrar la información analítica ha sido Agilent Chemstation software G1701CA (MSD). Los espectros de masas se han adquirido en el modo total ion monitoring mode y para la identificación de los compuestos se ha usado la librería Wiley, así como bibliografía especializada.

#### *4.2.4.4 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier*

El estudio se ha realizado en las dos resinas empleando soportes análogos a los descritos en el apartado 4.2.3 en todos los hongos con crecimiento y las tres bacterias estudiadas. Dichas muestras se han preparado triturándolas finamente con bromuro de potasio a una concentración de 1% p/p y esta mezcla en polvo se ha comprimido en una prensa de troquel mecánica para formar un pellet translúcido a través del cual puede pasar la radiación. Los espectros fueron obtenidos en modo de absorción en el infrarrojo medio (400-4000 cm<sup>-1</sup>) con un equipo de espectroscopia Nicolet 205XB a una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>.

## 4.3 Resultados y discusión

### 4.3.1 Control de crecimiento

Los hongos que han mostrado capacidad de crecimiento sobre los barnices han sido los siguientes (Tabla 1):

#### Sandáracas

	18 HORAS	48 HORAS	5 DIAS
<i>A. niger</i>	-	-	-
<i>A. pullulans</i>	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-
<i>C. sitophila</i>	+	++	++
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-
<i>Cladosporium sp</i>	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	+	++	++
<i>P. herbarum</i>	-	-	-
<i>R. oryzae</i>	+	++	++
<i>M. rouxii</i>	+	+	+
<i>T. pseudokoningii</i>	-	-	-

#### Copal de Manila

	18 HORAS	48 HORAS	5 DIAS
<i>A. niger</i>	+	+	+
<i>A. pullulans</i>	-	+	+
<i>A. versicolor</i>	-	-	-
<i>C. sitophila</i>	++	++	++
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-
<i>Cladosporium sp</i>	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	+	++	++
<i>P. herbarum</i>	-	+	++
<i>R. oryzae</i>	-	+	+
<i>M. rouxii</i>	-	-	-
<i>T. pseudokoningii</i>	-	-	-

**Tabla 1.** Crecimiento de los hongos estudiados en los barnices de sandáracas y copal de Manila (- no desarrollo, + desarrollo escaso, ++ desarrollo)

## *Sandáracas y copal de Manila*

Las imágenes (Figuras 14-23) muestran la formación de estructuras fúngicas a partir del inóculo original de esporas en cuatro de los hongos estudiados en el caso de la sandáracas y cinco en el copal de Manila. El crecimiento se ha visto limitado a las primeras 48 horas tras el inóculo, según ha demostrado el seguimiento microscópico de los cultivos, lo que puede relacionarse con la inicial abundancia de agua procedente del inóculo y la escasez de nutrientes del medio. Sin embargo, el desarrollo observado resulta importante, ya que permite prever importantes efectos en condiciones reales, en las que estos materiales están en contacto directo con el ambiente y puede darse un aporte sostenido de microorganismos y materia orgánica si las condiciones de mantenimiento de las obras no son las adecuadas.

### *4.3.2 Cromatografía de gases/espectrometría de masas*

La cantidad relativa de cada uno de los ácidos con respecto a los demás se ha expresado en área de pico normalizada,  $N_i$ , definida como porcentaje de área correspondiente a cada componente en relación al área total:

$$N_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100$$

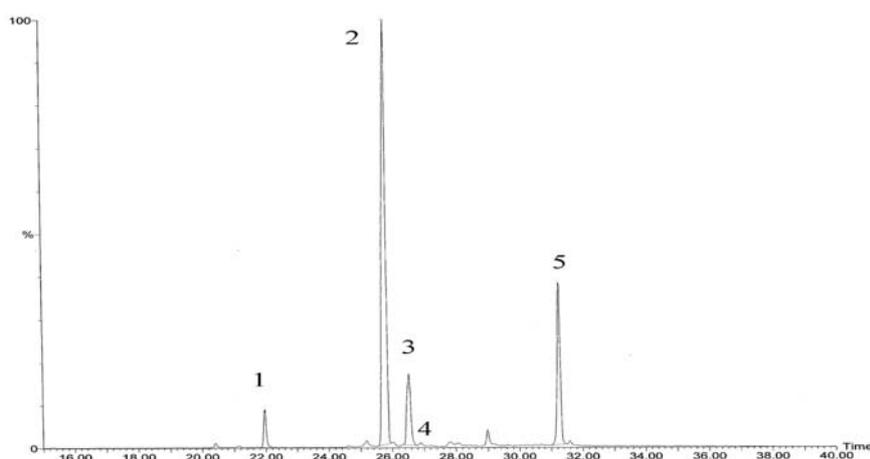
Donde  $A_i$  es el pico de área de cada uno de los  $n$  compuestos encontrados en el cromatograma.

Un control, inoculado sólo con agua destilada e incubado en idénticas condiciones, ha sido también analizado para obtener el patrón de composición de los barnices en ausencia de microorganismos. Para cuantificar los cambios en la composición se ha establecido el parámetro  $\Delta N_i$ , definido como el incremento o disminución de  $N_i$  para cada analito en relación a los valores correspondientes a la muestra patrón  $N_{i0}$ .

$$\Delta N_i = N_i - N_{i0}$$

## 4.3.2.1 Sandáracas

Los componentes encontrados en la resina de sandáracas no inoculada con microorganismos han sido los siguientes (Figura 5 y Tabla 2).



**Figura 5.** Cromatograma correspondiente al patrón de sandáracas. (1) Manool; (2) Ácido sandaracopimárico, metil éster; (3) Ácido isopimárico, metil éster; (4) Totarol; (5) Derivado hidroxilado del ácido sandaracopimárico, metil éster

**Tabla 2.** Compuestos identificados mediante GC-MS en la resina de sandáracas

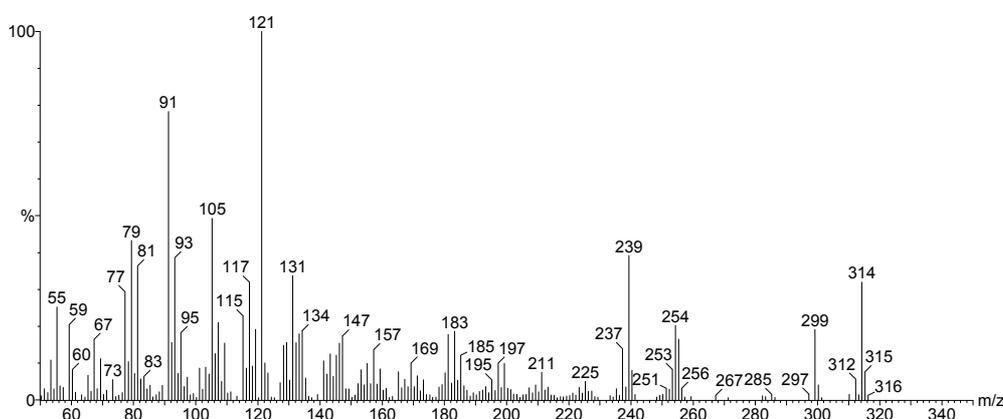
Nº	$t_R$	Compuesto	Pm	ID
1	21,98	Manool	290	L
2	25,81	Ácido sandaracopimárico, metil éster	316	L
3	26,65	Ácido isopimárico, metil éster	316	R
4	26,90	Totarol	286	L
5	31,11	Derivado hidroxilado del ácido sandaracopimárico, metil éster	332	

( $t_R$ =tiempo de retención; Pm = peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley Mass Spectra Library; R, Referencias)

*Identificación y patrones de fragmentación por espectrometría de masas*

La identificación de los compuestos se ha realizado según la base de datos de espectros de masas Wiley Mass Spectra Library (L) y los espectros de masas publicados en bibliografía (R) (Dethlefs *et al.* 1996; Van den Berg *et al.* 2000; Osete-Cortina *et al.* 2004; Osete-Cortina & Doménech-Carbó 2005). Los pimaranos presentes en estas resinas se caracterizan (Anexo 1) por un ión molecular a  $m/z=316$ , y picos característicos a  $m/z=310$   $[M-CH_3]^+$ ,  $m/z=257$   $[M-COOCH_3]^+$  y  $m/z=121$  (pico base).

El compuesto n°5 se ha identificado como un derivado hidroxilado del ácido sandáracopimárico, posiblemente en posición 6 ó 7. La sustancia presenta un perfil en masas (Figura 6) similar al del ácido sandáracopimárico, pero el tiempo de retención, muy alto, hace pensar en un derivado oxidado. La explicación más probable es la de un compuesto hidroxilado de  $Pm=332$ , que daría picos principales a  $m/z=314$   $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z=299$   $[M-H_2O-CH_3]^+$ ,  $m/z=254$   $[M-H_2O-HCOOCH_3]^+$ ,  $m/z=239$   $[M-H_2O-CH_3-COOCH_3]^+$  y pico base a  $m/z=121$ , como corresponde al esqueleto pimarano.

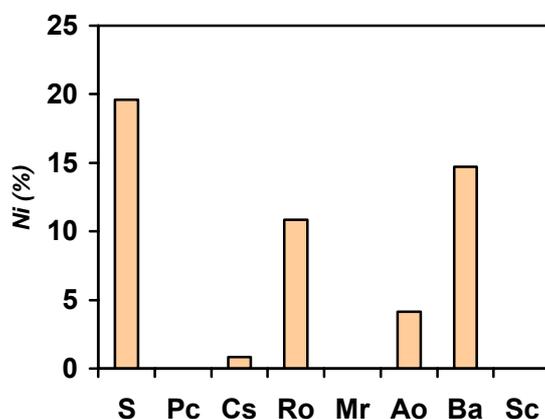


**Figura 6.** Espectro de masas del compuesto n°5

Los resultados analíticos correspondientes al patrón, hongos con crecimiento y muestras inoculadas con bacterias se muestran en las Figuras 7-8 y Tabla 3. La fracción diterpénica libre del patrón de sandáracas ha mostrado una composición basada en los ácidos sandáracopimárico ( $Ni=63.80\%$ ), isopimárico ( $Ni=10.81\%$ ) e hidroxisandáracopimárico ( $Ni=19.60\%$ ). Las muestras inoculadas con esporas y bacterias inactivadas han mostrado una composición muy similar a la del patrón sin inocular.

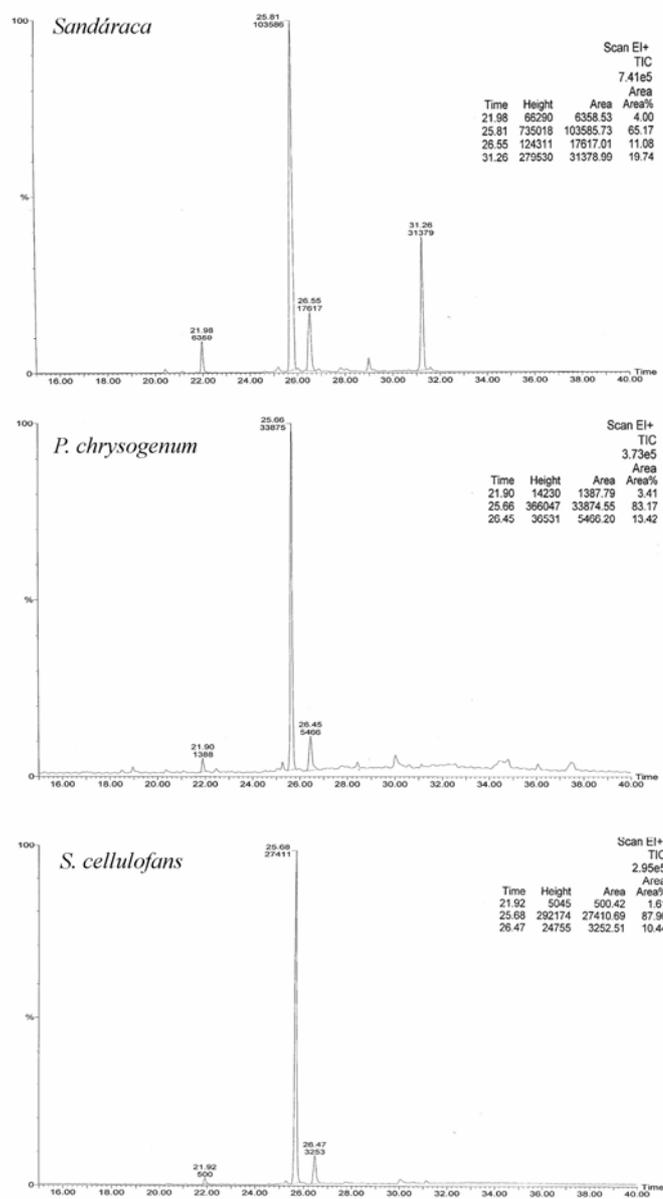
Los principales cambios químicos observados en la fracción diterpénica de la resina de sandáracas afectan al derivado pimaránico hidroxilado, que disminuye sensiblemente su concentración. La resina patrón, incubada en idénticas condiciones al resto de muestras y no inoculada con microorganismos, presenta una cantidad relativa de este compuesto del 19.74 %, muy superior a la correspondiente a las muestras sometidas a la acción microbiana. En el caso de los hongos, las cifras oscilan entre el  $Ni=10.87\%$  ( $\Delta Ni=-8.73$ ) de *R. oryzae* y el  $Ni=0\%$  de *M. rouxii* y *P. chrysogenum*, mientras que las tres bacterias estudiadas han mostrado un comportamiento dispar. En *A. oxydans* el compuesto mencionado baja al 4.14%, ( $\Delta Ni=-15.46$ ) y en *S. cellulofans* es indetectable (0%). Sin embargo, *B. amyloliquefaciens* no presenta significativas diferencias con la resina sin inocular, lo que relacionamos con una escasa actividad metabólica de este microorganismo sobre los diterpenos libres de la resina de sandáracas.

La fuerte disminución de esta sustancia podría explicarse por la concurrencia de procesos favorecidos por la presencia de microorganismos, tales como reacciones de polimerización a través de mecanismos radicalarios a partir de los dobles enlaces y los grupos hidroxilo de este compuesto, que pueden dar lugar a estructuras oligoméricas sencillas lo suficientemente pesadas como para no ser analizables por cromatografía de gases.



**Figura 8.** Valores de área de pico normalizada ( $Ni\%$ ) del derivado hidroxilado del ácido sandaracopimárico en el barniz de sandáracas y las muestras inoculadas con microorganismos (S=sandaracas, Cs=*C. sitophila*; Ro=*R. oryzae*; Mr=*M. rouxii*; Pc=*P. chrysogenum*; Ao=*A. oxydans*; Ba= *B. amyloliquefaciens*; Sc=*S. cellulofans*)

*Sandáracas y copal de Manila*



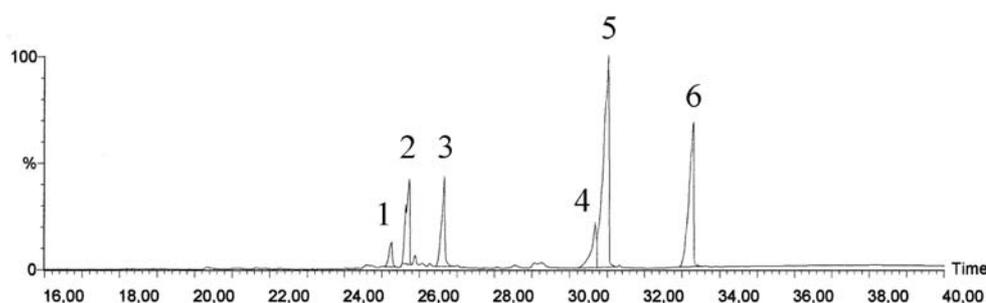
**Figura 7.** Cromatogramas correspondientes al patrón de sandáracas y a las muestras inoculadas con *P. chrysogenum* y *S. cellulofans*

**Tabla 3.** Análisis por GC-MS de los principales componentes de la resina de sandáracas en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis).

Hongos			
	Ác. sandaracopimárico	Ác. isopimárico	OH-sandaracopimárico.
<b>Sandáracas</b>	<b>63.80</b>	<b>10.81</b>	<b>19.60</b>
<i>M. rouxii</i>	87.45 (+23.65)	9.56 (-1.25)	0 (-19.60)
<i>P. chrysogenum</i>	83.17 (+19.37)	13.42 (+2.61)	0 (-19.60)
<i>R. oryzae</i>	75.22 (+11.42)	10.62 (-0.19)	10.87 (-8.73)
<i>C. sitophila</i>	86.24 (+22.44)	10.65 (-0.16)	0.85 (-18.75)
Bacterias			
	Ác. sandaracopimárico	Ác. isopimárico	OH-sandaracopimárico.
<b>Sandáracas</b>	<b>63.80</b>	<b>10.81</b>	<b>19.60</b>
<i>A. oxydans</i>	74.16 (+10.36)	14.46 (+3.65)	4.14 (-15.46)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	63.24 (-0.56)	13.40 (+2.59)	14.70 (-4.90)
<i>S. cellulofans</i>	87.96 (+24.16)	10.44 (-0.37)	0 (-19.60)

#### 4.3.2.2 Copal de Manila

En la resina de Copal de Manila sin inocular se han encontrado los siguientes compuestos (Figura 9 y Tabla 4):



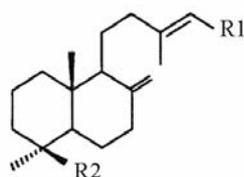
**Figura 9.** Cromatograma correspondiente al patrón de copal de Manila. (1) Ácido-19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico, metil éster; (2) Ácido sandaracopimárico, metil éster; (3) Ácido isopimárico, metil éster; (4) Ácido agatálico, metil éster; (5) Ácido agático, dimetil éster; (6) Ácido acetoxi agatólico, metil éster

**Tabla 4** Compuestos identificados mediante GC-MS en la resina de copal de Manila

Nº	$t_R$	Compuesto	Pm	ID
1	25,26	Ácido 19 norlabda-8(20), 13-dien-15-oico, metil éster	304	R
2	25,72	Ácido sandaracopimárico, metil éster	316	L
3	26,65	Ácido isopimárico, metil éster	316	R
4	30,67	Ácido agatálico, metil éster	332	R
5	31,02	Ácido agático, dimetil éster	362	L
6	33,30	Ácido acetoxi agatólico, metil éster	376	R

( $t_R$ :=tiempo de retención, Pm = peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley y NIST Mass Spectra Library; R, Referencias)

## Identificación y patrones de fragmentación por espectrometría de masas



Ión	R <sub>1</sub> = COOCH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> = H	R <sub>1</sub> = COOCH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> = CHO	R <sub>1</sub> = COOCH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> = COOCH <sub>3</sub>	R <sub>1</sub> = COOCH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub>
M <sup>+</sup>	304	332	362	376
[M-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	289	317	347	361
[M-R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>		303	303	303
[M- CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>			330	344
[M- CH <sub>3</sub> OH-CO] <sup>+</sup>	244		302	316
[M-CH <sub>3</sub> OH- CH <sub>2</sub> CO] <sup>+</sup>	230	258	288	302
[M-HR <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>		243	243	243

**Tabla 5.** Patrones de fragmentación característicos de los diterpenos ácidos de tipo labdano

La identificación de los compuestos se ha realizado según la base de datos de espectros de masas Wiley Mass Spectra Library (L) y los espectros publicados (R) en bibliografía (Scalarone *et al.* 2002 y referencias citadas; Osete-Cortina & Doménech-Carbó 2005). Todos los diterpenos labdanos presentan una estructura bicíclica con uno o dos grupos funcionales localizados en la cadena lateral (R1) y el anillo A (R2). Los fragmentos más importantes en espectroscopia de masas (EI=70v) aparecen en la Tabla 5.

La fracción diterpénica libre del copal de Manila patrón está compuesta principalmente de ácido agático (*Ni*=42.53%), ácido acetoxi agatólico (*Ni*=24.19%), y cantidades menores de ácido agatálico (7.89%) y ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico (2.97%). Los hongos que han mostrado capacidad de crecimiento sobre el barniz y la bacteria *A. oxydans* han producido cambios en su composición,

consistentes en variaciones de la intensidad relativa de los picos (Tablas 6-7 y Figura 10). Las muestras inoculadas con esporas y bacterias inactivadas han mostrado una composición muy similar a la del patrón sin inocular.

El principal cambio observado en la fracción diterpénica libre del barniz es la disminución de la cantidad relativa de ácido agatálico, que alcanza un valor mínimo para *A. pullulans*. ( $N_i$  (%)=1.71,  $\Delta N_i$ =-6.18) y un aumento del ácido agático, que llega en *R. oryzae* a valores de  $N_i$  (%)=51.76 ( $\Delta N_i$ =+9.23). Este aumento del índice agático/agatálico (tabla 6), es una tendencia generalizada en todas las muestras con crecimiento fúngico y en la bacteria *A. oxydans* que alcanza un valor máximo en *R. oryzae* (27.56) y mínimo en *A. niger* (9.33). Puede explicarse por oxidación de la forma aldehído y su conversión en ácido, ya que la suma de las cantidades relativas de ambas sustancias se mantiene bastante estable (Tabla 6). Esta oxidación es un proceso esperable, dada la inestabilidad de los aldehídos, que se ve favorecido en presencia de los microorganismos.

Otras tendencias observadas son el moderado pero generalizado aumento del pequeño pico correspondiente al ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico, especialmente importante en *A. pullulans* ( $N_i$  (%)=4.68,  $\Delta N_i$ =+1.71), posiblemente por descarboxilación del ácido agático o agatálico, y el significativo descenso del ácido acetoxi agatálico en los hongos *R. oryzae* y *C. sitophila*. *Penicillium chrysogenum* ha mostrado un patrón diferente al del resto de microorganismos con crecimiento, habiéndose encontrado un aumento del ácido agatálico ( $N_i$ =16.70,  $\Delta N_i$ =+8.81) y un descenso del agático ( $N_i$ =37.97,  $\Delta N_i$ =-4.56). Las bacterias *S. cellulofans* y *B. amyloliquefaciens* no han producido cambios de importancia en la composición del barniz, lo que relacionamos con una escasa actividad metabólica de estos microorganismos en las condiciones experimentales.

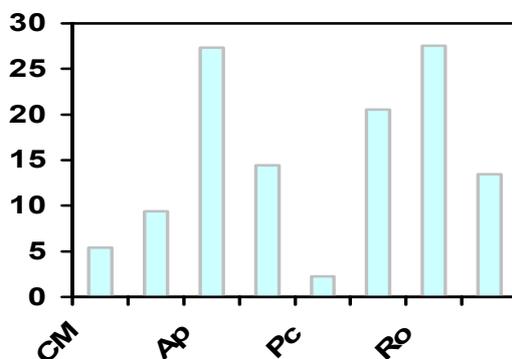
Por último, es también destacable señalar que los pimaranos no han experimentado grandes cambios (Tabla 7), al igual que ha ocurrido en el caso de la sandáracas.

Los resultados se asemejan a los publicados por Scalarone *et al.* (2003) en análisis realizado por GC/MS después de 600 horas de irradiación con lámpara de ultravioleta, lo que sugiere que los microorganismos favorecen los procesos naturales de degradación del barniz. El principal cambio registrado en dicho estudio fue una importante caída del metil agatalato y la formación de los ácidos 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico y 19-norlabda-4,8(20),13-trien-15-oico.

**Tabla 6.** Análisis por GC-MS de los componentes labdánicos del copal de Manila en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis).

	Ác.19-norlabda-8 (20),13-dien-15- oico	Ác. agatálico	Ác. agático	Ác acetoxi agatálico
<i>Copal Manila</i>	<b>2.97</b>	<b>7.89</b>	<b>42.53</b>	<b>24.19</b>
<i>A. pullulans</i>	4.68 (+1.71)	1.71 (-6.18)	46.76 (+4.23)	20.33 (-3.86)
<i>A. niger</i>	3.60 (+0.63)	4.94 (-2.95)	46.24 (+3.71)	19.28 (-4.91)
<i>R oryzae</i>	4.20 (+1.23)	1.88 (-6.01)	51.76 (+9.23)	15.27 (-8.92)
<i>C. sitophila</i>	3.92 (+0.95)	3.19 (-4.70)	46.07 (+3.54)	17.93 (-6.23)
<i>P.chrysogenum</i>	3.01 (+0.04)	16.70 (+8.81)	37.97 (-4.56)	22.08 (-2.11)
<i>P. herbarum</i>	3.92 (+0.95)	1.93 (-5.96)	39.70 (-2.83)	19.81 (-4.38)
<i>A. oxydans</i>	2.88 (-0.09)	3.58 (-4.31)	48.14 (+5.61)	22.27 (-1.92)
<i>B.amyloliquefaciens</i>	3.04 (+0.07)	9.09 (+1.20)	44.46 (+1.93)	22.19 (-2.00)
<i>S.cellulofans</i>	2.30 (-0.67)	9.14 (+1.25)	41.52 (+1.01)	24.30 (+0.11)

	Ác. agatálico + Ác.agático	índice agático/agatálico
<i>Copal de Manila</i>	<b>50.42</b>	<b>5.39</b>
<i>A. pullulans</i>	48.47 (-1.95)	27.34
<i>A. niger</i>	51.18 (+0.76)	9.36
<i>R oryzae</i>	53.64 (+3.22)	27.53
<i>C. sitophila</i>	49.26 (-1.16)	14.44
<i>P.chrysogenum</i>	54.67 (+4.25)	2.27
<i>P. herbarum</i>	41.63 (-8.79)	20.56
<i>A. oxydans</i>	51.72 (+1.40)	13.44



**Figura 10.** Valores del índice agático/agatálico en el copal de Manila (CM) y las muestras inoculadas con microorganismos (An=*A. niger*; Ap=*A. pullulans*; Cs= *C. sitophila*; Pc= *P. chrysogenum*; Ph=*P. herbarum*; Ro=*R. oryzae*; Ao=*A. oxydans*).

**Tabla 7.** Análisis por GC-MS de los componentes pimaránicos del copal de Manila en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis).

	Ác sandaracopimárico	Ác. isopimárico
<b>Copal de Manila</b>	<b>11.97</b>	<b>10.45</b>
<i>A. pullulans</i>	13.21 (+1.24)	13.30 (+2.85)
<i>A. niger</i>	13.07 (+1.10)	12.87 (+2.42)
<i>R. oryzae</i>	14.35 (+2.38)	12.54 (+2.09)
<i>C. sitophila</i>	15.32 (+3.35)	13.58 (+3.13)
<i>P. chrysogenum</i>	9.62 (-2.35)	10.62 (+0.17)
<i>P. herbarum</i>	18.45 (+6.48)	8.45 (-2.00)
<i>A. oxydans</i>	13.82 (+1.85)	9.31 (-1.14)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	10.30 (-1.67)	10.91 (+0.46)
<i>S. cellulofans</i>	11.30 (-0.67)	11.43 (+0.98)

### 4.3.3 Pirólisis-cromatografía de gases/espectrometría de masas

La cantidad relativa de cada uno de los ácidos con respecto a los demás se ha expresado en área de pico normalizada,  $N_i$ , y para cuantificar los cambios en la composición se ha establecido el parámetro  $\Delta N_i$ , al igual que en las muestras analizadas por GC-MS. Para el análisis cuantitativo se han integrado los picos de abundancia superior a  $1 \times 10^8$  en copal de Manila y  $2 \times 10^8$  en sandáracas. La identificación se ha realizado según la base de datos de espectros de masas Wiley Mass Spectra Library (L) y los espectros publicados en bibliografía (R) (Scalalone *et al.* 2002 y referencias citadas; Osete-Cortina & Doménech-Carbó 2005).

**Tabla 8.** Compuestos correspondientes al polímero de policomunato identificados en sandáracas y copal de Manila mediante Py-GC/MS

Nº	tR	Compuesto	Pm	ID*
1	12.24	Ácido 1,3-dimetil-ciclohexa-2-en-carboxílico, TMS éster	226	R
2	13.80	Ácido 1,2,3-trimetil-ciclohexa-2-en-carboxílico, TMS éster	240	R
3	16.13	Ácido 1,4a,6-trimetil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico, TMS éster	294	R
4	16.31	Isómero del compuesto 3	294	R
5	16.92	Ácido 1,4a,6-trimetil-5-metilén-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico, TMS éster	306	R
6	17.26	Ácido 1,4a,5,6-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico, TMS éster	308	R
7	17.37	Isómero del compuesto 5	308	R
8	18.29	Ácido 5-etil-1,4a,6-trimetil-1,2,3,4-tetrahidro-naftalencarboxílico, TMS éster	318	R
9	19.29	5-(3-metil-but-2-enil)-6-metilén-1,4a,6-trimetil-decahidro-naftalencarboxilato	362	R
10	19.70	Ácido 3-metil-(5,5,8a-trimetil-2-metilén-decahidro-naftalén-1-il)-3-metil-pent-2-enoico, TMS éster	376	R
11	20.14	Ácido cis-comúnico, TMS éster	374	L
12	20.19	Ácido trans-comúnico, TMS éster	374	L

( $t_R$ =tiempo de retención; Pm = peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley Mass Spectra Library; R, Referencias)

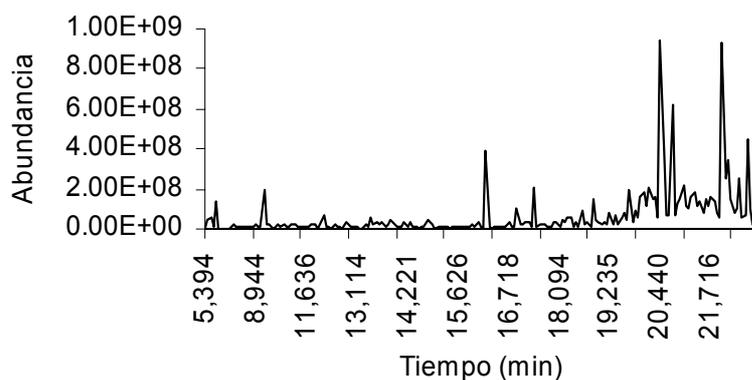
Los principales compuestos correspondientes a la fracción polimérica identificados por esta técnica en sandáracas y copal de Manila aparecen en la Tabla 8. La técnica de Py-GC-MS permite el estudio de los componentes de alto (fracción polimérica) y bajo peso molecular (diterpenos libres) simultáneamente, pero presenta la desventaja de dar resultados más complejos que los obtenidos por GC/MS, a causa de los productos secundarios formados por pirolización. Estudios previos (Scalalone *et al.*

2003; Osete-Cortina & Doménech-Carbó 2005) han señalado que los picos característicos de la fracción polimérica son principalmente el ácido comúnic, en sus formas *cis* y *trans* (11, 12) y los ácidos bicíclicos (3-10), generados por pérdida de la cadena lateral insaturada del ácido comúnic, apareciendo los diterpenos libres a tiempos de retención superiores.

También se producen fragmentos de mayor peso molecular, pero no son analizables mediante esta técnica al no ser lo suficientemente volátiles. El reactivo de derivatización empleado, hexametildisilazano (HMDS), ha probado su eficacia en el estudio de terpenos (Chiavari *et al.* 2002), y permite discernir entre el mono metil éster del ácido agático y el ácido agático, ambos presentes en las resinas y que son indistinguibles si se emplean técnicas de derivatización por metilación.

#### 4.3.3.1 *Sandáracas*

Los resultados analíticos se muestran en la Figura 11 y las Tablas 9-10. Los principales componentes de la fracción polimérica hallados por esta técnica analítica han sido un isómero del ácido 1,4a,6-trimetil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico ( $Ni(\%)=7.04$ ), un isómero del ácido 1,4a,5,6-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico ( $Ni(\%)=7.04$ ), y los ácidos *cis*-comúnic ( $Ni(\%)=3.82$ ) y *trans*-comúnic ( $Ni(\%)=2.78$ ).



**Figura 11.** Cromatograma correspondiente al patrón de sandáracas por Py-GC-MS

TR	Compuesto	Ni (%)
16.314	Ácido 1,4a,6-trimetil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico (isómero), TMS éster	7.04
17.380	Ácido 1,4a,5,6-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico (isómero), TMS éster	3.65
20.155	Ácido cis-comúnico, TMS éster	3.82
20.213	Ácido trans-comúnico, TMS éster	2.78
20.276	Ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico, TMS éster	2.80
20.440	Ácido sandaracopimárico, TMS éster	17.13
20.694	Ácido isopimárico, TMS éster	11.28
21.983	Derivado hidroxilado del ácido sandaracopimárico, TMS éster	16.93

**Tabla 9** Principales compuestos identificados mediante Py-GC-MS en el barniz de sandáracas y sus cantidades relativa (Ni%)

Los resultados correspondientes a las muestras inoculadas con microorganismos en relación al patrón se muestran en las Tablas 10 y 11. El resultado general en las muestras inoculadas con esporas fúngicas es similar al observado por GC/MS, con un importante descenso de los picos cromatográficos correspondiente el derivado hidroxilado del ácido sandaracopimárico y sus fragmentos, que se acompaña del consiguiente aumento de la cantidad relativa del resto de componentes.

	Isómero del Ácido 1,4a,6-trimetil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico	Isómero del Ácido 1,4a,5,6-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidronaftalencarboxílico	Cis-comúnico	Trans-comúnico
<b>Patrón</b>	<b>7.04</b>	<b>3.65</b>	<b>3.82</b>	<b>2.78</b>
<i>C. sitophila</i>	15.79 (+8.75)	9.76 (+6.11)	19.23* (+12.63)	
<i>P. chrysogenum</i>	9.01 (+1.97)	4.04 (+0.39)	8.56 (+4.74)	1.54 (-1.24)
<i>R. oryzae</i>	13.52 (+6.48)	6.07 (+2.42)	13.19 (+9.37)	7.45 (+4.67)
<i>A. oxydans</i>	8.89 (+1.85)	4.96 (+1.31)	5.29 (+1.47)	4.51 (+1.73)

\*Los dos compuestos coeluyen en un único pico

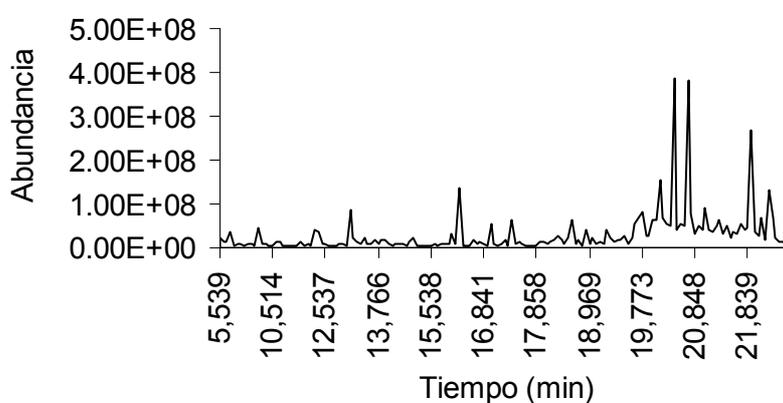
	Ac. 19-Norlabda-8(20) dien-15 oico	Ác. Sandáracopimárico	OH-sandaracopimarico
<b>Patrón</b>	<b>2.80</b>	<b>17.13</b>	<b>16.93</b>
<i>C. sitophila</i>	4.47 (+1.67)	29.15 (+12.02)	3.44 (-13.49)
<i>P. chrysogenum</i>	5.40 (+2.60)	28.60 (+11.47)	1.51 (-15.42)
<i>R. oryzae</i>	7.88 (+5.08)	31.29 (+14.16)	2.96 (-13.97)
<i>A. oxydans</i>	4.11 (+1.31)	20.94 (+3.81)	10.66 (-6.27)

**Tabla 10.** Análisis por Py-GC-MS de los principales componentes del barniz de sandáracas en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis)

El principal cambio en los picos correspondientes a la fracción polimérica ha consistido en un aumento generalizado de los mismos, especialmente en *C. sitophila* y *R. oryzae*, en general poco significativo, dado que se inscribe dentro de la tendencia general, mientras que en *P. chrysogenum* dicho aumento sólo se ha registrado en el ácido cis-comúnico. En *A. oxydans* los cambios han sido poco destacables respecto al patrón. Estos resultados indican que no se han producido cambios de importancia en la fracción polimérica en las muestras de sandáracas inoculadas con hongos y bacterias.

## 4.3.3.2 Copal de Manila

Los principales componentes encontrados en el copal de Manila aparecen en la Figura 12 y la Tabla 11.



**Figura 12.** Cromatograma correspondiente al patrón de copal de Manila por Py-GC-MS

tR	Compuesto	Ni (%)
16.307	Ácido 1,4a,6-trimetil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-naftalencarboxílico, TMS éster	9.04
20.149	Ácido cis-comúnico, TMS éster	10.02
20.427	Ácido sandaracopimárico, TMS éster	25.16
20.687	Ac. isopimárico, TMS éster	25.16
21.964	Ácido agático, TMS éster	17.49
22.154	Ácido agático, di-TMS éster	4.58
22.368	Acido acetoxi agatológico, di-TMS ester	8.51

**Tabla 11** Principales compuestos identificados mediante Py-GC-MS en el copal de Manila.

Los principales componentes correspondientes a la fracción polimérica son el ácido cis-comúnico y un isómero del ácido 1,4a,6-trimetil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-naftalencarboxílico, biciclo producido por la pérdida de la cadena lateral insaturada

del ácido comúnic. La muestra patrón presenta (Tabla 11) una cantidad relativa de estas sustancias de  $Ni(\%)=10.02$  y  $Ni(\%)=9.04$ , respectivamente, tras integración de los picos de abundancia mayor a  $1.00E+08$ . En las muestras inoculadas los principales cambios corresponden a variaciones en el área de los picos (Tabla 12). El principal cambio observado en los compuestos correspondientes a la fracción polimérica es un descenso en la cantidad relativa del ácido cis-comúnic, que se reduce a la mitad en las muestras inoculadas con hongos y a menos de un tercio en *A. oxydans*. Los cambios en el biciclo han sido menos destacables y dispersos.

	Isómero del ácido 1,4a,6-trimetil- 1,2,3,4,4a,7,8,8a- octahidronaftalencarboxílico	Ac. cis-comúnic
<b>Patrón</b>	<b>9.04</b>	<b>10.02</b>
<i>C. sitophila</i>	11.63 (+2.59)	4.40 (-5.62)
<i>P. chrysogenum</i>	6.94 (-2.10)	4.68 (-5.34)
<i>P. herbarum</i>	8.90 (-0.14)	5.70 (-4.32)
<i>A. oxydans</i>	6.40 (-2.64)	2.78 (-7.24)

	Ac. sandaracopinárico	Ac. isopimárico	Ác. Agático TMS-éster	Ác. Agático di-TMS-éster	Ac. acetoxi agatólico
<b>Patrón</b>	<b>25.16</b>	<b>25.16</b>	<b>17.49</b>	<b>4.58</b>	<b>8.72</b>
<i>C. sitophila</i>	23.77 (-1.39)	23.77 (-1.39)	22.27 (+4.78)	5.79 (+1.21)	Tr (-8.72)
<i>P. chrysogenum</i>	21.06 (-4.10)	19.63 (-5.53)	25.58 (+8.09)	8.10 (+3.52)	6.90 (-1.82)
<i>P. herbarum</i>	25.26 (+0.10)	21.21 (-3.95)	22.17 (-4.68)	8.00 (-3.42)	8.42 (-0.30)
<i>A. oxydans</i>	13.90 (-11.26)	17.65 (-7.51)	16.94 (-0.55)	11.24 (-6.66)	11.06 (-2.34)

**Tabla 12.** Análisis por Py-GC-MS de los principales componentes del copal de Manila en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $Ni$  e  $\Delta Ni$ , entre paréntesis)

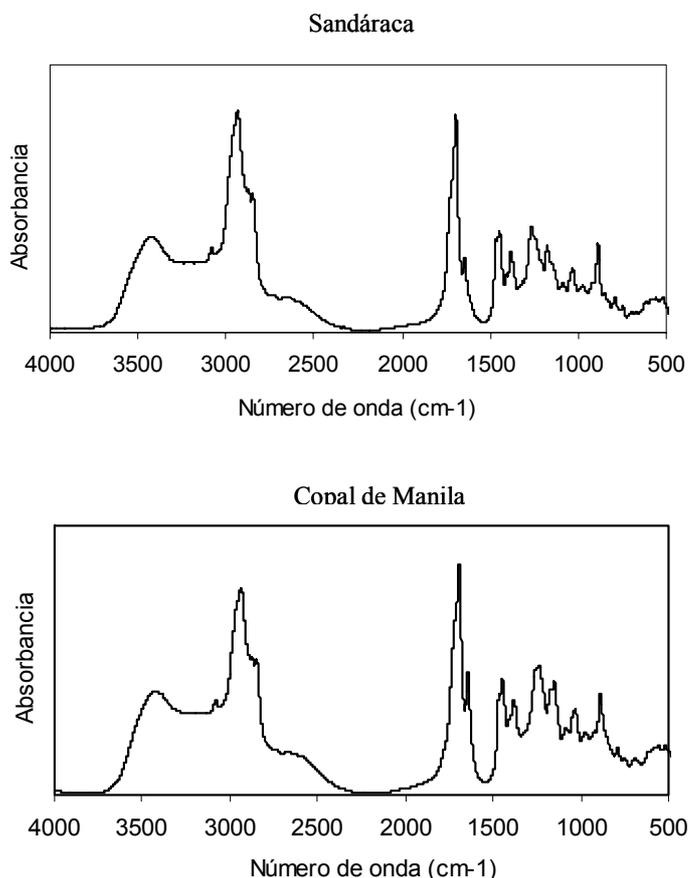
El patrón observado concuerda con el proceso descrito por *Scalarone et al.* (2003) en un estudio de fotoenvejecimiento del polímero, caracterizado por un mantenimiento de los pequeños picos correspondientes a los ciclos formados por pirólisis a partir del comúncico por pérdida de su cadena lateral, y un descenso de los picos correspondientes a esta última sustancia, como consecuencia de un aumento del número de enlaces cruzados en el proceso de fotoenvejecimiento, que propiciaría un descenso en la cantidad de monómeros observable tras la pirólisis.

Este fenómeno parece haber ocurrido en las muestras de copal de Manila inoculadas con microorganismos, por lo que puede afirmarse que el desarrollo de hongos y bacterias sobre el copal de Manila acelera el proceso natural de envejecimiento de su fracción polimérica.

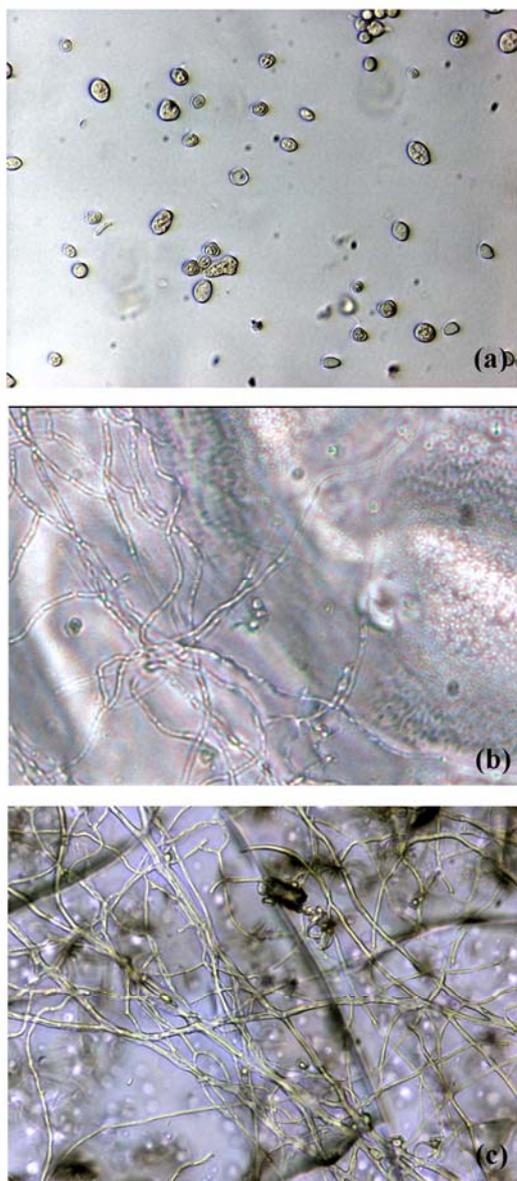
#### 4.3.4 Espectroscopia infrarroja

El análisis mediante espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier no ha mostrado cambios sustanciales en la fracción polimérica de las muestras inoculadas con respecto al patrón en ninguno de los barnices estudiados. La Figura 13 muestra el perfil del espectro FTIR de la resina de sandáracas en ausencia de microorganismos, que se ha mantenido con mínimas variaciones en todas las muestras.

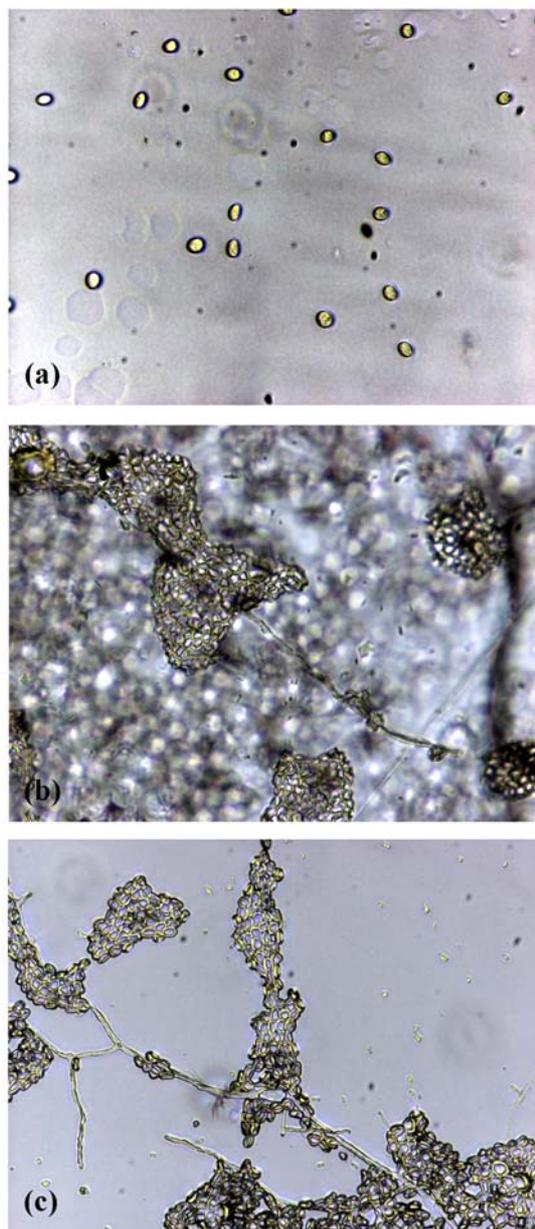
Los principales picos corresponden a los grupos alcohol (3590-3650), y ácido carboxílico (1690-1760), alquenos (3010-3095, 1610-1680) y al enlace C-H tipo alcano del esqueleto hidrocarbonado (2850-2970). La región de la huella digital va de 1500 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . El patrón de Copal de Manila ha resultado ser prácticamente idéntico y tampoco se observan cambios significativos en las muestras inoculadas con hongos y bacterias.



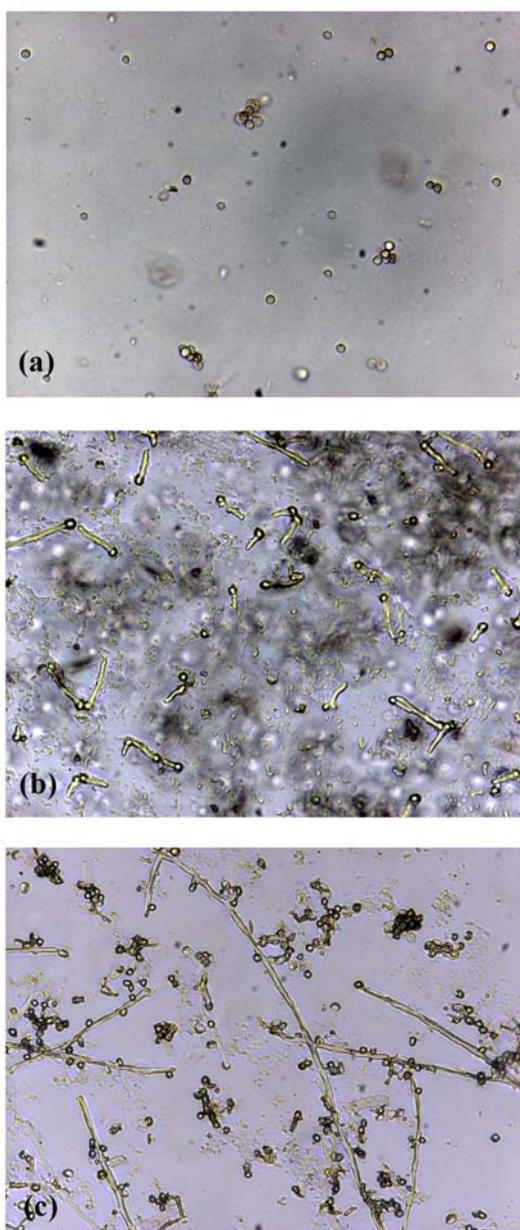
**Figura 13.** Espectro FTIR de las resinas de sandáracas y copal de Manila



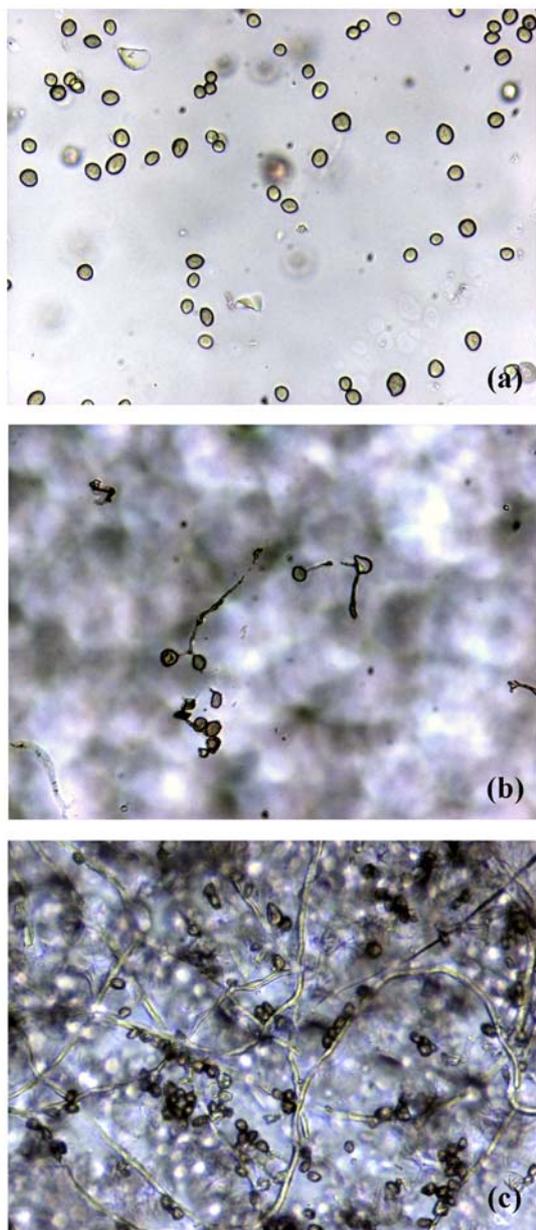
**Figura 14** (a) *Chrysonilia sitophila* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de sandáracas.



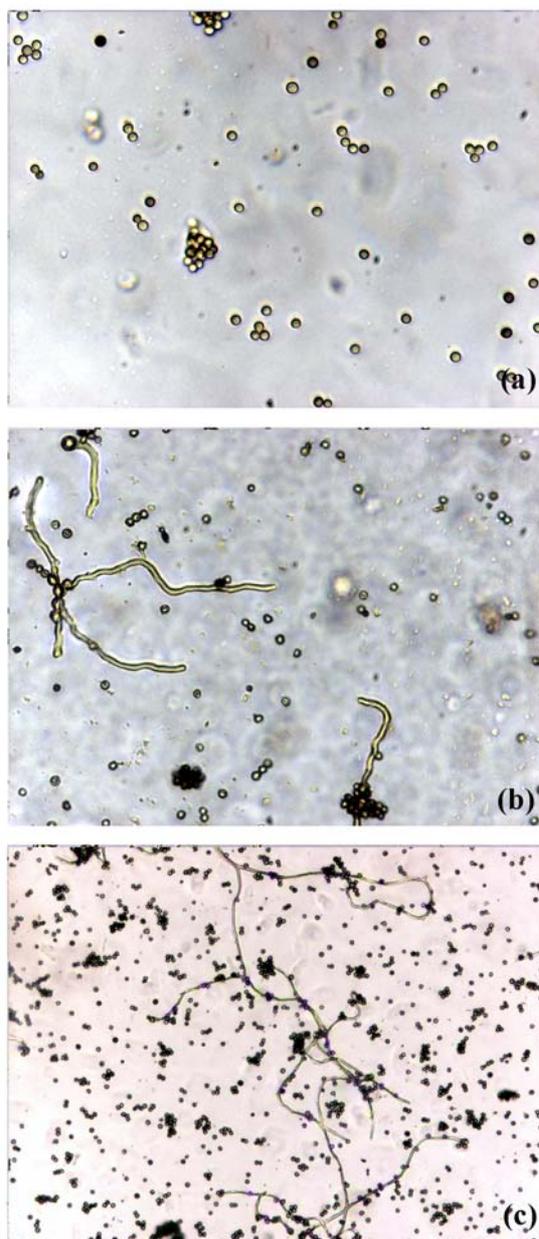
**Figura 15** (a) *Mucor rouxii* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de sandáracas.



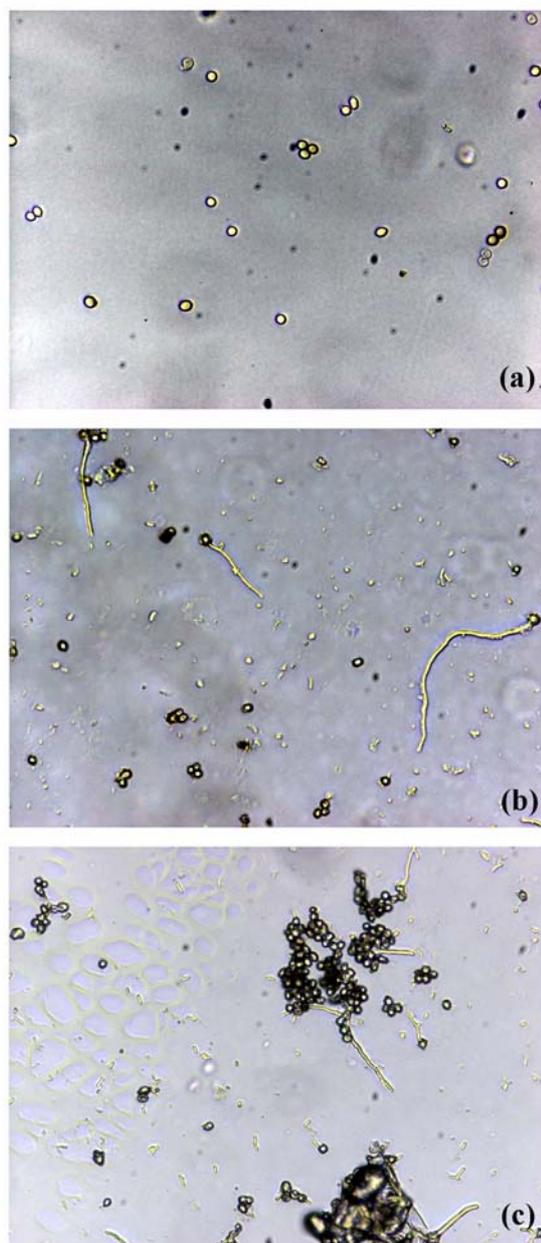
**Figura 16** (a) *Penicillium chrysogenum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de sandáracas.



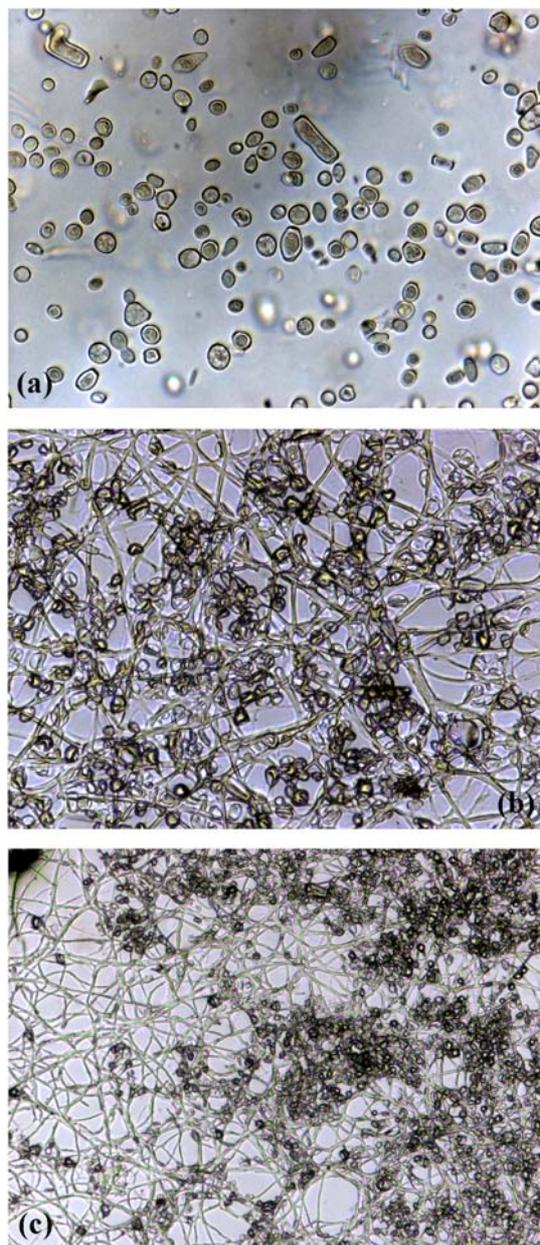
**Figura 17** (a) *Rhizopus oryzae* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de sandáraca.



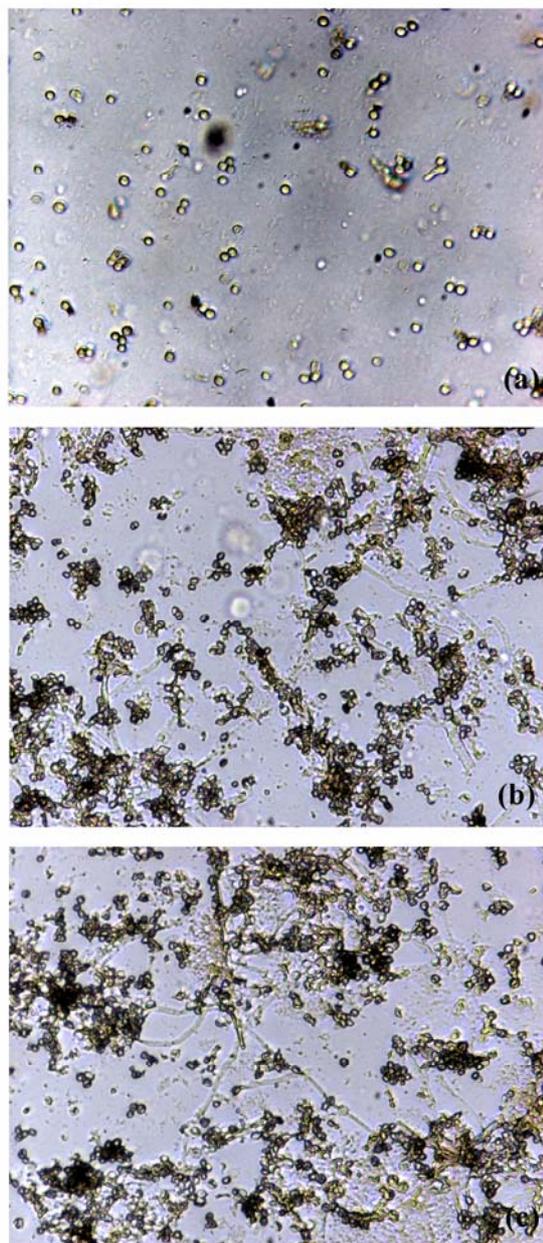
**Figura 18** (a) *Aspergillus niger* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de copal de Manila.



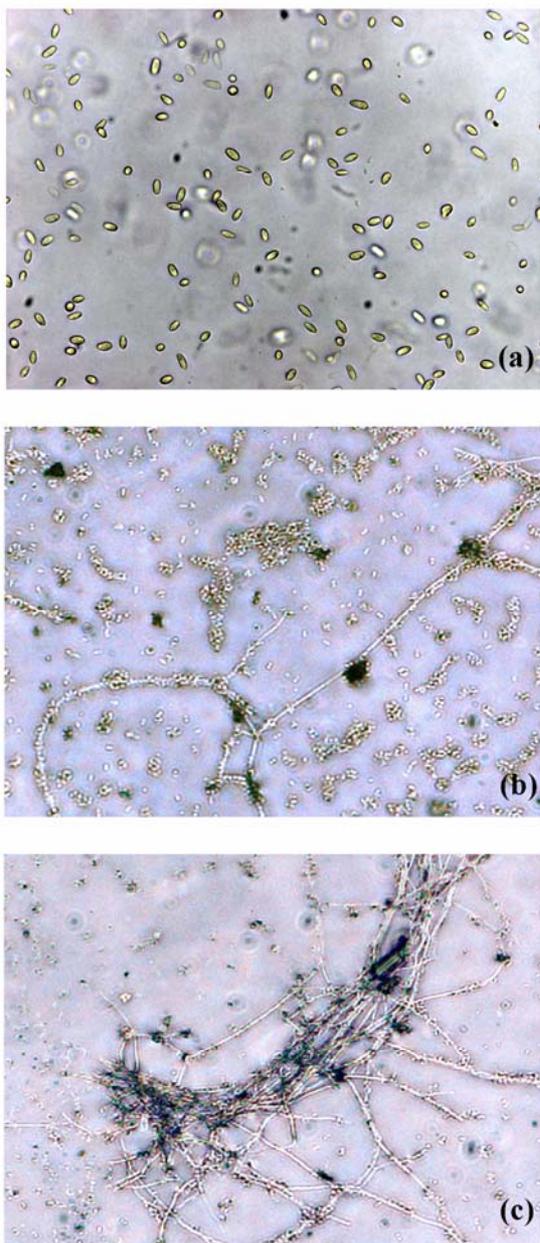
**Figura 19** (a) *Aureobasidium pullulans* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de copal de Manila.



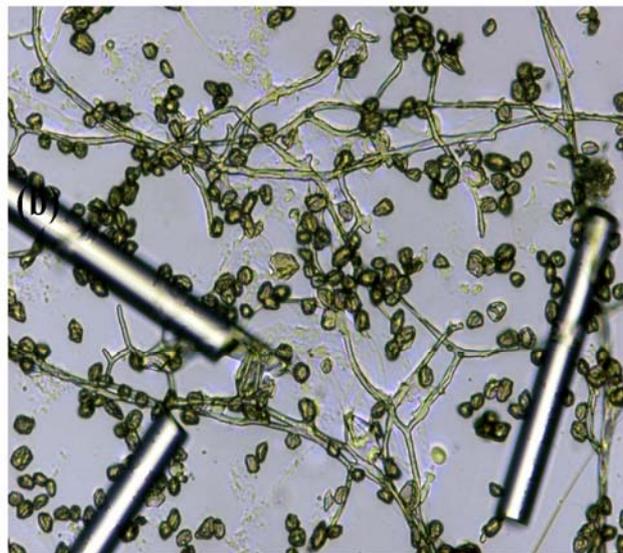
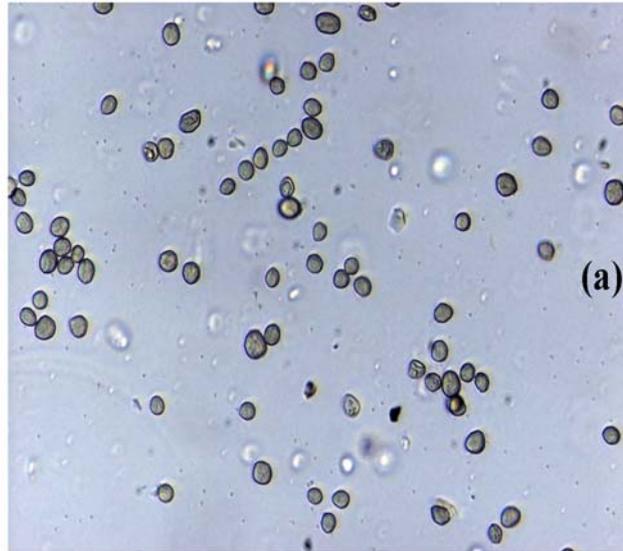
**Figura 20** (a) *Chrysonilia sitophila* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de copal de Manila.



**Figura 21** (a) *Penicillium chrysogenum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de copal de Manila.



**Figura 22** (a) *Phoma herbarum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de copal de Manila.



**Figura 23** (a) *Rhizopus oryzae* (inóculo esporas) y desarrollo a los 5 días de incubación en barniz de copal de Manila (b)

## Referencias

- Agraval OP, Dhawan S, Garg KL (1989). Microbial deterioration of paintings: A review. Intach Conservation Centre, Lucknow, India, pp 1-51.
- Anderson KB (1995). New evidence concerning the structure, composition, and maturation of class I (polylabdanoid) resinates, in Anderson KB, Crelling JC (Eds.), *Amber, resinite and fossil resins*, 617: 105.
- Arai H (2000). Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 181-188.
- Bolívar Galiano FC (1995). Los Agentes de Biodeterioro del Patrimonio Pictórico, Textil y Gráfico. PH. *Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 12: 50-51.
- Bravery AF (1998). Biodeterioration of paint. A state of the art comment. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 466- 485.
- Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (1994). *La biología nel restauro*. Nardini editore, Firenze, pp 92-95.
- Cennini C (1998). *El libro del Arte*. Akal, Madrid, p.141.
- Chiavari G, Fabbri S, Prati S (2002). *Chromatographia* 55: 611
- Ciferri O (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and environmental microbiology* 65 (3): 879-885.
- Clifford DJ, Hatcher PG (1995). Structural transformations of polylabdanoid resinates during maturation. *Org. Geochemistry*, 23 (5): 407-418.
- Dethlefs F, Gerbardtz KO, Stan HJ (1996). Gas Chromatography/Mass Spectrometry of 13 resin acids as their PFB esters. *Journal of Mass Spectrometry*, 31: 1163-1168.
- Doerner M (1998). *Los materiales de pintura y su empleo en el arte*. 1ª ed. Reverté, Barcelona, pp 94-100.
- Giacobini, C, De Cicco MA, Tiglie I, Accardo G (1988). Actinomycetes and Biodeterioration in the Field of Fine Art. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 418-423.
- Giacobini C, Pedica M, Spinucci M (1991). Problems and Future Projects on the Study of Biodeterioration: Mural and Canvas Paintings. In. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International*

*Sandaraca y copal de Manila*

*Conference on the Biodeterioration of Cultural Property. Mc Millan India Ltd, New Delhi. Cap 31, pp 275-286.*

Heim R, Francoise F, Nicot J (1968). "Combatting Moulds Which Develop on Cultural Properties in Tropical Climates." *Conservation of Cultural Properties with Special Reference to Tropical Climates. Lausanne, Switzerland: UNESCO, pp 45-48.*

Inoue M, Koyano M. (1991) Fungal Contamination of Oil Paintings in Japan. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 28: 23-35.

Lin SJ, Short RE, Ford SP, Grings EE, Rosazza ZP (1998). In vitro biotransformations of isocupressic acid by cow rumen preparations: formation of agathic and dihydroagathic acids. *Journal of natural products*, 61(1): 51-56.

Liss SN, Bicho PA, Saddler JN (1997). Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can J Microbiology*, 75: 599–611.

Masschelein-Kleiner L (1992). *Liants, vernis et adhésifs anciens*. Institut Royal du Patrimoine Artistique, Bruxelles, pp 86-100.

Mayer R (1985). *The artist's handbook of materials and techniques*. 1<sup>a</sup> ed. Ed. Blume, Madrid.

Mills JS, White R (1994). *The Organic Chemistry of Museum Objects*. Butterworths, London, pp 99-108.

Montes Estellés RM (1994). Estudio de la contaminación fisicoquímica y microbiológica, en el conjunto patrimonial de la basílica de la virgen de los desamparados de Valencia. *Comunicaciones técnicas, libro segundo. II Congreso Nacional de Medio Ambiente*. Madrid, 21-25 noviembre 1994, pp 23-37.

Osete-Cortina L, Doménech-Carbó MT, Mateo-Castro R, Gimeno-Adelantado JV, Bosch-Reig F (2004). Identification of diterpenes in canvas painting varnishes by gas chromatography–mass spectrometry with combined derivatisation. *Journal of Chromatography A*, 1024: 265-278.

Osete-Cortina L, Doménech-Carbó MT (2005). Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *Journal of Chromatography A*, 1065 (2): 265-278.

Petushkova JP, Lyalikova NN (1986) Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Studies in Conservation*, 31: 65-69.

Ross RT (1963). Microbiology of paint films. *Adv. Appl. Microb*, 5: 217- 234.

Scalarone D, Lazzari M, Chiantore M (2003). Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 68-69: 115-136.

Seves A, Sora S, Ciferri O. (1996). The microbial colonization of oil paintings. A laboratory investigation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 37 (3-4): 215-224.

Seves A, Romano H, Scilione G, Maifreni T, Sora S. (2000). A laboratory investigation of the microbial degradation of cultural heritage (ICMC). In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G (Eds.), *Of microbes and art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, pp 121-133.

Strzelczyk AB (1981). Paintings and Sculptures. In: Rose AH (Ed.), *Microbial deterioration*. Academic Press, London, pp 203-234.

Valentín N (1990). Contaminación biológica en materiales arqueológicos y su erradicación por medio de tratamientos no tóxicos. *Cuadernos del Instituto de Conservación de Bienes Culturales*, Madrid, pp 113-120.

Valentín N, Vaillant M, Guerrero H. (1996). Control integrado de plagas en bienes culturales de países de clima mediterráneo y tropical. *XI Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales*. Castellón, 3-6 octubre. Ed Diputación de Castellón: pp 205-215.

Walsh JH (2001). Ecological considerations of biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48: 16-25.

Wilson AEJ, Edward R, Moore B y Mohn WW (1996). Isolation and characterization of isopimaric acid-degrading bacteria from a sequencing batch reactor. *Applied and environmental microbiology*, 62 (9): 3146-3151.

*Sandáracas y copal de Manila*

---

## 5 Resinas triterpénicas: dammar y almáciga

### 5.1 Introducción

El dammar y el mástic o almáciga son las resinas naturales más ampliamente utilizadas por su escasa tendencia al amarilleo en comparación con los barnices de coníferas, buena solubilidad en disolventes orgánicos comunes y excelentes propiedades ópticas, superiores a las de los más estables barnices sintéticos.

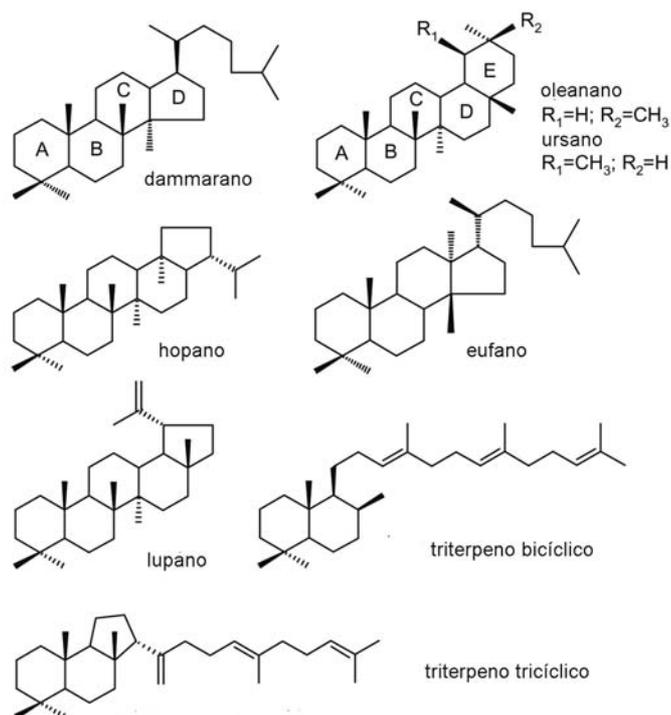
Químicamente son mezclas complejas de sustancias sintetizadas por ciertas plantas a partir del escualeno que presentan un esqueleto de treinta átomos de carbono, predominando básicamente los de tipo tetracíclico y pentacíclico (Figura1) (Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994).

#### 5.1.1 *Dammar*

El barniz de dammar se obtiene de resinas (“dammar” en malayo) originadas por árboles adultos de la familia de las Dipterocarpaceas, fundamentalmente de las especies *Hopea* y *Shorea*, aunque se han descrito más de 300 especies productoras. Las resinas que pueden encontrarse en Europa provienen de Nueva Zelanda, Filipinas y especialmente Malasia e Indonesia. El dammar es producido de forma natural por las plantas, pero suele extraerse mediante incisión, llegando una planta adulta a producir en una cantidad de hasta 20-30 kg por año. La calidad del producto varía según el tamaño de los fragmentos de resina, su transparencia y contenido en impurezas, denominándose dammar “mata kuching” (ojo de gato) al de clase superior. Resulta también frecuente el uso de nombres asociados a los puertos desde

## Dammar y almáciga

los que se exporta (Batavia, Padang y Singapur), siendo el más caro y mejor considerado el llamado Batavia Grado A (Mayer 1985; Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994).



**Figura 1** Principales grupos de triterpenos de las resinas de dammar y almáciga

Es un producto de popularidad relativamente reciente, que se emplea en Occidente a partir de la segunda mitad del siglo XIX, si bien su uso como material artístico es muy amplio, ya que está considerado como el mejor barniz de origen natural. Forma películas muy brillantes, lo que en determinadas épocas o para los gustos de ciertos artistas ha sido considerado un inconveniente, que puede solventarse añadiendo una pequeña cantidad de cera de abejas para aligerarlo, o bien mediante preparación en caliente, que produce barnices de tono mate (Mayer 1985).

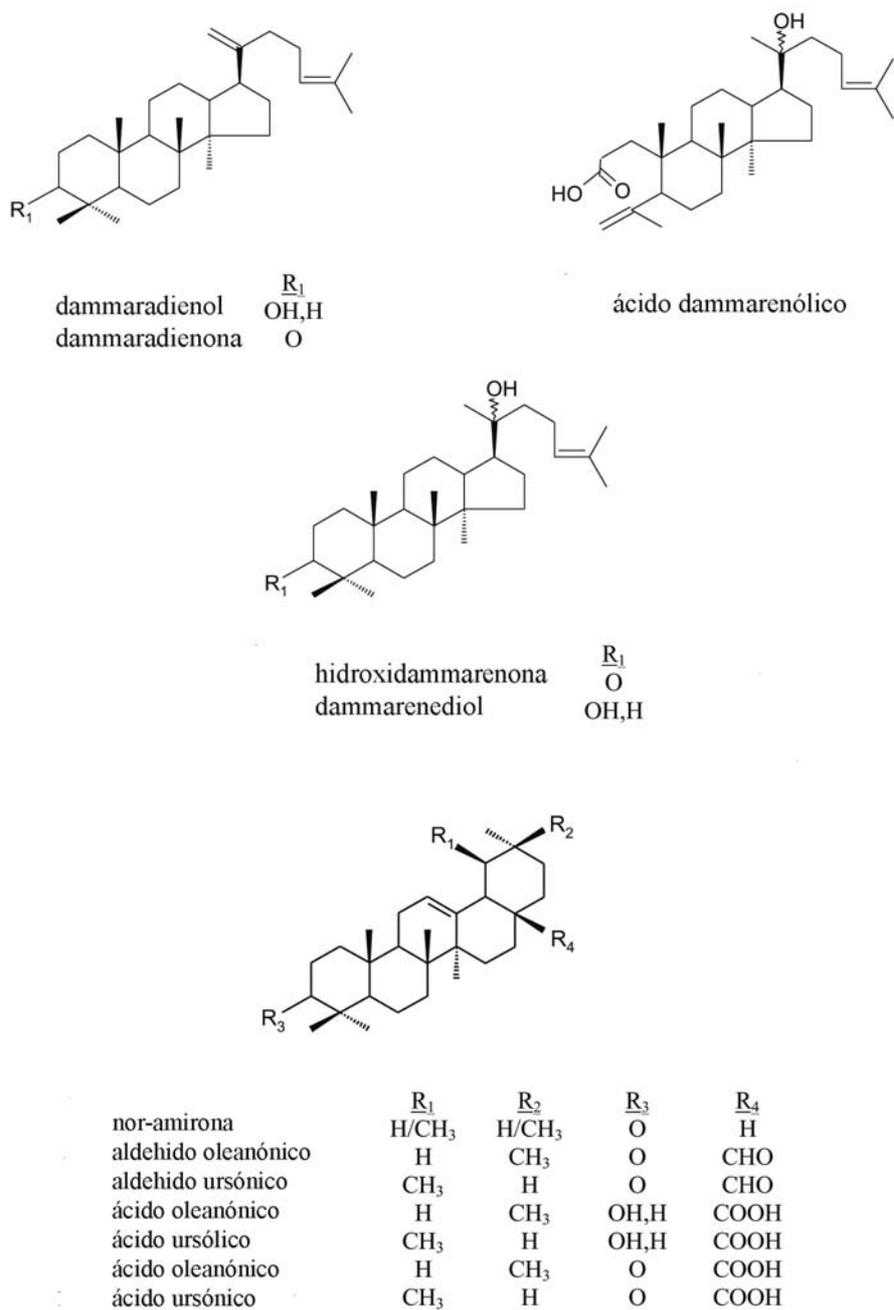


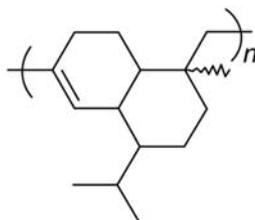
Figura 2 Principales triterpenos presentes en la resina de dammar

## Dammar y almáciga

### Química

El dammar es soluble en trementina, white spirit y sustancias aromáticas. Presenta una gran capacidad adhesiva y una baja acidez. A pesar de la variabilidad botánica de su procedencia, los productos comercializados como dammar presentan una composición básica común (Figura 2): triterpenos tetracíclicos de la serie de los dammaranos (dammaradienol, dammaradienona, ácido dammarenólico), y una cantidad menor de triterpenos pentacíclicos derivados del oleanano (ácido oleanónico) y del ursano, como el ácido ursónico y su correspondiente aldehído, el ursonaldehído (Masschelein-Kleiner 1992, Mills & White 1994).

Presenta también una pequeña cantidad de sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) y una fracción apolar, no soluble en alcohol, constituida por un polímero hidrocarbonado denominado β-resene (la parte soluble en alcohol era llamada antiguamente α-resene), que ha sido empleada en la preparación del famoso barniz Vibert (Mills & White 1994). Su estructura química (Figura3) ha sido identificada como policadieno (Van Aarssen *et al.* 1990).



**Figura 3.** Estructura molecular del policadieno

### 5.1.2 Almáciga

La almáciga se extrae de un arbusto frecuente en la costa mediterránea, el lentisco (*Pistacia lentiscus*, Figura 4), de la familia de las Anacardiáceas. La variedad más apreciada es la obtenida de la subespecie *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, que proviene de la isla griega de Chios. Otras plantas productoras de resina son *Pistacia khinjuk* Stocks y *Pistacia cabulica* Stocks, que dan el mástic indio o de Bombay, y las *Pistacia atlantica* y *terebinthus*, de las que se extrae la trementina de Chios, de amplio uso en la antigüedad y de propiedades a medio camino entre el barniz de

almáciga y la trementina de pino. La resina se extrae por incisiones en el tronco de la planta, produciendo un arbusto completamente desarrollado alrededor de 1 kg. por año (Mayer 1985; Masschelein-Kleiner 1992; Mills & White 1994).



**Figura 4.** *Pistacia lentiscus*

La almáciga, por ser un producto mediterráneo, viene siendo empleada desde muy antiguo, estando documentado su empleo desde la Edad del Bronce para usos tan variados como la fabricación de vasijas o la técnica de preparación de las momias egipcias. Las primeras recetas eran mezclas preparadas en caliente con trementina o alcohol, en las que frecuentemente entraban otros componentes como el aceite de linaza, la resina de sandáraca o la colofonia (Mayer 1985; Doerner 1998). El mástic también se ha utilizado frecuentemente durante los siglos XVIII y XIX como *media* aglutinante mezclado con aceite de linaza (melgip). Sin embargo, hoy se desaconsejan estas formulaciones, ya que pese a sus calidades materiales producen a medio plazo todo tipo de defectos en la película pictórica, que se ve afectada por grietas, ampollas y oscurecimientos (Mayer 1985). Con la aparición en el mercado de la resina de dammar en torno a 1830, considerada siempre de mayor calidad por su superior dureza y resistencia y menor tendencia a la eflorescencia y al amarilleo, el uso del mástic se ha restringido bastante. Sin embargo, su uso medicinal resulta cada vez más importante, como así lo refleja el gran número de publicaciones científicas relativas a sus aplicaciones como antitumoral, antiulceroso y modulador inmunitario (Aksoy *et al.* 2006, entre otros).

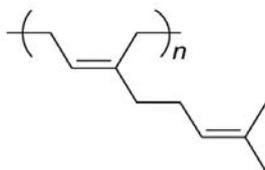
## Dammar y almáciga

### Química

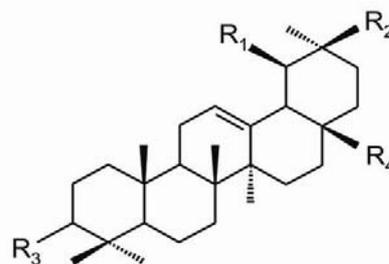
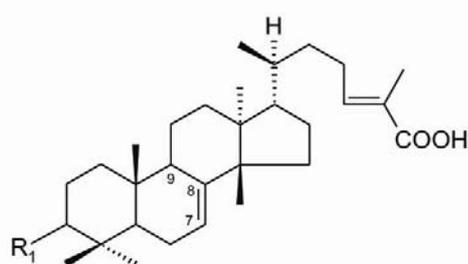
Soluble en disolventes aromáticos y trementina, pero solo escasamente en aceites minerales, el barniz de dammar se prepara en frío, mezclando la resina con trementina o white spirit.

Su composición es similar a la del dammar, si bien incluso más compleja y peor conocida. Los triterpenos preponderantes son pentacíclicos de la serie del oleanano, como los derivados de la amirona, el ácido oleanónico, y su isómero el ácido morónico (Figura 5). Este último compuesto resulta bastante estable y suele considerarse un marcador de la presencia del barniz de almáciga. Asimismo, son importantes los tetraciclos de estructuras tipo eufano y dammarano, como la hidroxidammarenona, el ácido masticadienónico y su isómero, el ácido isomasticadienónico. También se ha descrito la presencia de diversos triterpenos bicíclicos y tricíclicos (Masschelein-Kleiner 1992, Mills & White 1994, Papageorgiou *et al.* 1997; Van der Doelen 1999; Assimoupoulou & Papageorgiou 2005 a,b).

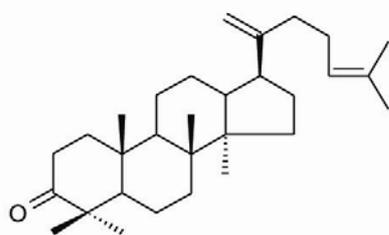
Como en el dammar, también es destacable la presencia de una pequeña fracción polimérica apolar (aproximadamente un 2% del total) compuesta (Van den Berg *et al.* 1998) por sustancias hidrocarbonadas del tipo *cis*-1,4-poli- $\beta$ -mirceno (Figura 6).



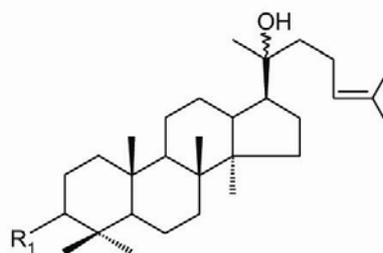
**Figura 6.** Estructura molecular del *cis*-1,4-poli- $\beta$ -mirceno



	<u>R<sub>1</sub></u>		<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>
ácido masticadienoico	O	amirina	H/CH <sub>3</sub>	H/CH <sub>3</sub>	OH,H	CH <sub>3</sub>
ácido isomasticadianoico	O	amirona	H/CH <sub>3</sub>	H/CH <sub>3</sub>	O	CH <sub>3</sub>
ácido masticadienólico	OH,H	nor-amirina	H/CH <sub>3</sub>	H/CH <sub>3</sub>	OH,H	H
ácido 3-O-acetil -2-epi isomasticadienoico	CH <sub>3</sub> COO	nor-amirona	H/CH <sub>3</sub>	H/CH <sub>3</sub>	O	H
		aldehido oleanónico	H	CH <sub>3</sub>	O	CHO
		ácido oleanólico	H	CH <sub>3</sub>	OH,H	COOH
		ácido oleanónico	H	CH <sub>3</sub>	O	COOH
		ácido morónico <sup>1</sup>	H	CH <sub>3</sub>	O	COOH



dammaradienona



hidroxidammarenona R<sub>1</sub>  
O  
3-acetoxi-hidroxidammarenona CH<sub>3</sub>COO

<sup>1</sup> En el ácido morónico el doble enlace se localiza en C18

**Figura 5.** Principales triterpenos de la resina de almáciga

### *5.1.3 Procesos de deterioro*

Las resinas triterpénicas se alteran con el paso del tiempo. Los procesos de envejecimiento van ocurriendo de fuera a dentro de la capa de barniz y cambian sustancialmente su composición y propiedades.

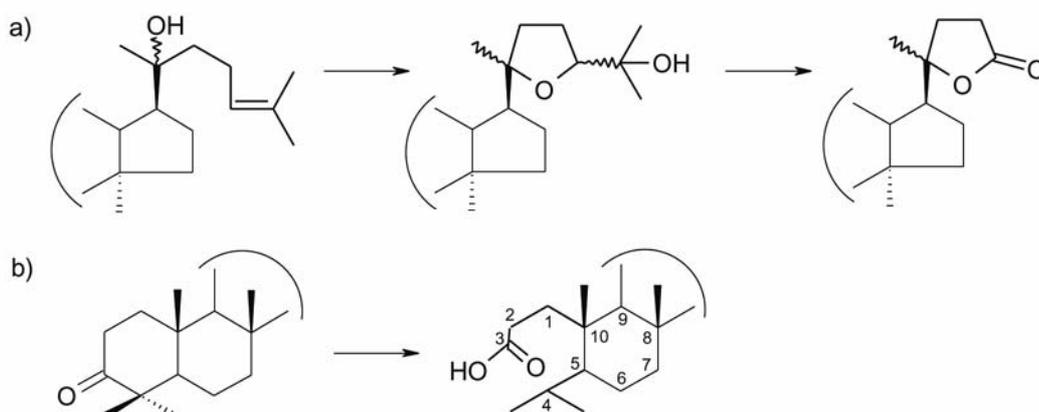
Las principales alteraciones físicas son de color, especialmente el amarilleo, más acusado en el caso del mástic, y el incremento de la fragilidad y opacidad en procesos de microfractura conocidos como “pasmados” del barniz. A nivel químico, el análisis de los procesos de envejecimiento resulta especialmente dificultoso por la complejidad de su composición, su variabilidad y frecuentemente por la interferencia de otras sustancias dependiendo de las recetas de preparación utilizadas.

No se ha encontrado bibliografía dedicada a la transformación de estas sustancias por microorganismos, a excepción del estudio realizado por nuestro grupo de investigación para la resina de almáciga (Doménech-Carbó *et al.* 2006), existiendo únicamente estudios analíticos de barnices envejecidos naturalmente en obras de arte (Van Doelen *et al.* 1998 b; Colombini *et al.* 2000) o mediante tratamientos “in vitro” con radiaciones, que cuentan con la limitación de abarcar sólo un factor del proceso real (De la Rie 1998; Van der Doelen 1998 a; Van der Doelen & Boon 2000).

Estos trabajos indican que la composición hidrocarbonada y la presencia de dobles enlaces hacen a estas sustancias susceptibles de sufrir procesos de oxidación, iniciados generalmente con la absorción de luz ultravioleta o de energía térmica proporcionada por una fuente externa, o bien por la presencia de oxidantes ambientales como el ozono. Como consecuencia, se forman dos tipos de productos: terpenos oxidados, más polares, y compuestos polimerizados a través de mecanismos radicalarios.

#### *5.1.3.1 Reacciones de oxidación*

Esquemáticamente, podemos distinguir entre los procesos oxidativos que afectan a las moléculas con esqueleto dammarano (tetracíclicas) y a las moléculas de tipo oleanano/ursano (pentacíclicas). Los dammaranos se oxidan principalmente en la cadena lateral, siendo frecuentes las reacciones de adición electrofílica sobre dobles enlaces, con formación de alcoholes que en muestras muy envejecidas evolucionan a estructuras de tipo lactónico o epóxido (Figura 7a). También se ha descrito la oxidación (Figura 7b) del grupo cetónico en C-3 hasta ácido carboxílico, con apertura del primer anillo del tetraciclo (Van der Doelen *et al.* 1998 a; Van der Doelen, 1999; Van der Doelen & Boon 2000).

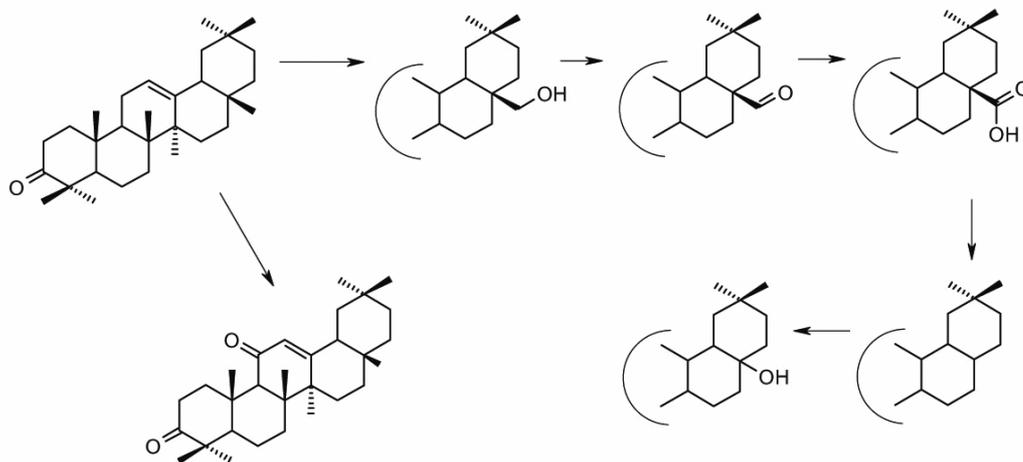


**Figura 7.** Principales procesos oxidativos en triterpenos de tipo dammarano.

Los triterpenos de tipo oleanano y ursano, pentacíclicos, se oxidan en ciertas posiciones preferentes como la C-28, produciendo al inicio derivados hidroxilados y posteriormente aldehídos o ácidos carboxílicos. Otros procesos descritos son la descarboxilación en C-28, la hidroxilación en C-17 o la oxidación (Figura 8) en C-11 hasta cetona (Van der Doelen *et al.* 1998 a; Van der Doelen 1999; Van der Doelen & Boon 2000).

La formación de sustancias oxidadas incrementa la polaridad de los barnices, requiriendo el empleo de disolventes cada vez más polares para su eliminación que pueden afectar a la película pictórica. También tiene efectos de cara al comportamiento mecánico del barniz, ya que la interacción entre moléculas polares es mayor por formación de puentes de hidrógeno, fenómeno que puede verse interrumpido en presencia de humedad y producir cambios físicos como craquelados o pasmosos (Van der Doelen 1998 a).

Es también importante destacar que en muestras muy envejecidas pueden darse procesos de oxidación y degradación mucho más fuertes, que llevan a la rotura de enlaces y a la pérdida del esqueleto triterpénico, con formación de productos de bajo peso molecular y descenso en la cantidad de triterpenos libres (Van der Doelen *et al.* 1999; Van der Doelen & Boon 2000).



**Figura 8.** Principales procesos oxidativos en triterpenos pentacíclicos.

### 5.1.3.2 *Procesos de polimerización*

Estudios cuantitativos por GC-MS empleando un estándar interno (hexadecano) muestran que la cantidad total de triterpenos decrece con el paso del tiempo, mientras que aumenta el contenido en productos de alto peso molecular (De la Rie 1998; Van der Doelen 1999; Van der Doelen & Boon 2000).

Estas sustancias se forman por mecanismos radicalarios, iniciados mediante procesos oxidativos sobre los dobles enlaces que llevan a la formación de radicales peróxido, muy inestables, que evolucionan a radicales alquílicos altamente reactivos. Dichos radicales interaccionan entre sí a través de enlaces cruzados de carácter covalente, con la consiguiente polimerización y generación de productos de alto peso molecular. Estudios realizados por HPLC sugieren que el amarilleo del dammar y la almáciga se deben a la formación de estas sustancias, ya que los triterpenos libres oxidados no muestran absorbancia en el UV-VIS (Van der Doelen 1998a).

## 5.2 Material y métodos

### 5.2.1 Barnices

Los barnices se prepararon a partir de resinas de mástic de Chios y dammar blanco a trozos grandes de primera calidad, suministradas por Caremi Pigmentos (Sevilla, España) disueltas en esencia de trementina rectificada (Titán). Las proporciones empleadas han sido la receta correspondiente al barniz de corte de 5 libras, a razón de 175 g de resina por 300 ml de esencia de trementina (Mayer 1985).

### 5.2.2 Microorganismos estudiados

Mediante amplia revisión de la bibliografía existente acerca del biodeterioro de bienes culturales (Ross 1963; Heim *et al.* 1968; Strzelczyk 1981; Giacobini *et al.* 1983; Bravery 1988; Agraval *et al.* 1989; Valentín 1990; Giacobini *et al.* 1988,1991; Inoue & Koyano 1991; Caneva *et al.* 1994; Montes Estellés 1994; Bolívar 1995; Petushkova & Lyalikova 1986; Seves *et al.* 1996; Valentín *et al.* 1996; Ciferri, 1999; Arai 2000; Walsh 2001, entre otros) se han seleccionado para el estudio los siguientes microorganismos, todos ellos procedentes de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo-CECT:

#### Hongos

*Aspergillus niger* (An) (CECT-2088, ATCC 9029), *Aureobasidium pullulans* (Au) (CECT-2703, ATCC 9348), *Cladosporium cladosporioides* (Cc) (CECT 2110, ATCC 16022), *Penicillium chrysogenum* (Pc) (CECT-2306, ATCC 8537), *Rhizopus oryzae* (Ro) (CECT-2339, ATCC 11145), *Mucor rouxii* (Mr) (CECT-2655, ATCC 24905), y *Trichoderma pseudokoningii* (Tp) (CECT-2937)

#### Bacterias

*Streptomyces cellulofans* (Sc) (CECT-3242 ATCC 29806), *Bacillus amyloliquefaciens* (Ba) (CECT-493, ATCC 23842) y *Arthrobacter oxydans* (Ao) (CECT-386, ATCC 14358)

Se han incluido también en el estudio cuatro hongos procedentes de las obras pictóricas del Museo de Bellas Artes de Granada “Alegoría de la muerte” (P. Toma) y “S. Francisco de Asís” (autor desconocido) del siglo XVII, muy afectadas por procesos de biodeterioro. Los microorganismos han sido identificados como *Aspergillus versicolor*, *Phoma herbarum*, *Chrysonilia sitophila* y *Cladosporium* sp.

### 5.2.3 Preparación de las muestras

#### 5.2.3.1 Soportes de cultivo

Se han empleado portaobjetos de vidrio de tamaño estándar (24x80mm), barnizados a pincel con las resinas estudiadas en tres capas finas sucesivas, que imitan las características de una superficie barnizada pero eliminan las posibles interferencias que causan los materiales orgánicos que podemos encontrar en obras de arte reales. Los soportes así preparados se han dejado secar en oscuridad durante 90 días.

#### 5.2.3.2 Obtención de esporas fúngicas

Los liofilizados de cepas de colección se rehidrataron en medio de cultivo líquido CM (extracto de levadura 5g, extracto de malta 5g, glucosa 10g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 4.5), y se incubaron durante 48h a temperatura de 28°C y humedad relativa del 75%. Transcurrido este tiempo, se inocularon en medio sólido agar malta, de Oxoid (extracto de malta 30g, peptona micológica 5g, agar 15g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 5.4). Cultivos con crecimiento sugestivo de esporulación se resuspendieron en 2 ml de Tween 80 (Aldrich) 0,1%. Tras dos ciclos de lavado/centrifugación, los pellets fueron resuspendidos en 2 ml de agua destilada y filtrados a través de lana de vidrio para eliminar cualquier resto de micelio. Se obtuvieron así suspensiones puras de esporas en agua destilada. Tras recuento en cámara de Neubauer, éstas se ajustaron a la concentración de 10<sup>6</sup> esporas/ml.

#### 5.2.3.3 Obtención de suspensiones bacterianas.

Los liofilizados de cepas de colección se rehidrataron en medio de cultivo líquido TSB (digerido pancreático de caseína 17g, digerido papaínico de harina de soja 3g, NaCl 5g, fosfato potásico dibásico 2.5 g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 7.3), sembrándose a las 48 horas de incubación en medio de cultivo sólido TSA, de Oxoid (triptona 15g, peptona de soja 5g, NaCl 5g, agar 15g, H<sub>2</sub>O 1l, pH 7.3), con la excepción de *Streptomyces cellulofans*, inoculado en agar patata, de Oxoid (extracto de patata 4g, dextrosa 20g, agar 15 g H<sub>2</sub>O 1l, pH 5.6). A partir de estos cultivos se prepararon inóculos en medio TSB, y se mantuvieron 24 horas en incubación. Después se centrifugaron y lavaron con agua destilada para eliminar cualquier posible resto de medio de cultivo y se resuspendieron en agua destilada. Mediante curva de crecimiento los inóculos se ajustaron a 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> células/ml.

#### *5.2.3.4 Inoculación de microorganismos en los soportes y cultivo*

Por cada hongo se inoculó un portaobjetos con dos gotas de 75 microlitros (con una superficie de alrededor de 1 cm<sup>2</sup> por gota), a concentración 10<sup>6</sup> esporas/ml. Por cada bacteria se inoculó un portaobjetos con dos gotas de 75 microlitros, ambas a la misma concentración, de las suspensiones descritas en el apartado anterior. Las condiciones de cultivo, para hongos y bacterias, fueron 28°C de T<sup>a</sup> y humedad relativa del 75% durante 15 días en oscuridad.

#### *5.2.4 Técnicas de análisis*

##### *5.2.4.1 Control de crecimiento*

Se ha realizado un seguimiento microscópico a los cultivos fúngicos, con el fin de estudiar la producción de micelio a partir de la suspensión inicial de esporas en agua destilada. Todos los cultivos fúngicos fueron observados a tiempo cero, 24 horas, 48 horas, cinco, diez y quince días con un microscopio Nikon Eclipse TS100 equipado con cámara digital Nikon DS-5M.

##### *5.2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)*

Tras el período de incubación, las muestras correspondientes a los patrones, hongos con crecimiento y bacterias se obtuvieron raspando la superficie del barniz con un bisturí estéril, obteniéndose una cantidad aproximada de 5 mg por muestra. Se incluyó también un control sin microorganismos (portaobjetos barnizado e inoculado sólo con agua destilada), incubado en idénticas condiciones que el resto de muestras y dos controles inoculados con esporas fúngicas (*A.niger*) y bacterias (*A. oxydans*) muertas en autoclave. La derivatización se realizó con el agente transesterificador Meth. Prep. II (Alltech), compuesto de hidróxido de m-trifluorometil-fenil-trimetil amonio, que permite obtener los ésteres metílicos de los ácidos carboxílicos existentes en la muestra, y posteriormente se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas con el fin de estudiar los cambios en la composición.

El análisis se llevó a cabo con un sistema integrado compuesto por un cromatógrafo de gases Carlo Erba serie 8000 modelo 8060 (Thermo Instruments, USA) acoplado con un espectrómetro de masas Platform II (Waters, USA).

Para la cromatografía gaseosa se empleó una columna capilar HP-1 MS (fase estacionaria metilpolisiloxano, 30 m x 0.25 mm I.D x 0.25 µm de espesor). Las condiciones cromatográficas han sido: temperatura inicial de 120°C, e incremento a razón de 10°C/min hasta 300°C e isoterma durante 20 min. El gas portador fue Helio,

con un flujo de 1.2 ml/min y una presión de 14 Psi. Las muestras se inyectaron en modo splitless.

Para el análisis mediante espectrometría de masas, se usó una fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV). El rango de escaneo ha sido de m/z 50 a 500, con ciclos de 1s. El software utilizado en la adquisición y procesamiento de las muestras fue MassLynx v.4.0. Los espectros de masas se han adquirido en el modo total ion monitoring mode (Full Scan) y se ha empleado el área de los distintos picos aparecidos en el TIC para obtener información cuantitativa. Las temperaturas de la interfase y de la fuente de iones han sido respectivamente de 300 °C y 210 °C. Para la identificación de compuestos se ha usado la librería de espectros de masas Wiley, así como bibliografía especializada.

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Control de crecimiento

Solamente tres hongos han conseguido desarrollarse sobre el barniz a partir del inóculo original de esporas. En ambos barnices han sido los mismos: *C. sitophila*, *P. chrysogenum* y *P. herbarum* (Tabla 1 y Figuras 20-25). En ningún caso se observaron cambios significativos en los cultivos más allá de los cinco días de incubación.

	18 HORAS	48 HORAS	5 DIAS
<i>A. niger</i>	-	-	-
<i>A. pullulans</i>	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	-	-	-
<i>C. sitophila</i>	+	++	++
<i>C. cladosporioides</i>	-	-	-
<i>Cladosporium sp</i>	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	+	+	+
<i>P. herbarum</i>	+	+	++
<i>R. oryzae</i>	-	-	-
<i>M. rouxii</i>	-	-	-
<i>T. pseudokoningii</i>	-	-	-

**Tabla 1.** Crecimiento de los hongos estudiados en los barnices de dammar y almáciga (no crecimiento; + desarrollo escaso; ++ desarrollo)

### 5.3.2 Cromatografía de gases/ espectrometría de masas

En el análisis por GC/MS la cantidad relativa de cada uno de los ácidos con respecto a los demás se ha expresado en área de pico normalizada  $N_i$ , definida como porcentaje de área correspondiente a cada componente en relación al área total:

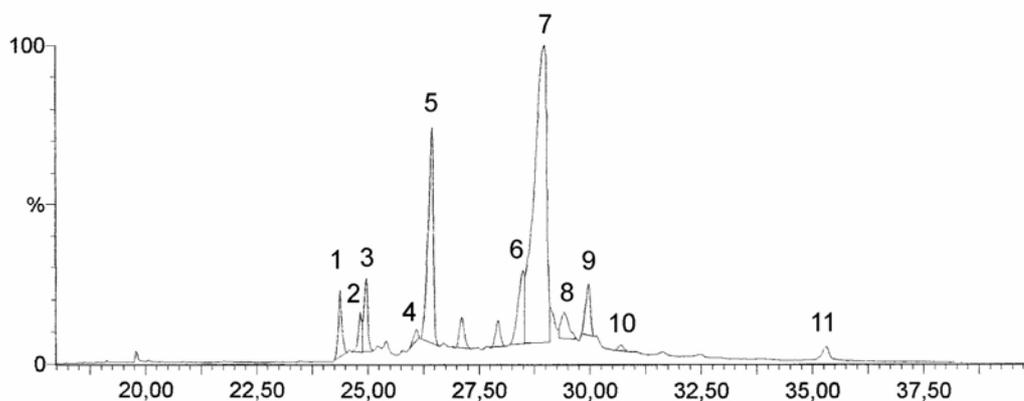
$$N_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100$$

Donde  $A_i$  es el pico de área de cada uno de los  $n$  compuestos encontrados en el cromatograma. Un control inoculado sólo con agua destilada e incubado en idénticas condiciones, ha sido también analizado para obtener el patrón de composición de los barnices en ausencia de microorganismos. Para cuantificar los cambios en la composición se ha establecido el parámetro  $\Delta N_i$ , definido como el incremento o disminución de  $N_i$  para cada analito en relación a los valores correspondientes a la muestra patrón  $N_{i0}$ .

$$\Delta N_i = N_i - N_{i0}$$

### 5.3.2.1 Dammar

En la resina de dammar patrón (no inoculada con microorganismos) se han identificado los siguientes componentes (Figura 9 y Tabla 2):



**Figura 9.** Cromatograma correspondiente al patrón de dammar. (1) Dammaradienona (3-oxo-dammara-20(21),24-dieno) y Nor- $\beta$ -amirona (3-oxo-28-nor-olean-12-eno); (2) Dammaradienol (3 $\beta$ -hidroxi-dammara-20,24-dieno); (3) Nor- $\alpha$ -amirona (3-oxo-28-nor-urs-12-eno); (4) Ácido 20,24-epoxi-25-hidroxi-3,4-seco-4(28)-dammaren-3-oico, metil éster; (5) Ácido dammarenólico (ácido 20-hidroxi-3,4-seco-4(28),24-dammaradien-3-oico, metil éster; (6) Ácido oleanónico (ácido 3-oxo-olean-12-en-28-oico), metil éster; (7) Hidroxidammarenona (20-hidroxi-24-dammaren-3-ona); (8) Aldehído oleanónico (3-oxo-olean-12-en-28-al); (9) Ácido ursónico (ácido 3-oxo-12-ursen-28-oico), metil éster; (10) Aldehído ursónico (3-oxo-urs-12-en-28-al); (11) Hidroxihopanona (21 $\beta$ , 22-hidroxi-3-hopanona)

La identificación de los compuestos se ha realizado según la base de datos de espectros de masas Wiley Mass Spectra Library (L) y los espectros publicados (R) en bibliografía (Van der Doelen *et al.* 1998 a,b; Van der Doelen 1999; Van der Doelen & Boon 2000). La pequeña fracción polimérica no es analizable mediante GC-MS por lo que sólo se han obtenido datos correspondientes a la fracción triterpénica de los barnices. Los principales patrones de fragmentación (Anexo 3) aparecen resumidos en la Tabla 3.

**Tabla 2.** Principales compuestos identificados mediante GC-MS en dammar

Nº	$t_R$	Compuesto	Pm	ID
<b>1</b>	24.38	Dammaradienona	424	R
	24.38	Nor- $\beta$ -amirona	410	R
<b>2</b>	24.84	Dammaradienol	426	R
<b>3</b>	24.96	Nor- $\alpha$ -amirona	410	R
<b>4</b>	26.10	Ácido 20,24-epoxi-25-hidroxi-3,4-seco-4(28)-dammaren-3-oico, metil éster	488	R
<b>5</b>	26.45	Ácido dammarenólico, metil éster	472	R
<b>6</b>	28.49	Ácido oleanónico, metil éster	468	L
<b>7</b>	28.98	Hidroxidammarenona	442	R
<b>8</b>	29.41	Aldehído oleanónico	438	R
<b>9</b>	29.98	Ácido ursónico, metil éster	468	R
<b>10</b>	30.69	Aldehído ursónico	438	R
<b>11</b>	35.25	Hidroxihopanona	442	R

( $t_R$ : tiempo de retención; Pm = peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley Mass Spectra Library; R, Referencias)

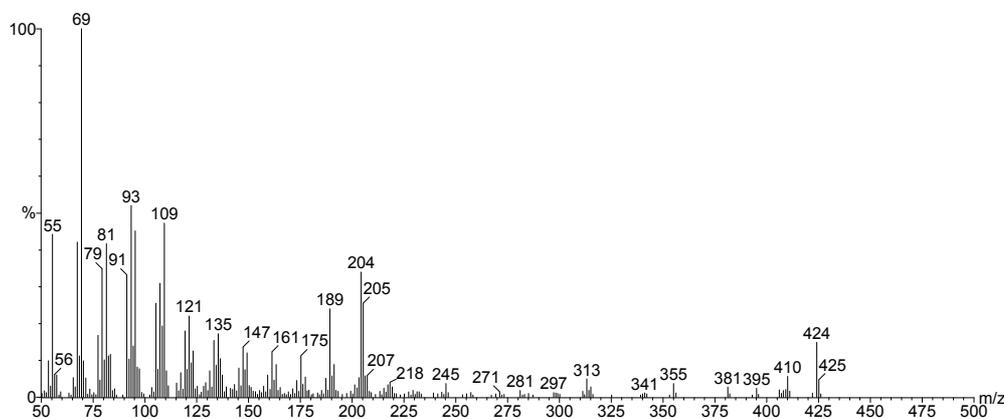
**Tabla 3.** Patrones de fragmentación por espectroscopia de masas de los triterpenos más abundantes en dammar

Nº	Compuesto	Pm	Iones característicos (m/z)
<b>1</b>	Dammaradienona	424	424, 205, 109
<b>2</b>	Nor- $\beta$ -amirona	410	410, 204
<b>3</b>	Dammaradienol	426	426, 408, 207, 189, 109
<b>4</b>	Nor- $\alpha$ -amirona	410	410, 204
<b>5</b>	Ácido 20,24-epoxi-25-hidroxi-3,4-seco-4(28)dammaren-3-oico, metil éster	488	470, 143, 125
<b>6</b>	Ácido dammarenólico, metil éster	472	454, 385, 109
<b>7</b>	Ácido oleanónico, metil éster	468	468, 262, 203
<b>8</b>	Hidroxidammarenona	442	424, 355, 205, 109
<b>9</b>	Aldehído oleanónico	438	438, 232, 203
<b>10</b>	Ácido ursónico, metil éster	468	468, 262, 203, 133
<b>11</b>	Aldehído ursónico	438	438, 232, 203
<b>12</b>	Hidroxihopanona	442	442, 424, 409, 384, 207, 189, 149

## Dammar y almáciga

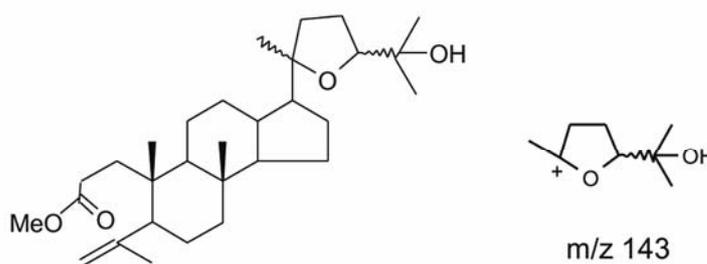
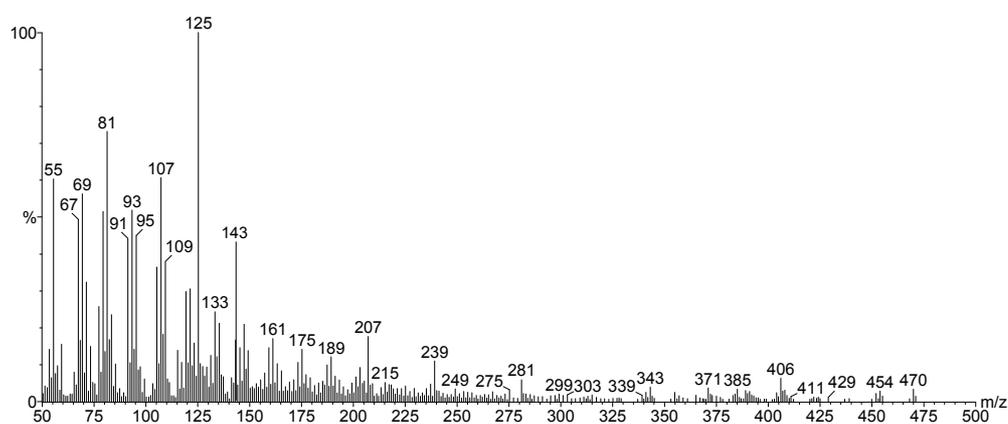
Los componentes más importantes encontrados en el barniz original son los triterpenos tetracíclicos hidroxidammarenona (Ni=55.81%), ácido dammarenólico (Ni=16.33%) dammaradienol, dammaradienona, y los pentaciclos nor-amirona (en sus formas  $\alpha$  y  $\beta$ , que difieren en la posición de un metilo), ácido oleanónico y ácido ursónico.

A  $t_R=24.38$  coeluyen la dammaradienona y la nor- $\beta$ -amirona, como puede observarse en el espectro de masas (Figura 10), en el que aparecen los principales picos asociados a estos dos compuestos ( $m/z=424$ , 205 y 109 en dammaradienona, y  $m/z=410$  y 204 en nor- $\beta$ -amirona).



**Figura 10.** Espectro de masas del pico cromatográfico correspondiente a la coelución de la dammaradienona y nor- $\beta$ -amirona

El ácido 20,24-epoxi-25-hidroxi-3,4-seco-4(28)-dammaren-3-oico, que eluye a  $t_R=26.10$ , presenta un espectro de masas característico de las moléculas de tipo ocotillone a  $m/z=143$  (Figura 11), con el correspondiente derivado deshidratado a  $m/z=125$ , mientras que el pico a  $m/z=470$  procede de la deshidratación del grupo alcohol en C-25 del ión molecular. Van der Doelen (1999) también asigna en sus análisis con un tiempo de retención muy similar una estructura de este tipo.



**Figura 11** Espectro de masas del ácido 20,24-epoxi-25-hidroxi-3,4-seco-4(28)-dammar-3-oico, metil éster y su ión más característico (EI=70v).

Los resultados analíticos (Tablas 4-5, Figuras 12-14) muestran la aparición de cambios en las muestras inoculadas con microorganismos en relación al patrón. No se han formado nuevas sustancias, afectando los cambios observados en los cromatogramas sólo a la intensidad relativa de los picos. Las muestras inoculadas con esporas y bacterias inactivadas han mostrado una composición muy similar a la del patrón sin inocular.

## Hongos

Los cambios más importantes se han registrado en *P. chrysogenum*, observándose (Tabla 4, Figura 12) un fuerte incremento de los triterpenos más oxidados, el ácido dammarenólico ( $\Delta Ni=7.02$ ) y el compuesto de tipo ocotillone ( $\Delta Ni=6.92$ ), acompañado de un importante descenso de la cantidad relativa de hidroxidammarenona ( $\Delta Ni=-20.13$ ). En la muestra inoculada con *P. herbarum* también se produce un descenso de la hidroxidammarenona ( $\Delta Ni=-11.14$ ), si bien mucho más moderado que en el caso anterior, y un muy ligero aumento de los mismos dos compuestos antes mencionados. *C. sitophila* no muestra grandes cambios en los triterpenos tetracíclicos, observándose un leve descenso global a favor de los pentacíclicos.

También se aprecia en los tres microorganismos una tendencia general a la disminución de los picos correspondientes al dammaradienol y dammaradienona, si bien estos datos son de dudosa interpretación, a causa de la escasa importancia de estos picos en los cromatogramas y también por la elución de la dammaradienona junto a la nor-amirona.

Cambios similares a los observados en *P. chrysogenum*, con transformación de compuestos triterpénicos cetónicos en ácidos, ha sido descritos por Van der Doelen (1999) en muestras irradiadas con luz UV en las que se produce la oxidación del anillo A de la cetona (figura 6b), con formación de un grupo carboxílico en C3 y un grupo isopropilo en C5. Sin embargo, no parece fácilmente justificable el paso de hidroxidammarenona a ácido dammarenólico por la acción microbiana, que explicaría el descenso del primero y el aumento del segundo observados analíticamente. El aumento del compuesto de tipo ocotillone en *P. chrysogenum* puede haberse producido por un proceso de oxidación fúngica del ácido dammarenólico de una forma similar a la descrita por Van der Doelen (1999) en barnices envejecidos procedentes de obra real y por fotoenvejecimiento (figura 6a).

En cuanto a los triterpenos de esqueleto pentacíclico (Tabla 5, Figura 12) se observa para todos los hongos un claro aumento de las formas más oxidadas, el ácido ursónico y especialmente el oleanónico, este último con valores de  $\Delta Ni$  en torno a 10. También se ha registrado un mantenimiento o ligero descenso de los niveles de nor-amirona y una tendencia de disminución en el pequeño pico correspondiente al aldehído oleanónico, difícilmente evaluable, dada la escasa resolución de esta sustancia en los cromatogramas.

## Bacterias

En los componentes tetracíclicos (Tabla 4, Figura 12), se han observado fuertes cambios para *S. cellulofans*, con importante descenso de dammarenona ( $\Delta Ni = -14.95$ ) y aumento casi correlativo de ácido dammarenólico ( $\Delta Ni = 9.12$ ) y tendencia al alza del componente de tipo ocotillone. Para las otras dos bacterias se observa un comportamiento que apunta en la misma dirección, si bien más moderado, con descensos de hidroxidammarenona de  $\Delta Ni = -9.58$  y  $\Delta Ni = -6.61$  en *A. oxydans* y *B. amyloliquefaciens* y un apreciable aumento del ácido dammarenólico en el caso de *A. oxydans* ( $\Delta Ni = 4.91$ ).

**Tabla 4.** Análisis por GC-MS de los triterpenos tetracíclicos\* del dammar en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en Ni e  $\Delta Ni$ ).

	Dammaradienona y nor- $\beta$ -amirona	Dammaradienol	Comp. Tipo ocotillone	Ac. Dammarenólico	OH-dammarenona
<b>Dammar</b>	<b>3.34</b>	<b>1.92</b>	<b>0.70</b>	<b>16.33</b>	<b>55.81</b>
<b>Hongos</b>					
<i>C. sitophila</i>	2.29 (-1.05)	1.37 (-0.55)	1.20 (+0.5)	12.85 (-3.48)	49.68 (-5.13)
<i>P. chrysogenum</i>	2.23 (-1.11)	0.89 (-1.03)	7.62 (+6.92)	23.35 (+7.02)	35.68 (-20.13)
<i>P. herbarum</i>	2.93 (-0.41)	1.17 (-0.75)	1.93 (+1.23)	18.51 (+2.18)	44.67 (-11.14)
<b>Bacterias</b>					
<i>A. oxydans</i>	1.03 (-2.31)	1.22 (-0.70)	1.72 (+1.02)	21.24 (+ 4.91)	46.23 (-9.58)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4.38 (+1.04)	1.15 (+0.77)	1.55 (+0.85)	17.21 (+ 0.88)	49.20 (-6.61)
<i>S. cellulofans</i>	3.91 (+0.57)	2.91 (+0.99)	1.76 (+1.1)	25.45 (+9.12)	40.86 (-14.95)

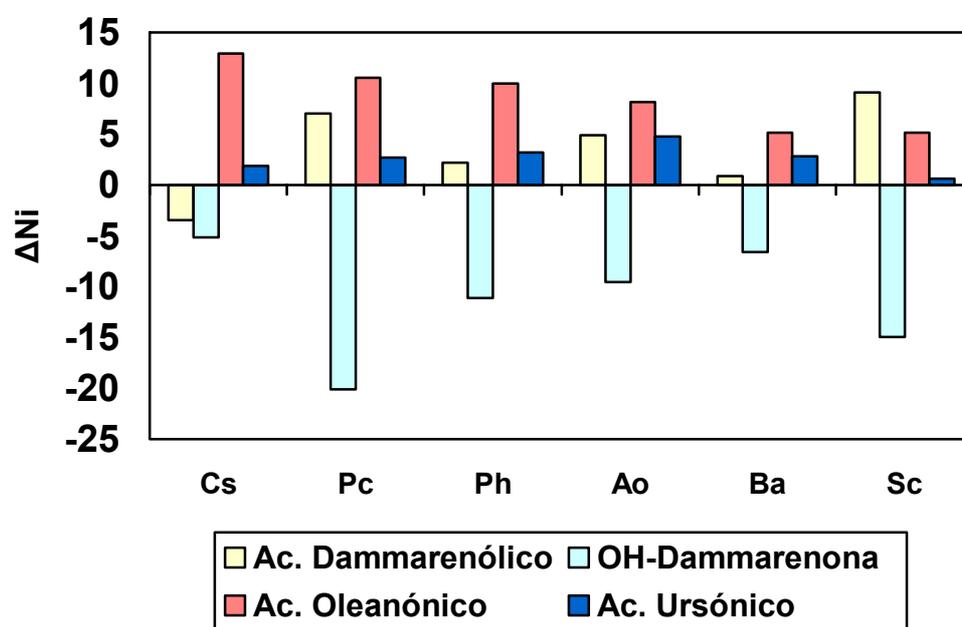
\*En la primera columna se incluye la nor  $\beta$  amirona por eluir conjuntamente con la dammaradienona

En los componentes pentacíclicos (Tabla 5, Figura 12) se observa la misma tendencia que en el caso de los hongos, pero más atenuada. Las tasas de amirona prácticamente se mantienen, mientras que aumentan en los tres microorganismos ensayados los niveles de ácido oleanónico ( $\Delta Ni=8.17$  en *A. oxydans* y en torno a 5 en los otros dos microorganismos) y de ácido ursónico, excepto en el caso de *S. cellulofans*, que mantiene las tasas de este último compuesto.

El único componente de estructura hopánica, la hidroxihopanona, no ha mostrado cambios de importancia en ninguna de las muestras inoculadas con microorganismos.

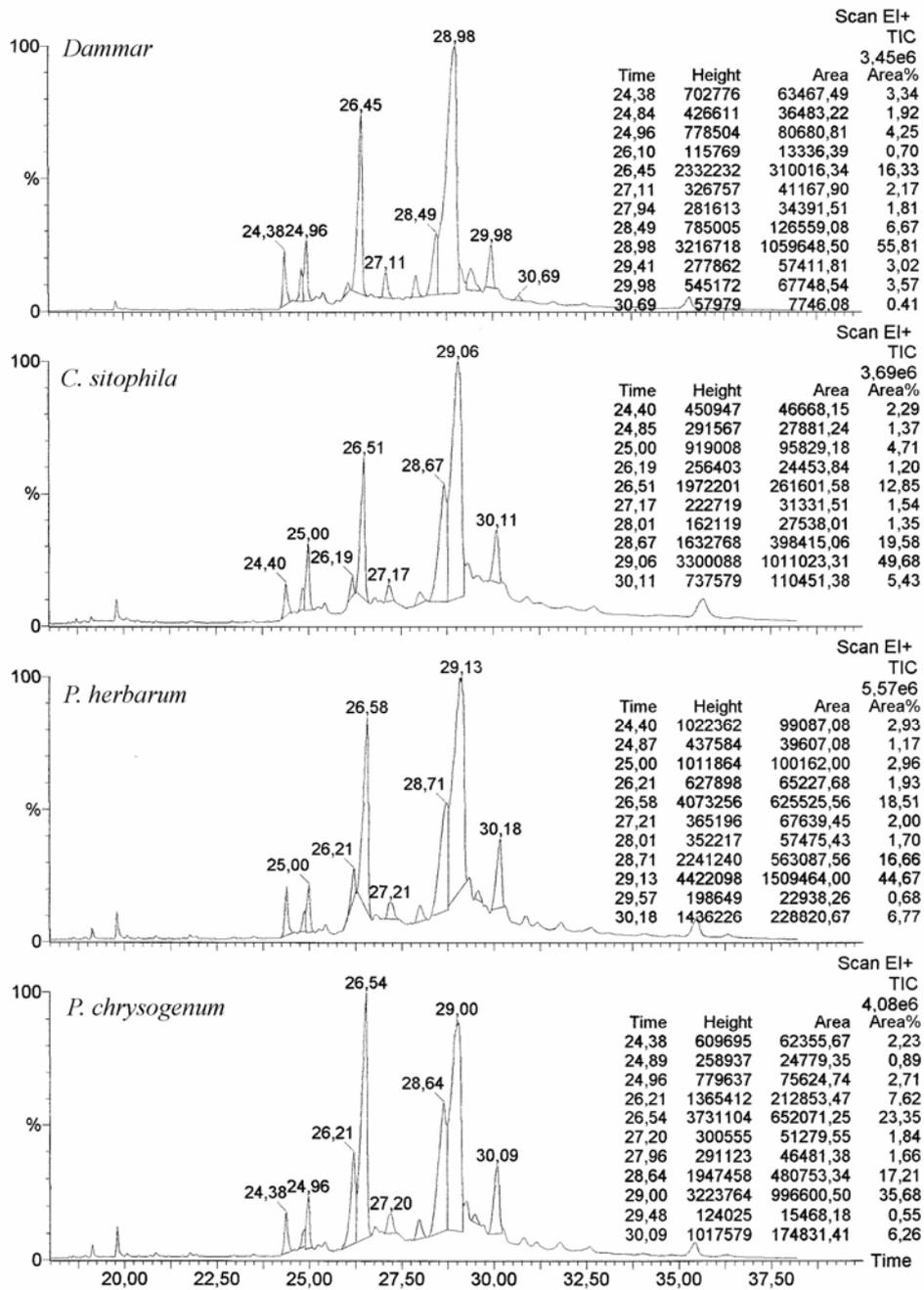
**Tabla 5.** Análisis por GC-MS de los triterpenos pentacíclicos del dammar en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en *Ni* e  $\Delta Ni$ , entre paréntesis).

	Nor- $\alpha$ -amirona	Ácido oleanónico	Ácido ursónico
<b>Dammar</b>	<b>4.25</b>	<b>6.67</b>	<b>3.57</b>
<b>Hongos</b>			
<i>C. sitophila</i>	4.71 (+ 0.46)	19.58 (+12.91)	5.43 (+1.86)
<i>P. chrysogenum</i>	2.71 (-1.54)	17.21 (+10.54)	6.26 (+2.69)
<i>P. herbarum</i>	2.96 (-1.29)	16.66 (+9.99)	6.77 (+3.20)
<b>Bacterias</b>			
<i>A. oxydans</i>	2.49 (-1.76)	14.84 (+8.17)	8.35 (+4.78)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.99 (-0.26)	11.83 (+5.16)	6.41 (+2.84)
<i>S. cellulofans</i>	4.33 (+0.08)	11.82 (+5.15)	4.16 (+0.59)



**Figura 12.** Análisis por GC-MS (valores expresados en  $\Delta Ni$ ) de los principales componentes del barniz de dammar inoculado con microorganismos (*Cs*= *C.sitophila*; *Pc*=*P.chrysogenum*; *Ph*=*P.herbarum*; *Ao*= *A.oxydans*; *Ba*=*B.amyloliquefaciens* *Sc*=*S.cellulofans*)

*Dammar y almáciga*



**Figura 13.** Cromatogramas correspondientes al patrón de dammar y muestras inoculadas con hongos

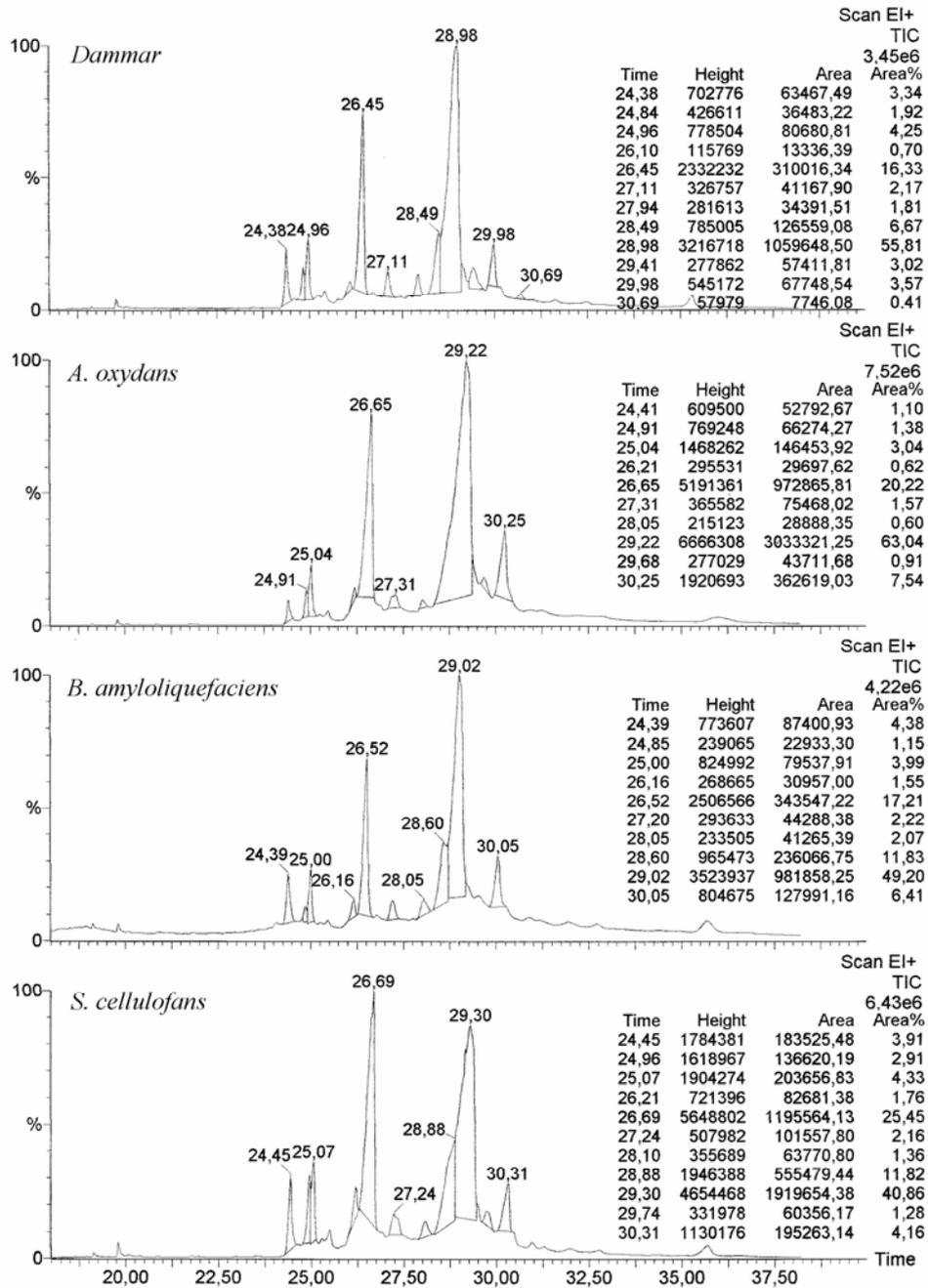
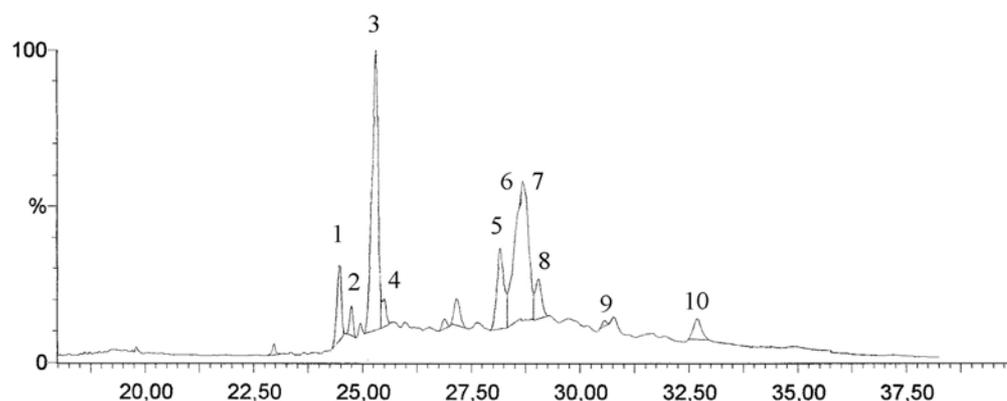


Figura 14. Cromatogramas correspondientes al patrón de dammar y muestras inoculadas con bacterias

5.3.2.2 Almáciga

Componentes identificados en el barniz de almáciga (Figura 15, Tabla 6):



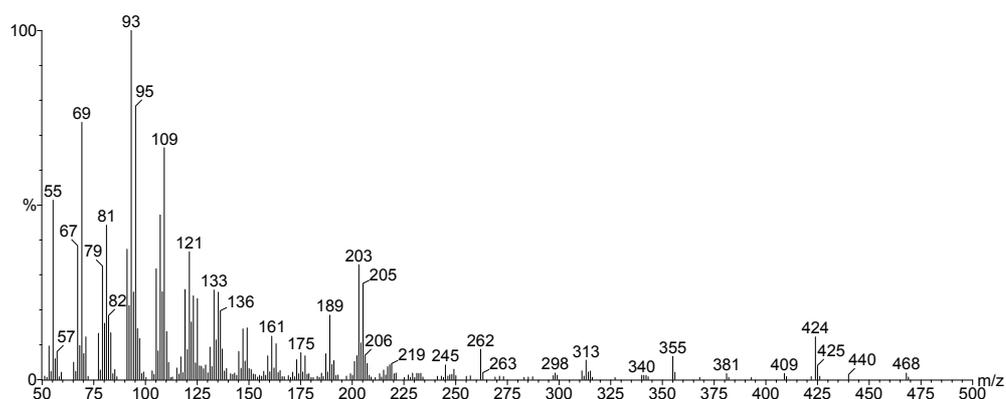
**Figura 15.** Cromatograma correspondiente al patrón de almáciga. (1) Nor- $\beta$ -amirona (3-oxo-28-nor-olean-12-eno); (2)  $\beta$ -amirona (3-oxo-olean-12-eno); (3) Nor- $\alpha$ -amirona (3-oxo-28-nor-urs-12-eno); (4)  $\alpha$ -amirona (3-oxo-urs-12-eno); (5) Ácido morónico (ácido 3-oxo-olean-18-en-28-oico), metil éster; (6) Ácido oleanónico (ácido 3-oxo-olean-12-en-28-oico), metil éster; (7) Hidroxidammarenona (20-hidroxi-24-dammaren-3-ona); (8) Aldehído oleanónico (3-oxo-olean-12-en-28-al); (9,10) Ácido masticadienoico (o isómero) (ácido 3-oxo-13 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 17 $\beta$ H, 20 $\alpha$ H-lanosta-8,24-dien-26-oico), metil éster

**Tabla 6** Principales compuestos identificados mediante GC-MS en almáciga

Nº	$t_R$	Compuesto	Pm	ID
1	24.47	Nor- $\beta$ -amirona	410	R
2	24.74	$\beta$ -amirona	424	R
3	25.31	Nor- $\alpha$ -amirona	410	R
4	25.42	$\alpha$ -amirona	424	R
5	28.18	Ácido morónico, metil éster	468	L
6	28.69	Ácido oleanónico, metil éster	468	R
7	28.69	Hidroxidammarenona	442	R
8	29.04	Aldehído oleanónico	468	R
9	30.56	Ácido masticadienoico (o isómero), metil éster	468	R
10	32.69	Ácido masticadienoico (o isómero), metil éster	468	R

( $t_R$ : tiempo de retención; Pm = peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley Mass Spectra Library; R, Referencias)

La identificación de los compuestos se ha realizado según la base de datos Wiley Mass Spectra Library (L) y los espectros publicados en bibliografía (R) (Van der Doelen *et al.* 1998 a, 1998b; Van der Doelen 1999; Van der Doelen y Boon 2000, Assimoupoulou y Papageorgiou 2005 a,b). Los principales patrones (Anexo 3) aparecen en la tabla 7. En el pico cromatográfico a  $t_R=28.69$  coeluyen (Figura 16) el ácido oleanónico ( $m/z=468, 262, 203$ ) y la hidroxidammarenona ( $m/z=424, 355, 205, 109$ ).



**Figura 16.** Espectro de masas del pico cromatográfico correspondiente a la coelución del ácido oleanónico y la hidroxidammarenona

**Tabla 7.** Patrones de fragmentación por espectroscopia de masas de los triterpenos más abundantes en el barniz de almáciga

Nº	Compuesto	Pm	Iones característicos ( $m/z$ )
1	Nor- $\beta$ -amirona	410	410, 204
2	$\beta$ -amirona	424	424, 218
3	Nor- $\alpha$ -amirona	410	410, 204
4	$\alpha$ -amirona	424	424, 218
5	Ácido morónico, metil éster	468	468, 249, 189
6	Ácido oleanónico, metil éster	468	468, 262, 203
7	Hidroxidammarenona	442	424, 355, 205, 109
8	Aldehído oleanónico	438	438, 232, 203
9	Ácido masticadienoico (o isómero), metil éster	468	468, 453, 421
10	Ácido masticadienoico (o isómero), metil éster	468	468, 453, 421

## Dammar y almáciga

Los resultados analíticos correspondientes al patrón, hongos con crecimiento y bacterias se muestran en las Tablas 8-9 y las Figuras 17-19. El patrón de almáciga presenta una composición en la que predominan la nor- $\alpha$ -amirona ( $N_i=30.12\%$ ), el ácido morónico ( $N_i=10.03\%$ ), una mezcla de ácido oleanónico e hidroxidammarenona (36.80%) y cantidades menores de otros compuestos, como la nor- $\beta$ -amirona ( $N_i=5.99\%$ ), el aldehído oleanónico ( $N_i=5.54\%$ ),  $\alpha$  y  $\beta$  amirona o el ácido masticadienoico. Dado que el ácido oleanónico eluye conjuntamente con la hidroxidammarenona, del cromatograma adquirido se han extraído los de las masas 424 y 468, correspondientes a la hidroxidammarenona y el ácido dammarenónico, y se ha procedido a su integración, observándose que la cantidad aproximada de cada componente en la mezcla es del 50%.

Se han registrado cambios en la composición de las muestras tratadas con microorganismos con respecto al patrón, afectando dichos cambios a la intensidad relativa de los picos, pero no han aparecido sustancias nuevas. Las muestras inoculadas con esporas y bacterias inactivadas han mostrado una composición muy similar a la del patrón sin inocular.

En el caso de los hongos (Tablas 8-9 y Figura 17) los cambios más importantes consisten en un fuerte aumento de la cantidad relativa de ácido morónico, con valores de  $\Delta N_i$  que oscilan entre  $\Delta N_i=10.17$  para *C. sitophila* y  $\Delta N_i=20.39$  para *P. herbarum*, que se ven correspondidos con una apreciable disminución del pico correspondiente a la coelución del ácido oleanónico y la hidroxidammarenona, que presenta descensos en los tres microorganismos (*P. herbarum*  $\Delta N_i=-9.45$ ; *P. chrysogenum*  $\Delta N_i=-7.53$  y *C. sitophila*  $\Delta N_i=-5.94$ ). Otra importante diferencia respecto al patrón aparece en los niveles de nor- $\alpha$ -amirona y nor- $\beta$ -amirona, que sufren fuertes descensos en *P. herbarum* y *P. chrysogenum*.

En las bacterias ocurre un fenómeno similar, con una bajada del pico correspondiente a la coelución del ácido oleanónico (*A. oxydans*  $\Delta N_i=-8.90$ ; *B. amyloliquefaciens*  $\Delta N_i=-9.38$ ; *S. cellulofans*  $\Delta N_i=-5.69$ ) y un aumento prácticamente correlativo (pero bastante inferior al observado para los hongos, con  $\Delta N_i$  en torno a 10) en la cantidad del ácido morónico. En las tres bacterias ensayadas el aldehído oleanónico prácticamente desaparece del cromatograma, lo que puede relacionarse con una oxidación del aldehído oleanónico hasta ácido oleanónico, no observada en el caso de los hongos. Los cambios en la concentración de la nor- $\alpha$ -amirona y nor- $\beta$ -amirona han sido en las bacterias menos significativos.

Se ha realizado un estudio (Domenech-Carbó *et al.* 2006) por GC-MS en barniz de almáciga inoculado con micelios fúngicos (no esporas, como en este caso) de *Cladosporium cladosporoides*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Penicillium*

*chrysogenum* y *Aspergillus niger*, y suspensiones bacterianas de las mismas tres bacterias aquí estudiadas. El patrón, suministrado por Agar-Agar, presentó una composición basada en el hexaskinor-dammaran-3-20-diona, nor-olean-17-en-3-ona, hidroxidammarenona, y los ácidos morónico y masticadienoico, bastante diferente en cuanto a la intensidad relativa de los picos obtenidos respecto a los resultados de este estudio, así como pequeñas cantidades de productos de degradación más oxidados. Los valores de  $\Delta Ni$  obtenidos fueron bastante dispersos en los microorganismos testados, pero *P. chrysogenum* mostró un comportamiento similar al descrito en el presente estudio, con descensos de los derivados de la amirona y aumento del ácido morónico y del compuesto 20,24-epoxi-25-hidroxi-dammaran-3-ona. En las bacterias se produjeron ligeros aumentos de ciertas sustancias oxidadas que formaban parte del barniz.

**Tabla 8.** Análisis por GC-MS de los triterpenos pentacíclicos\* de la almáciga en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $Ni$  e  $\Delta Ni$ , entre paréntesis)

Hongos	Nor- $\alpha$ -amirona	$\alpha$ -amirona	Nor- $\beta$ -amirona	$\beta$ -amirona	Ácido morónico	Ác.oleanónico OH-dammarenona	Aldehído oleanónico
<b>Mástic</b>	<b>5.99</b>	<b>1.69</b>	<b>30.12</b>	<b>2.36</b>	<b>10.03</b>	<b>36.90</b>	<b>5.54</b>
<i>C. sitophila</i>	3.05 (-2.94)	0.81 (-0.88)	25.15 (-4.97)	4.10 (+1.74)	20.20 (+10.17)	30.96 (-5.94)	6.30 (+0.76)
<i>P. chrysogenum</i>	0.87 (-5.12)	0.46 (-1.23)	15.62 (-14.50)	2.25 (-0.11)	25.04 (+15.01)	29.37 (-7.53)	6.86 (+1.32)
<i>P. herbarum</i>	0.87 (-5.12)	0.22 (-1.47)	16.58 (-13.54)	2.20 (-0.16)	29.39 (+19.36)	27.45 (-9.45)	4.94 (-0.60)

Bacterias	Nor- $\alpha$ -amirona	$\alpha$ -amirona	Nor- $\beta$ -amirona	$\beta$ -amirona	Ácido morónico	Ác.oleanónico OH-dammarenona	Aldehído oleanónico
<b>Mástic</b>	<b>5.99</b>	<b>1.69</b>	<b>30.12</b>	<b>2.36</b>	<b>10.03</b>	<b>36.90</b>	<b>5.54</b>
<i>A. oxydans</i>	4.75 (-1.24)	0.80 (-0.89)	36.58 (+6.46)	3.54 (+1.18)	19.49 (+9.46)	28.00 (-8.90)	0 (-5.54)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4.17 (-1.82)	1.25 (-0.44)	34.05 (+3.93)	3.39 (-1.03)	17.96 (+7.93)	27.52 (-9.38)	0 (-5.54)
<i>S. cellulofans</i>	2.55 (-3.44)	0.62 (-1.07)	26.08 (-4.04)	4.55 (+2.19)	21.55 (+11.52)	31.61 (-5.29)	0 (-5.54)

\* Se incluye la hidroxidammarenona por eluir conjuntamente con el ácido oleanónico

Los cambios observados en la minoritaria fracción tetracíclica (Tabla 9 y Figura 17), integrada básicamente por el ácido masticadienoico y su isómero son menos destacables. Entre los hongos resulta relevante el fuerte aumento registrado en *P. herbarum* y *P. chrysogenum* de la cantidad relativa del pico que aparece a tR en torno a 32 min. (ácido masticadienoico o su isómero), con valores de  $\Delta Ni$  de +7.71 y +10.46 respectivamente, similares también a las registradas en este último microorganismo según Domenech–Carbó *et al.* (2006). Las bacterias han mostrado cambios poco significativos.

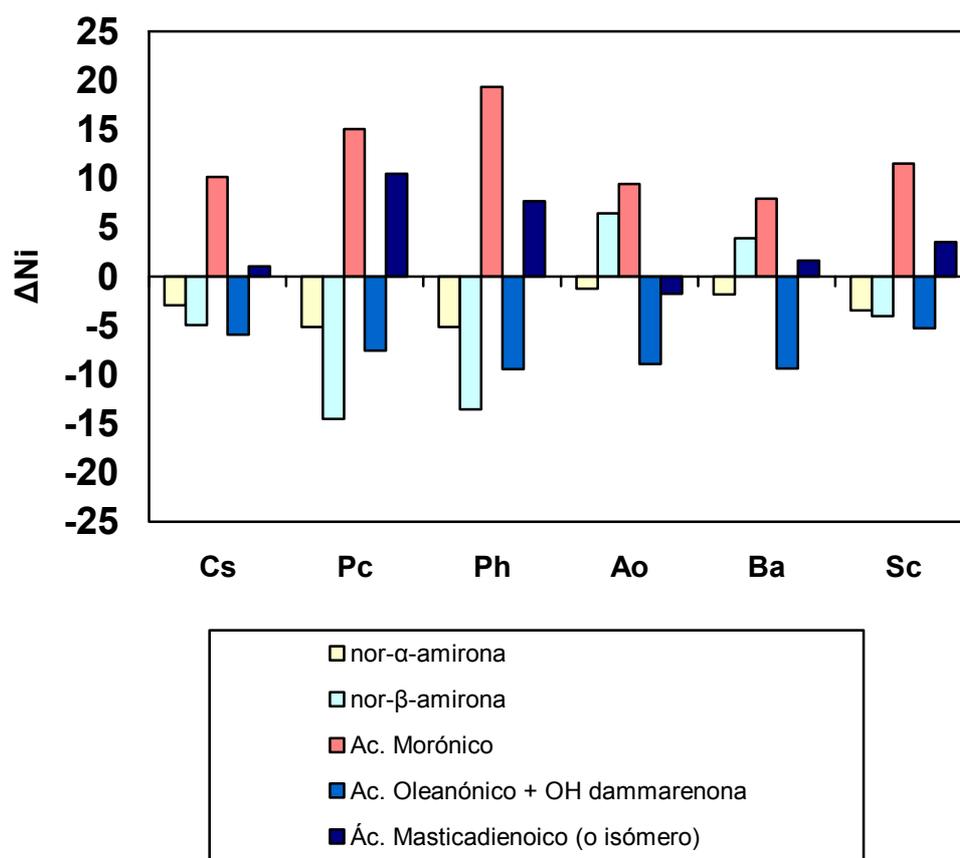
**Tabla 9.** Análisis por GC-MS de los triterpenos tetracíclicos\* de la almáciga en presencia y ausencia de microorganismos (valores expresados en  $Ni$  e  $\Delta Ni$ , entre paréntesis).

Hongos	Ácido masticadienoico (o isómero)	Ácido masticadienoico (o isómero)
<b>Mastic</b>	<b>0.40</b>	<b>2.90</b>
<i>C. sitophila</i>	2.45 (+2.05)	3.93 (+1.03)
<i>P. chrysogenum</i>	2.44 (+2.04)	13.36 (+10.46)
<i>P. herbarum</i>	3.27 (+2.87)	10.61 (+7.71)

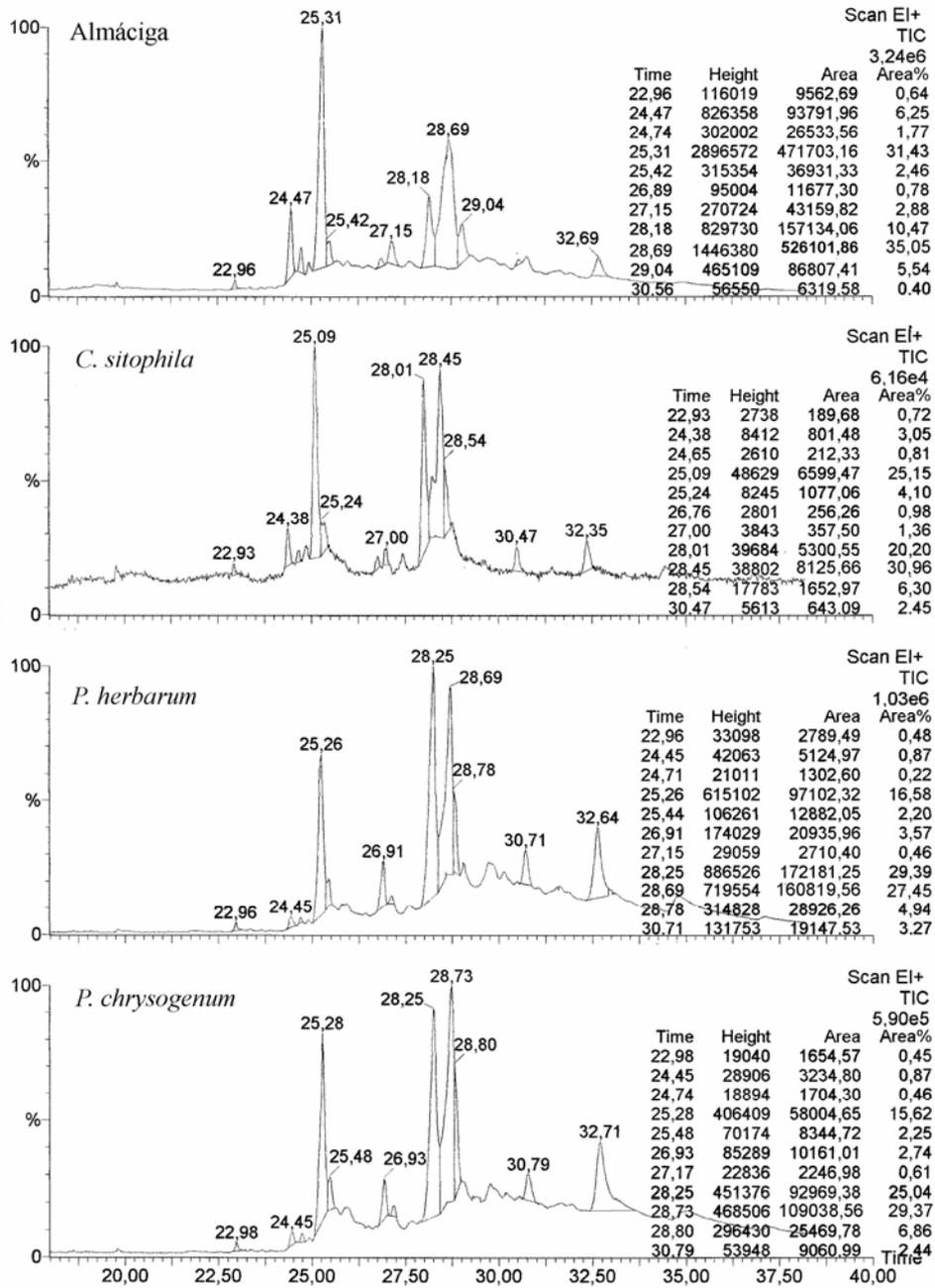
Bacterias	Ácido masticadienoico (o isómero)	Ácido masticadienoico (o isómero)
<b>Mastic</b>	<b>0.40</b>	<b>2.90</b>
<i>A. oxydans</i>	0 (-0.40)	1.15 (-1.75)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0 (-0.40)	4.50 (+1.60)
<i>S. cellulofans</i>	0 (-0.40)	6.40 (+3.50)

\* No se incluye la hidroxidammarenona por eluir conjuntamente con el ácido oleanónico



**Figura 17.** Análisis por GC-MS (valores expresados en  $\Delta Ni$ ) de los principales componentes del barniz de almáciga inoculado con microorganismos (*Cs*= *C.sitophila*; *Pc*=*P.chrysogenum*; *Ph*=*P.herbarum*; *Ao*= *A.oxydans*; *Ba*=*B.amyloliquefaciens* *Sc*=*S.cellulofans*)

*Dammar y almáciga*



**Figura 18.** Cromatogramas correspondientes al patrón de almáciga y muestras inoculadas con hongos

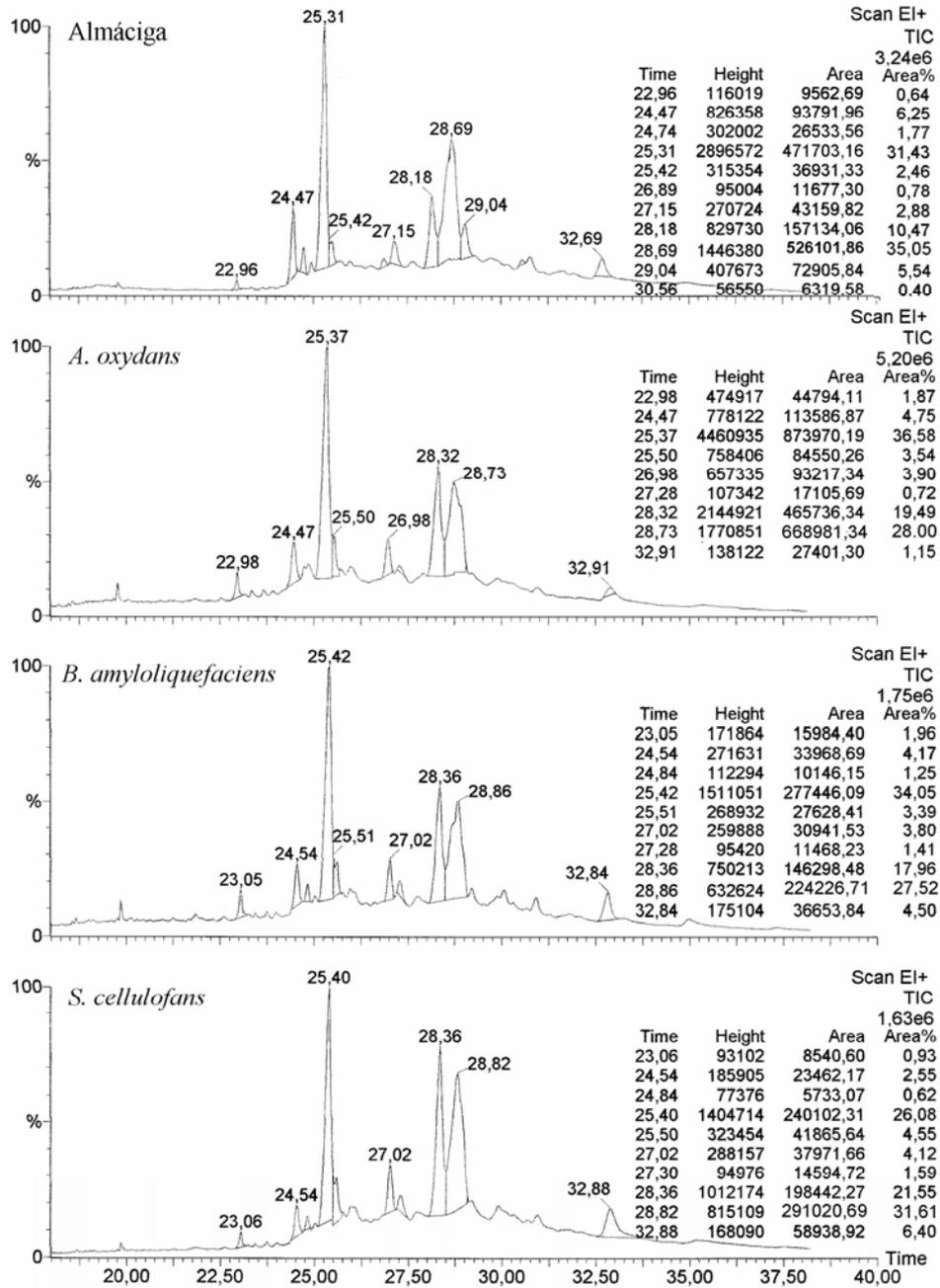
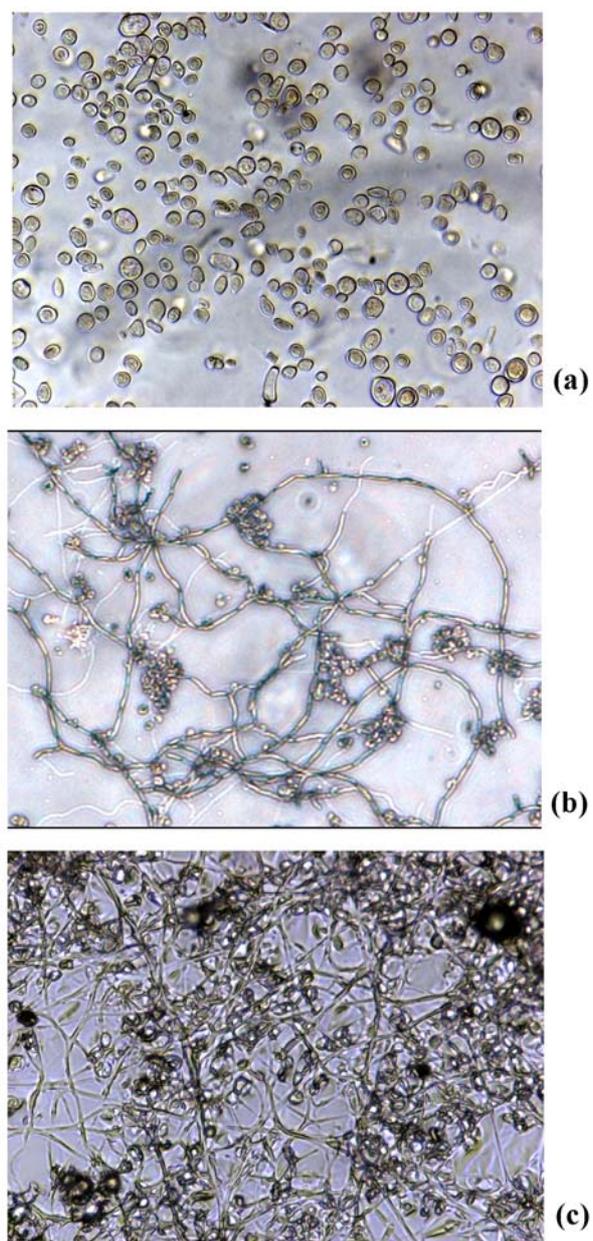
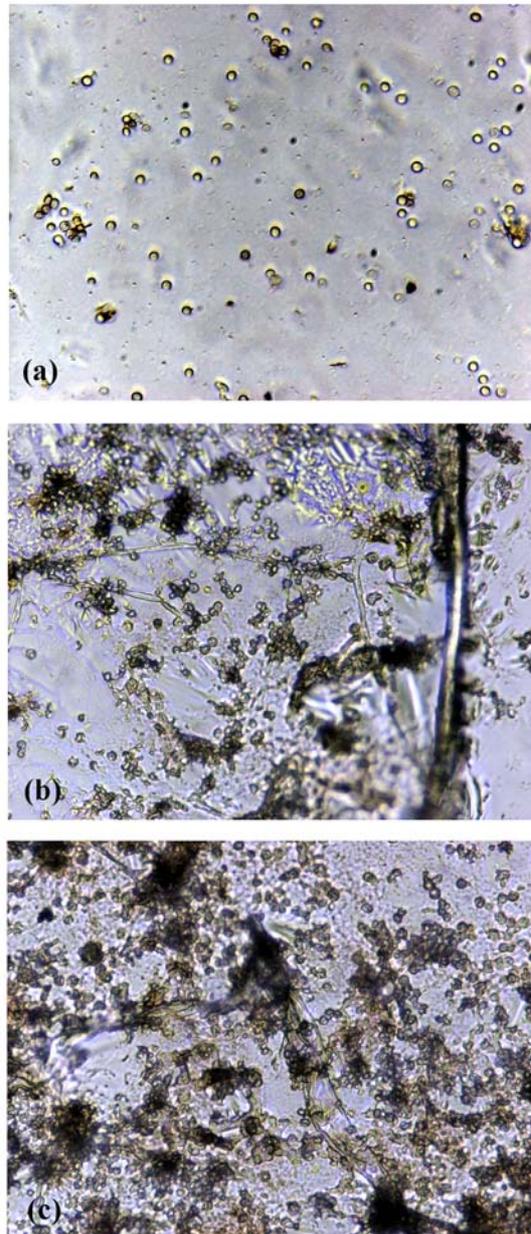


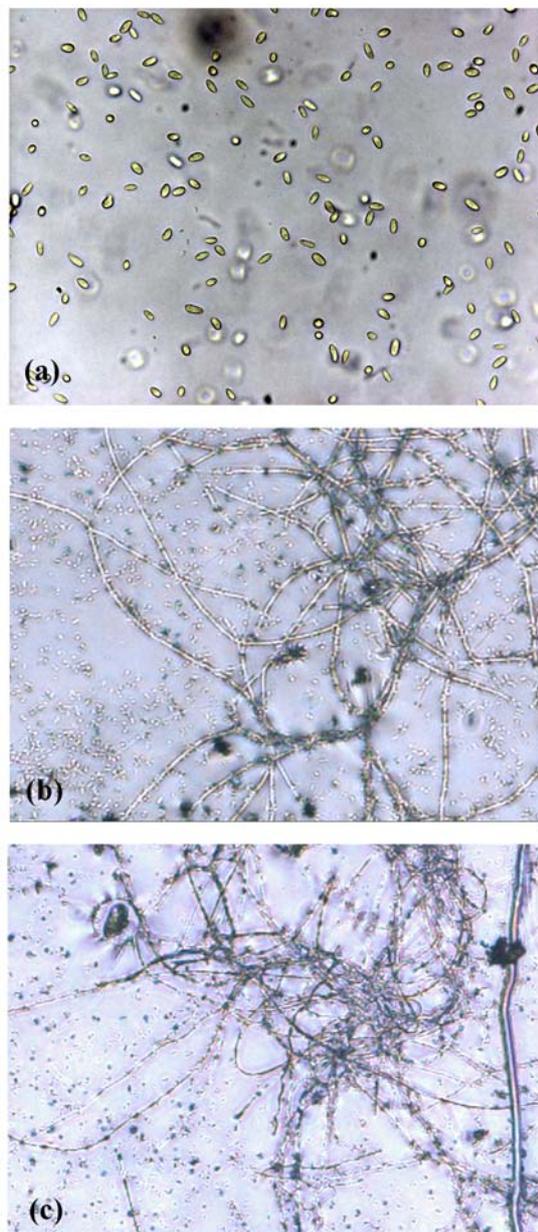
Figura 19. Cromatogramas correspondientes al patrón de almáciga y muestras inoculadas con bacterias



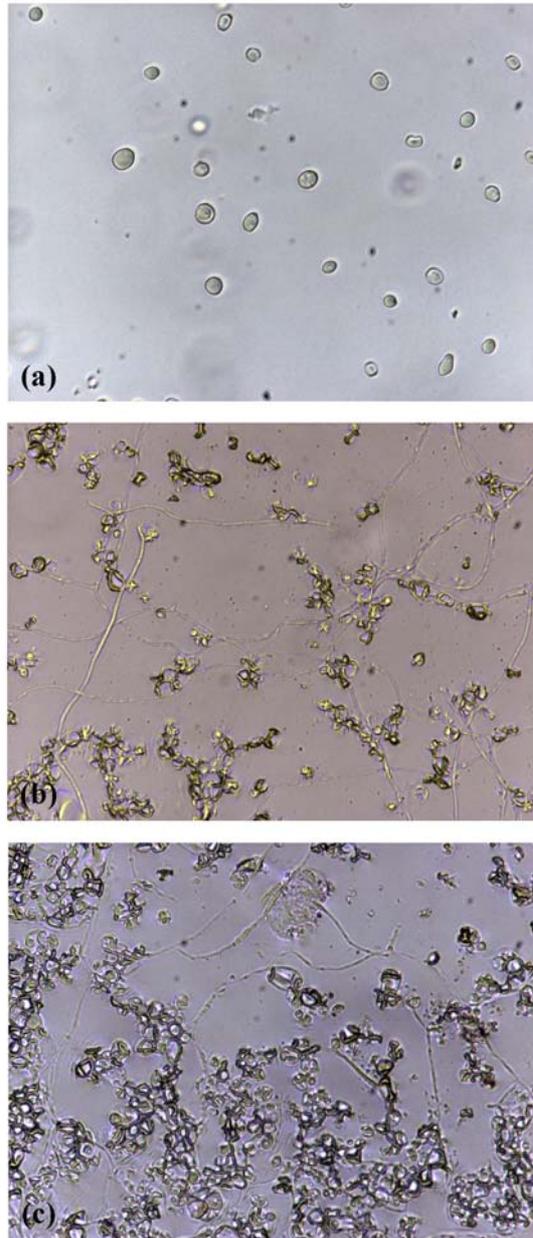
**Figura 20** (a) *Chrysonilia sitophila* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de dammar.



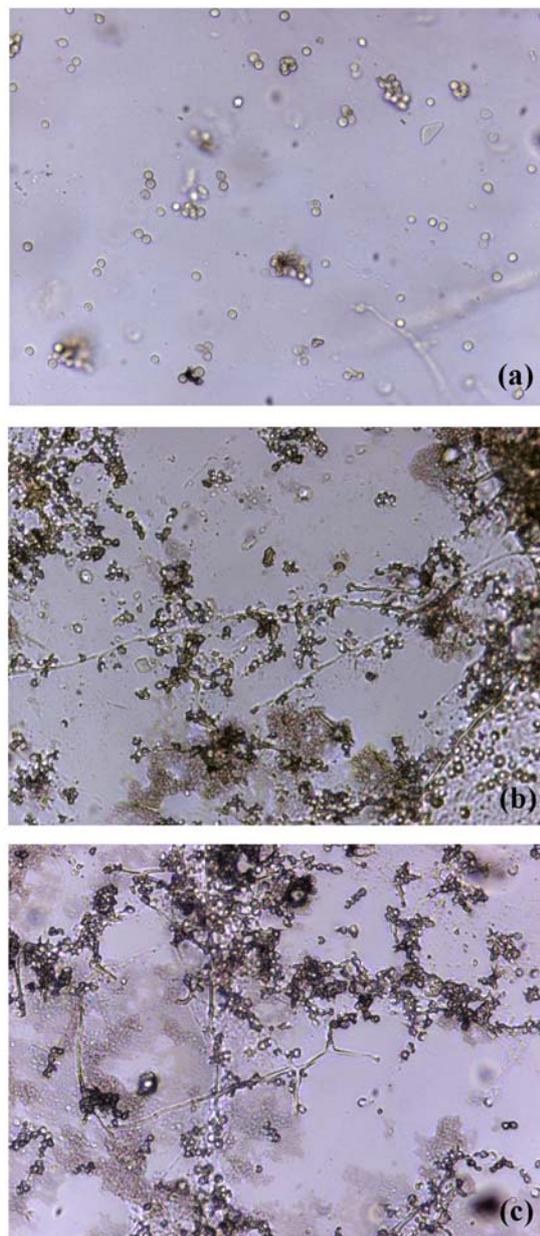
**Figura 21** (a) *Penicillium chrysogenum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de dammar.



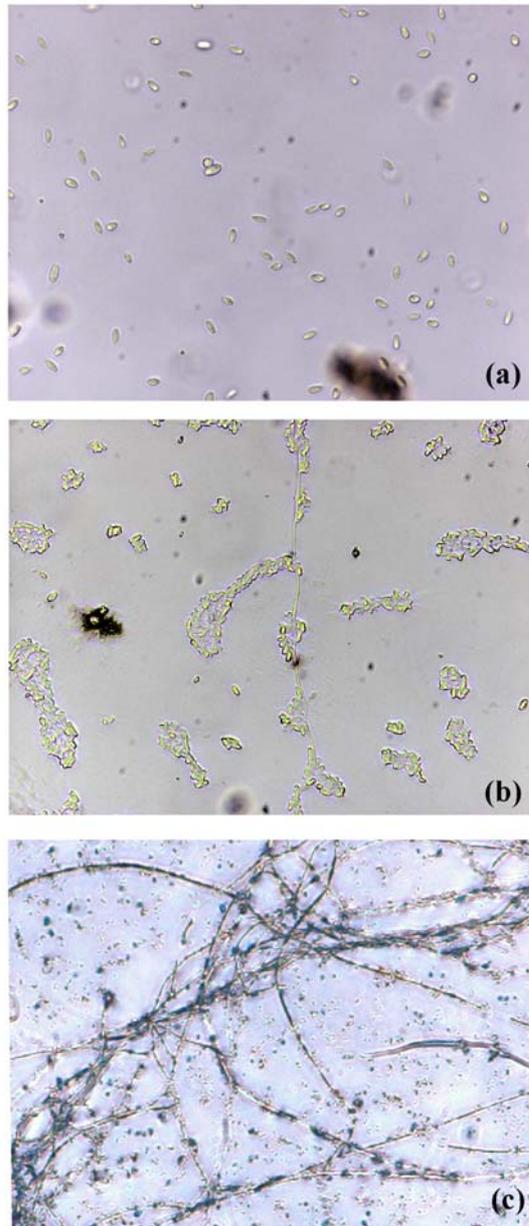
**Figura 22** (a) *Phoma herbarum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de dammar.



**Figura 23** (a) *Chrysonilia sitophila* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de almáciga.



**Figura 24** (a) *Penicillium chrysogenum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de almáciga.



**Figura 25** (a) *Phoma herbarum* (inóculo esporas) y desarrollo a las 24 horas (b) y 5 días de incubación (c) en barniz de almáciga.

*Dammar y almáciga*

## Referencias

- Agraval OP, Dhawan S, Garg KL (1989). Microbial deterioration of paintings: A review. Intach Conservation Centre, Lucknow, India, pp 1-51.
- Alev Aksoy, Nizami Duran, Fatih Koksal (2006). In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and mutans streptococci. *Archives of Oral Biology*, 51 (6): 476-481.
- Arai H (2000). Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 181-188.
- Assimopoulou AN, Papageorgiou VP (2005). GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part I. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomed. Chromatography*, 19: 285-311.
- Assimopoulou AN, Papageorgiou VP (2005). GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part II. *Pistacia terebinthus* var. Chia. *Biomed. Chromatography*, 19: pp 586-605.
- Bolívar-Galiano FC (1995). Los Agentes de Biodeterioro del Patrimonio Pictórico, Textil y Gráfico. *Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 12: 50-51.
- Bravery AF (1998). Biodeterioration of paint. A state of the art comment. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 466- 485.
- Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (1994). *La biología nel restauro*. Nardini editore. Firenze, pp 92-95.
- Ciferri O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and environmental microbiology*, 65 (3): 879-885.
- Colombini MP, Modugno F, Giannarelli S, Fuoco R, Mateini M (2000). GC-MS characterization of paint varnishes. *Microchemical journal*, 67: 385-396.
- De la Rie ER (1988). Photochemical and thermal degradation of films of dammar resin. *Studies in Conservation*, 33: 53-70.
- Doerner M (1998). *Los materiales de pintura y su empleo en el arte*. 1ª ed. Reverté, Barcelona, pp 94-100.

## *Dammar y almáciga*

Doménech-Carbó MT, Osete-Cortina L, de la Cruz Cañizares J, Bolívar-Galiano F, Romero-Noguera J, Fernández-Vivas MA, Martín-Sánchez I (2006). Study of the microbiodegradation of terpenoid resin-based varnishes from easel painting using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chemistry*, 385 (7): 1265 – 1280.

Giacobini, C, De Cicco MA, Tiglie I, Accardo G (1988). Actinomycetes and Biodeterioration in the Field of Fine Art. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 418-423.

Giacobini C, Pedica M, Spinucci M (1991). Problems and Future Projects on the Study of Biodeterioration: Mural and Canvas Paintings. In. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on the Biodeterioration of Cultural Property*. Mc Millan India Ltd, New Delhi. Cap 31, pp 275-286.

Heim R, Francoise F, Nicot J (1968). "Combatting Moulds Which Develop on Cultural Properties in Tropical Climates." Conservation of Cultural Properties with Special Reference to Tropical Climates. Lausanne, Switzerland: UNESCO, pp 45-48.

Inoue M, Koyano M. (1991) Fungal Contamination of Oil Paintings in Japan. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 28: 23-35

Masschelein-Kleiner L (1992). *Liants, vernis et adhésifs anciens*. Institut Royal du Patrimoine Artistique, Bruxelles, pp 86-100.

Mayer R (1985). *The artist's handbook of materials and techniques*. 1<sup>a</sup> ed. Blume, Madrid, pp 156-185.

Mills JS, White R (1994). *The Organic Chemistry of Museum Objects*. Butterworths, London, pp 99-108.

Montes Estellés RM (1994). Estudio de la contaminación fisicoquímica y microbiológica, en el conjunto patrimonial de la basílica de la Virgen de los Desamparados de Valencia. *Comunicaciones técnicas, libro segundo. II Congreso Nacional de Medio Ambiente*. Madrid, 21-25 noviembre 1994, pp 23-37.

Papageorgiou VP, Bakola-Christianopoulou MN, Apazidou KK, Psarros EE (1997). Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of chromatography A*, 769: 263-273

Petushkova JP, Lyalikova NN (1986). Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Studies in Conservation*, 31: 65-69

Ross RT (1963). Microbiology of paint films. *Adv. Appl. Microb*, 5: 217- 234.

- Seves A, Sora S, Ciferri O. (1996). The microbial colonization of oil paintings. A laboratory investigation. *International biodeterioration & biodegradation*. 37 (3-4): 215-224
- Seves A, Romano H, Scilione G, Maifreni T, Sora S. (2000). A laboratory investigation of the microbial degradation of cultural heritage (ICMC). In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G (Eds.), *Of microbes and art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, pp 121-133.
- Strzelczyk AB (1981). Paintings and Sculptures. In: Rose AH (Ed.), *Microbial deterioration*. Academic Press, London, pp 203-234.
- Valentín N (1990). Contaminación biológica en materiales arqueológicos y su erradicación por medio de tratamientos no tóxicos. *Cuadernos del Instituto de Conservación de Bienes Culturales*, Madrid, pp 113-120.
- Valentín N, Vaillant M, Guerrero H. (1996). Control integrado de plagas en bienes culturales de países de clima mediterráneo y tropical. XI Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales. Castellón, 3-6 octubre. Ed Diputación de Castellón, pp 205-215.
- Van Aarssen BGK, Cox HC, Hoogendoorn P, De Leeuw, JW (1990). A cadinene biopolymer present in fossil and extant dammar resins as a source for cadinanes and bicadinanes in crude oils from Southeast Asia. *Geochimica et Cosmochimica* 54: 3021-3031.
- Van den Berg KJ, Van der Horst J, Boon JJ, Sudeijer OO (1998). Cis-1,4-poly- $\beta$ -myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated. *Tetrahedron Letters*, 39 (17, 23): 2645-2648.
- Van der Doelen GA, Van den Berg KJ, Boon JJ (1998). Comparative chromatographic and mass-spectrometric studies of triterpenoids varnishes: fresh materials and aged simples from paintings. *Studies in Conservation*, 43: 249-264.
- Van der Doelen GA, Van den Berg KJ, Boon JJ, Shibayama N, de la Rie ER, Genuit WJL (1998). Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 809: 21-37.
- Van der Doelen GA (1999). *Molecular studies of fresh and aged triterpenoids varnishes*. PhD thesis. University of Amsterdam, Amsterdam.
- Van der Doelen GA, Boon JJ (2000). Artificial ageing of varnish triterpenoids in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 134: 45-57.
- Walsh JH (2001). Ecological considerations of biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48:16-25.

*Dammar y almáciga*

---

## 6 Tratamientos biocidas

### 6.1 Introducción

El control del desarrollo de agentes biológicos causantes de biodeterioro es una labor frecuente en la restauración de obras de arte. Para ello se emplean, entre otras soluciones, productos biocidas, definidos en la legislación española (Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre) como “aquellas sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer el control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos” (sic).

El empleo de estas sustancias en bienes culturales ha sido estudiado en importantes trabajos, dedicados casi exclusivamente al tratamiento de piedra ornamental y que constituyen hasta el momento la principal fuente de información al respecto (Tiano 1998; Koestler 2000; Warscheid & Braams 2000; Nugari & Salvadori 2003, entre otros). En ellos se ha evaluado la actividad de los productos, toxicidad, estabilidad química e interacciones con los materiales originales, con el objeto de aplicar los tratamientos de la forma más eficaz, garantizando una elevada actividad contra los microorganismos, inocuidad para los materiales artísticos y baja toxicidad humana y ambiental (Caneva *et al.* 1994, 1998, 2005).

Los biocidas más usados en restauración no han sido creados específicamente para bienes culturales, sino que son desinfectantes o pesticidas de amplio uso industrial que se han adaptado para este fin, pertenecientes a grupos químicos como los compuestos organometálicos, fenoles y derivados de amonio cuaternario y nitrogenados (Caneva 1994, 1998). En el campo de la conservación, se usan de dos formas principales: aplicados antes del tratamiento para eliminar los

microorganismos ya presentes, o bien para prevenir la recolonización de superficies restauradas, normalmente en combinación con productos hidrorrepelentes, tales como las siliconas o siloxanos. La segunda opción parece ser la más eficaz (Commissione Normal 1991; Malagodi *et al.* 2000; Ariño *et al.* 2002). La técnica de aplicación utilizada es también un importante factor para aumentar el éxito de los tratamientos, recomendándose al menos dos aplicaciones del producto durante un tiempo de acción mínimo de tres días y el uso de papetas o geles que aumentan el tiempo de contacto con la superficie a proteger (Gómez Alarcon *et al.* 1999; Pietrini *et al.* 1999), ya que las interacciones con el medio ambiente (lluvia, luz solar, etc) hacen necesario el uso de dosis muy superiores a las determinadas en laboratorio (Krumbein & Gross 1992; Nugari 1993, 1999; Koestler & Salvadori 1996).

Una posible alternativa es el empleo de materiales con biocida incorporado. Los restauradores realizan con frecuencia estas operaciones de forma empírica, mezclándolos con hidrorrepelentes o consolidantes, pero sólo en el campo de los morteros de restauración se están realizando intentos serios de conseguir productos con actividad biocida (Martínez-Ramírez *et al.* 1998; Ferone *et al.* 2000; Urzi & de Leo 2007) e incluso sistemas de inmovilización de los biocidas en resinas sintéticas, con el propósito de conseguir una liberación a demanda (Quaresma *et al.* 1997). Sin embargo, la eficacia de estas prácticas no ha sido aún convenientemente contrastada.

En el campo específico de las resinas terpénicas no existen apenas datos sobre el uso de biocidas asociados a los barnices para conferir una protección externa frente a los microorganismos a obras de arte muebles, tales como pintura o escultura policromada, excepto los aportados por nuestro grupo de investigación, parte de los cuales se recogen en la presente tesis doctoral (Doménech-Carbó *et al.* 2006). Souza & Gaylarde (2002) han estudiado la colonización de madera de pino barnizada con una resina alquídica (no especifican cual) con biocida incorporado a base de piridina (2,3,5,6-tetracloro-4(metil sulfonil)-piridina) a una concentración del 0.3%, concluyendo que los efectos sobre la capa de barniz, medidos en base a los cambios superficiales observados microscópicamente, fueron significativamente menores que en el mismo barniz no tratado con biocida.

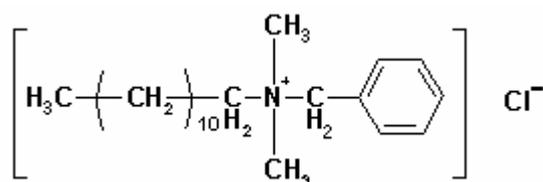
Existen también formulaciones industriales de cubiertas a base de resinas poliméricas sintéticas que incorporan antimicrobianos, como los barnices “antifouling” para barcos, preparados normalmente a base de compuestos orgánicos de cobre y polímeros acrílicos (Yebra *et al.* 2006), o las resinas de uso odontológico (Zhang *et al.* 2006), que suelen formularse con clorhexidina, si bien en ambos casos pueden extraerse escasas conclusiones debido a las diferencias de uso y composición respecto a los barnices de uso artístico.

El presente trabajo pretende iniciar una aproximación al uso de biocidas asociados a las resinas diterpénicas naturales de mayor uso en Bellas Artes. Para ello, se han utilizado muestras sobre portaobjetos de vidrio, preparadas con barniz mezclado con biocida o bien extendido en solución acuosa una vez seco el material filmógeno. Estos soportes se han inoculado con hongos y bacterias seleccionados en estudios previos por su capacidad de desarrollarse y producir transformaciones químicas en los barnices, procedentes de colección y de obras pictóricas del Museo de Bellas Artes de Granada, y posteriormente han sido estudiados mediante microscopía y cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas con el fin de evaluar la eficacia de los productos y sus posibles interferencias con el sustrato.

Los biocidas empleados han sido cloruro de benzalconio, ortofenilfenol (Preventol ON) y naftenato de tributil estaño (Metatín N 5810/101), todos ellos de amplísimo uso en restauración y representativos de los principales grupos químicos de sustancias empleadas en este campo (Caneva *et al.* 1994, 1998, 2005).

### 6.1.1 Cloruro de benzalconio

El cloruro de benzalconio es una sal de amonio cuaternario, comercializada como mezcla de cloruros de alquildimetil (bencil) amonio, de pesos moleculares variables dependiendo de la longitud de los grupos alquílicos. Se presenta en solución acuosa al 50% de sustancia activa, suministrada por Caremi Pigmentos (Sevilla).



A las dosis de empleo es incoloro e inodoro. Es fácilmente soluble en agua, etanol y acetona, dando soluciones estables ante la luz, temperatura o largo tiempo de almacenamiento. La actividad microbiocida de los compuestos cuaternarios de amonio se explica por su carácter catiónico, que interfiere con las membranas biológicas, determinando cambios de estructura y permeabilidad. Es incompatible con sustancias aniónicas como muchos jabones, alcoholes o sulfonatos y compatible con detergentes catiónicos y no iónicos. Aumenta su actividad si se utiliza en un

ambiente alcalino y con el incremento de la temperatura, por lo que se aconseja su empleo en caliente o nebulizado en vapor de agua.

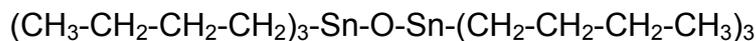
Es un agente tensioactivo y emulsionante, propiedades muy importantes para la acción desinfectante. Sus soluciones agitadas dan lugar a la formación de espuma, tendiendo el producto a ser fuertemente absorbido y a distribuirse sobre la superficie donde se aplica. Esta propiedad es muy útil en algunas aplicaciones, ya que forma en la superficie tratada una pátina de antiséptico que protege durante largo tiempo.

#### Dosificación y usos

Es un bactericida y fungicida extremadamente eficaz. Debido a su amplio campo de acción, se utiliza en piedra, pintura al fresco, terracotas, intónacos, y en general sobre cualquier superficie que se necesite desinfectar. Se emplea normalmente en soluciones acuosas, solo o junto con otros reactivos e inertes. Las concentraciones de uso son variables según la especie infectante de la obra a tratar, siendo aconsejable efectuar pruebas preliminares para determinarla, si bien se ha verificado una óptima acción biocida a una concentración del 5%. También se emplea en mezclas para papetas de limpieza de aplicación superficial, como la "AB 57", fórmula de indiscutible éxito del *Istituto Centrale per il Restauro* de Roma (Caneva *et al.* 1994, 1998, 2005).

### *6.1.2 Metatín N 5810/101*

Metatín N, también llamado Biotin N, es un preparado concentrado líquido para la producción de soluciones desinfectantes. El principio activo es una combinación de tributilestaño naftenato con un compuesto de nitrógeno orgánico (Pm 596).



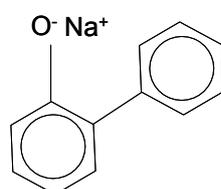
Su aspecto es el de un líquido claro, amarillo pardo, que da soluciones claras en todas las proporciones con los disolventes comunes y en agua. Es estable en un amplio intervalo de pH (4 a 11) y temperatura ( $-20^\circ\text{C}$  a  $+80^\circ\text{C}$ ) y puede considerarse una sustancia tóxica (LD 50 aguda oral  $>900$  mg/kg calc), debiendo en su manipulación utilizarse mascarilla protectora y ventilación suficiente.

Presenta compatibilidad limitada con tensioactivos aniónicos y con otros desinfectantes como la cal clorinada y el ácido hipocloroso. La dureza del agua también puede influir sobre el producto y debe ser previamente testada si se utiliza como diluyente.

Metatín N presenta un amplio espectro de actividad contra algas, hongos y bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, actuando por interferencia del estaño con las proteínas. La dosificación óptima depende de numerosos factores, como la naturaleza de las superficies, los procedimientos de aplicación, la formulación del producto y el grado de contaminación ambiental. La experiencia práctica ha mostrado buenos resultados con soluciones al 0,3 -1% del producto (Caneva *et al.* 1994, 1998, 2005).

### 6.1.3 Preventol ON

El principio activo del Preventol ON es la sal sódica del tetrahidrato de ortofenilfenol (2-fenil fenolato de sodio). Se presenta en escamas incoloras y casi inodoras y es soluble en agua y alcoholes. Presenta una toxicidad reducida, no siendo irritante para la piel o mucosas a las concentraciones de uso.



El ortofenil fenol es principalmente un bactericida y fungicida utilizado frecuentemente como desinfectante industrial y agrícola, que actúa por desorganización de la estructura de las membranas biológicas. Es corrosivo para los metales y en el campo de la restauración se ha empleado en pintura mural, temples y diversos tipos de piedra ornamental. Se recomienda su uso a una concentración del 2-5% (Caneva *et al.* 1994, 1998, 2005).

## 6.2 Material y métodos

### 6.2.1 Preparación de los barnices

Los barnices estudiados (colofonia, trementina veneciana, sandárac y copal de Manila) se han preparado con los mismos productos y recetas descritos en los capítulos 3 y 4 del presente estudio.

### 6.2.2 Microorganismos estudiados

Los microorganismos se han seleccionado en base a su capacidad para desarrollarse y provocar cambios químicos en las resinas, según se ha determinado en anteriores capítulos de la presente tesis doctoral, y han sido los siguientes:

Colofonia: *Chrysonilia sitophila* y *Bacillus amyloliquefaciens*

Trementina veneciana: *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium chrysogenum* y *Arthrobacter oxydans*

Sandárac: *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium chrysogenum* y *Streptomyces cellulofans*

Copal de Manila: *Chrysonilia sitophila*, *Phoma herbarum* y *Arthrobacter oxydans*

Los microorganismos *Penicillium chrysogenum* (*Pc*) (CECT-2306), *Streptomyces cellulofans* (*Sc*) (CECT-3242), *Bacillus amyloliquefaciens* (*Ba*) (CECT-493) y *Arthrobacter oxydans* (*Ao*) (CECT-386) proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). *Chrysonilia sitophila* (*Cs*) y *Phoma herbarum* (*Ph*) provienen de obras del Museo de Bellas Artes de Granada afectadas por procesos de biodeterioro.

### 6.2.3 Preparación de las muestras

Con los tres biocidas seleccionados se han preparado disoluciones al 3% v/v (Metatín N y cloruro de benzalconio) y al 3% p/v (Preventol ON) en agua destilada. Estas soluciones han sido aplicadas a pincel sobre la superficie de soportes consistentes en portaobjetos de vidrio de tamaño estándar (24x80mm) barnizados con las resinas objeto de estudio, que han sido preparados según lo descrito en los capítulos 3 y 4 de la tesis doctoral. Los barnices se dejaron secar en oscuridad antes de aplicar los biocidas sobre ellos. Se han desechado para el análisis las muestras de sandárac y copal de Manila tratadas con Preventol ON y las de sandárac con Metatín N por haberse observado un aumento de la opacidad del barniz al interactuar con estos productos.

Igualmente, se han empleado en el estudio muestras de barniz con biocida incorporado. Soluciones en etanol al 10% (p/v) de Preventol ON y al 10% (v/v) de Metatín y cloruro de benzalconio se han mezclado con los barnices para obtener productos con biocida incorporado a una concentración del 3% (v/v). Para favorecer la preparación de las mezclas, se ha añadido también una pequeña cantidad del tensioactivo no iónico Tween 80 (0.1% v/v), excepto en los barnices al alcohol (copal de Manila y sandárac) y las muestras tratadas con Preventol ON. Estos barnices con biocida han sido aplicados a pincel sobre la superficie de portaobjetos de vidrio de tamaño estándar (24x80mm) y se han dejado secar en oscuridad durante 90 días. No se ha podido obtener una mezcla homogénea del Preventol ON con los barnices de sandárac y copal de Manila, por lo que estas muestras no se han empleado para el estudio.

La obtención de esporas fúngicas y suspensiones bacterianas, así como la inoculación de los microorganismos en los soportes de cultivo, se ha realizado según lo descrito en los capítulos 3 y 4 de la tesis doctoral.

### *6.2.4 Condiciones de cultivo*

Las condiciones de cultivo, para hongos y bacterias, fueron 28°C de T<sup>a</sup> y humedad relativa del 75% durante 15 días en oscuridad.

### *6.2.5 Técnicas de análisis*

#### *6.2.5.1 Control de crecimiento*

Se ha realizado un seguimiento microscópico a los cultivos fúngicos previamente seleccionados por haber mostrado capacidad de crecimiento en los barnices, con el fin de estudiar la producción de micelio a partir de la suspensión inicial de esporas en agua destilada en presencia de biocidas. Todos los cultivos fueron observados a tiempo cero, 24 horas, 48 horas, cinco, diez y quince días con un microscopio Nikon Eclipse TS100 equipado con cámara digital Nikon DS-5M.

#### *6.2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)*

Tras el período de incubación, las muestras para análisis, correspondientes a los patrones y muestras inoculadas con microorganismos, se obtuvieron raspando la superficie de los barnices con un bisturí estéril y se trataron según los procedimientos descritos en los capítulos 3 y 4 de la tesis doctoral.

## 6.3 Resultados y discusión

### 6.3.1 Control de crecimiento

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 1-4 y Figuras 1-2:

**Tablas 1-4.** Crecimiento de los hongos estudiados en los barnices tratados con los biocidas incorporados y extendidos en superficie (ext) (- no desarrollo, +/- desarrollo escaso).

#### 1-Colofonia

	<i>C. sitophila</i>
Metatín N	-
Cloruro benzalconio	-
Preventol ON	-
Metatín N (ext)	+/-
Cloruro benzalconio (ext)	+/-
Preventol ON (ext)	+/-

#### 2-Trementina veneciana

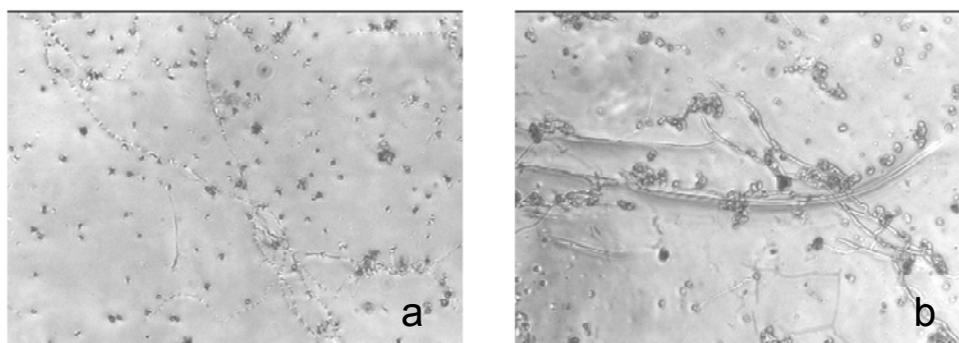
	<i>C. sitophila</i>	<i>P. chrysogenum</i>
Metatín N	-	-
Cloruro benzalconio	-	-
Preventol ON	-	-
Metatín N (ext)	-	-
Cloruro benzalconio (ext)	-	-
Preventol ON (ext)	+/-	+/-

#### 3-Sandárac

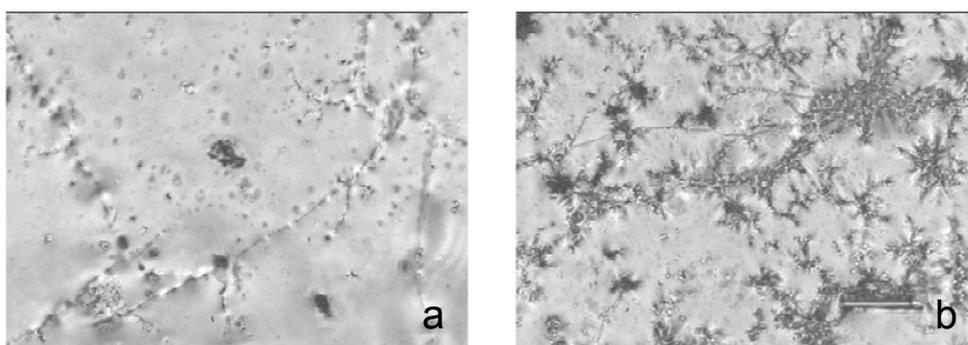
	<i>C. sitophila</i>	<i>P. chrysogenum</i>
Cloruro benzalconio	-	-
Cloruro benzalconio (ext)	-	-
Metatín N	-	-

#### 4-Copal Manila

	<i>C. sitophila</i>	<i>P. herbarum</i>
Cloruro benzalconio	-	-
Cloruro benzalconio (ext)	-	-
Metatín N	-	-
Metatín N (ext)	-	-



**Figura 1.** *Chrysonilia sitophila* en colofonia tratada en superficie con Metatín N (a) y Preventol ON (b) a los cinco días de incubación



**Figura 2.** *Chrysonilia sitophila* (a) y *Penicillium chrysogenum* (b) en trementina veneciana tratada en superficie con Preventol ON a los cinco días de incubación

### 6.3.2 Cromatografía de gases /espectrometría de masas

En el análisis por GC/MS la cantidad relativa de cada uno de los ácidos con respecto a los demás se ha expresado en área de pico normalizada  $N_i$ , definida como porcentaje de área correspondiente a cada componente en relación al área total:

$$N_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100$$

Donde  $A_i$  es el pico de área de cada uno de los  $n$  compuestos encontrados en el cromatograma. Para cada barniz se han incluido dos controles por biocida ensayado, uno preparado mezclando el biocida con la resina y otro extendiéndolo sobre el barniz, según el procedimiento descrito en el apartado correspondiente. Estos patrones se han inoculado con una solución de agua destilada e incubados en idénticas condiciones al resto de muestras, obteniéndose así el patrón de composición de los barnices en ausencia de microorganismos. Se han incluido también en el análisis controles de los barnices no inoculados con microorganismos y no tratados con biocidas para evaluar los posibles efectos producidos por el tratamiento biocida en las resinas. Para cuantificar los cambios en la composición se ha establecido el parámetro  $\Delta N_i$ , definido como el incremento o disminución de  $N_i$  para cada analito en relación a los valores de las muestras patrón correspondientes ( $N_{io}$ ).

$$\Delta N_i = N_i - N_{io}$$

#### 6.3.2.1 Colofonia

Los cambios en la composición de los patrones (no inoculados con microorganismos) tratados con biocida respecto al patrón sin biocida aparecen en la Tabla 5. No se han registrado cambios significativos en la composición que hayan supuesto un aumento de las formas oxidadas de los diterpenos abietanos. Tan sólo en los tratamientos con cloruro de benzalconio y Metatín N extendido se ha observado un ligero ascenso del ácido 7-oxo-dehidroabiético. Otro dato de interés es el descenso de la cantidad relativa de ácido dehidroabiético en algunas muestras, especialmente las tratadas con Metatín N y Preventol ON incorporado.

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Colofonia</b>	<b>58.00</b>	<b>9.76</b>	<b>2.94</b>	<b>9.46</b>	<b>6.07</b>
Cloruro benzalconio	53.87	6.69	2.09	6.34	7.62
Cloruro benzalconio (ext)	47.69	3.09	2.58	7.49	10.42
Metatín N	43.20	23.68	2.59	5.47	2.82
Metatín N (ext)	47.60	4.62	2.83	4.19	9.06
Preventol ON	40.59	16.54	0.49	4.08	1.75
Preventol ON (ext)	52.02	4.47	3.04	4.17	5.34

**Tabla 5.** Análisis por GC-MS (valores expresados en *Ni*) de los diterpenos abietanos del barniz de colofonia tratado con los biocidas cloruro de benzalconio, Metatín N y Preventol ON incorporados al barniz y extendidos (ext,) en relación a la composición del barniz en ausencia de biocidas. (AA=Ácido abiético; DHA=Ácido dehidroabiético, 7-oxo-DHA=Ácido 7-oxo-dehidroabiético; 7-OH-DHA=Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético)

Los resultados correspondientes a las muestras tratadas con biocida e inoculadas con microorganismos se muestran en las Tablas 6-11. Los datos relativos a las muestras fúngicas en las que no se ha registrado crecimiento no se han incluido por ser muy similares a los de los patrones correspondientes.

En el estudio realizado en el capítulo tercero, con el barniz no tratado con biocidas e inoculado con microorganismos, se observó una clara disminución de la cantidad relativa de los ácidos abiético (AA) y dehidroabiético (DHA) y un fuerte aumento de los diterpenos oxidados, especialmente del 7-oxo-dehidroabiético (7-oxo-DHA) y 7-oxo-15-hidroxi-dehidroabiético (7-oxo-15-OH-DHA). Sufrieron menos cambios los diterpenos monohidroxilados (7-hidroxi-dehidroabiético (7-OH-DHA) y 15-hidroxi-dehidroabiético (15-OH-DHA), que sólo aumentaron ligeramente en los cultivos bacterianos.

Estos resultados difieren significativamente con los obtenidos en presencia de biocidas. El crecimiento del hongo *C.sitophila* se ha visto totalmente inhibido en las muestras con biocida incorporado, mientras que las preparadas con los productos extendidos se ha observado un muy escaso desarrollo (Figura 1). En estas últimas se ha registrado un ligero incremento del DHA y un descenso del ácido abiético, pero no se ha producido un aumento de las formas oxidadas, lo que relacionamos con la eficacia de los tratamientos ensayados, que si bien inhiben de forma importante la

actividad biológica del microorganismo, no han impedido totalmente su desarrollo, como ha sucedido en los barnices con biocida incorporado.

En *B. amyloliquefaciens* tampoco se ha dado el gran incremento de las formas oxidadas observado en el estudio prececente ( $\Delta Ni$  7-O-DHA=32.64 e  $\Delta Ni$  15-OH-7-oxo-DHA=14.50). No obstante, se han registrado ligeros cambios en la composición en las muestras tratadas con Metatín N (ext) ( $Ni$  15-OH-DHA=7.34%,  $\Delta Ni$ =3.15;  $Ni$  7-oxo-DHA=11.70,  $\Delta Ni$ =2.64) y Preventol ON ext ( $Ni$  15-OH-DHA=7.77,  $\Delta Ni$ =3.60;  $Ni$  7-oxo-DHA=7.80,  $\Delta Ni$ =2.46), que sugieren un mínimo de actividad biológica, si bien muy escasa en relación a los datos correspondientes a las muestras sin biocida. También se ha observado una tendencia general de aumento del ácido dehidroabiético en las muestras tratadas con este microorganismo.

Resultados similares se obtuvieron en un estudio previo realizado por nuestro proyecto de investigación (Doménech-Carbó *et al.* 2006) con las bacterias *Streptomyces cellulofans*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Arthrobacter oxydans* y micelios fúngicos de *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium cladosporoides* y *Trichoderma pseudokoningii* inoculados sobre resina de colofonia tratada en superficie con los biocidas New Des (cloruro de benzalconio), Biotin N (otro nombre comercial del naftenato de tributil estaño) y Nipagina (parahidroxibenzoato de metilo). Los resultados analíticos (obtenidos mediante pirólisis-GC/MS) mostraron la eficacia de los tratamientos con Biotin N sobre el crecimiento de hongos y bacterias, sin cambios apreciables en la composición de las resinas. Sin embargo, se registró una escasa efectividad del tratamiento con cloruro de benzalconio para los hongos, habiéndose encontrado en estas muestras altas tasas de compuestos oxidados producidos a partir de los abietanos originales de la colofonia.

### 6-Colofonia-Cloruro benzalconio

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>53.87</b>	<b>6.69</b>	<b>2.09</b>	<b>6.34</b>	<b>7.62</b>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	57.13 (+3.26)	2.44 (-4.25)	1.59 (-0.50)	6.77 (+0.43)	6.08 (-1.54)

**7- Colofonia-Cloruro benzalconio (ext.)**

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>47.69</b>	<b>3.09</b>	<b>2.58</b>	<b>7.49</b>	<b>10.42</b>
<i>C.sitophila</i>	57.17 (+9.48)	0.91 (-2.18)	3.10 (+0.52)	6.07 (-1.42)	9.55 (-0.87)
<i>B.amyloliquefaciens</i>	55.96 (+8.27)	1.58 (-1.51)	2.43 (-0.15)	8.52 (+1.03)	10.14 (-0.28)

**8-Colofonia-Metatín N**

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>43.20</b>	<b>23.68</b>	<b>2.59</b>	<b>5.47</b>	<b>2.82</b>
<i>B.amyloliquefaciens</i>	43.66 (+0.46)	36.77 (+13.09)	0.97 (-2.62)	4.50 (-0.97)	0.62 (-2.20)

**9-Colofonia-Metatín N (ext.)**

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>47.60</b>	<b>4.62</b>	<b>2.83</b>	<b>4.19</b>	<b>9.06</b>
<i>C.sitophila</i>	58.88 (+11.28)	0.77 (-3.85)	3.34 (+0.51)	5.55 (+1.36)	8.85 (-0.21)
<i>B.amyloliquefaciens</i>	55.66 (+8.06)	1.01 (-3.61)	3.13 (+0.30)	7.34 (+3.15)	11.70 (+2.64)

**10-Colofonia-Preventol ON**

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
Patrón	<b>40.59</b>	<b>16.54</b>	<b>0.49</b>	<b>4.08</b>	<b>1.75</b>
<i>B.amyloliquefaciens</i>	53.20 (+12.61)	11.52 (-5.02)	1.11 (+0.62)	3.25 (-0.83)	0.57 (-1.18)

**11-Colofonia-Preventol ON (ext.)**

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
Patrón	<b>52.02</b>	<b>4.47</b>	<b>3.04</b>	<b>4.17</b>	<b>5.34</b>
<i>C.sitophila</i>	56.35 (+4.33)	11.36 (+6.89)	1.78 (+1.26)	5.31 (+1.14)	2.97 (2.37)
<i>B.amyloliquefaciens</i>	54.47 (+2.45)	2.04 (-2.43)	2.03 (-1.01)	7.77 (+3.60)	7.80 (+2.46)

**Tablas 6-11.** Análisis por GC-MS de los diterpenos abietanos del barniz de colofonia tratado con los biocidas cloruro de benzalconio, Metatín N y Preventol ON incorporados al barniz y extendidos en superficie (ext.) e inoculado con microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis). (AA=Ácido abiético; DHA=Ácido dehidroabiético, 7-oxo-DHA= Ácido 7-oxo-dehidroabiético; 7-OH-DHA= Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético)

**6.3.2.2 Trementina veneciana**

Los resultados analíticos correspondientes a la trementina veneciana tratada con los biocidas en relación al barniz original se muestran en la Tabla 12. Los biocidas no han provocado cambios de importancia en las formas más oxidadas de los diterpenos presentes composición del barniz. Sin embargo se ha detectado en las muestras patrón tratadas con cloruro de benzalconio (ext), Metatín N (ext), y Preventol ON (incorporado) un descenso de la cantidad de ácido abiético acompañado de un aumento del ácido dehidroabiético, lo que sugiere una interacción oxidativa de estos tratamientos biocidas con el barniz y dificulta el establecer comparaciones con las resinas inoculadas con microorganismos, ya que el principal efecto observado en el capítulo correspondiente fue precisamente ése. La muestra tratada con Metatín N

mezclado ha sufrido una disminución del ácido dehidroabiético, tal y como ha ocurrido en la colofonia.

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Trementina veneciana</b>	<b>31.25</b>	<b>8.18</b>	<b>2.36</b>	<b>4.98</b>	<b>2.45</b>
Cloruro benzalconio	33.67	10.70	0.49	1.50	0.71
Cloruro benzalconio (ext)	40.62	0	2.20	2.22	4.14
Metatín N	21.89	20.16	0.47	1.78	0.30
Metatín N (ext)	34.16	1.58	2.91	3.80	3.38
Preventol ON	41.05	2.01	0.35	1.27	0.34
Preventol ON (ext)	33.84	6.84	2.74	4.66	2.04

**Tabla 12.** Análisis por GC-MS (valores expresados en *Ni*) de los diterpenos abietanos de la trementina veneciana tratada con los biocidas cloruro de benzalconio, Metatín N y Preventol ON incorporados al barniz y extendidos en superficie (ext.) en relación a la composición del barniz no tratados con biocidas (AA=Ácido abiético; DHA=Ácido dehidroabiético, 7-oxo-DHA= Ácido 7-oxo-dehidroabiético; 7-OH-DHA= Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético).

Los resultados correspondientes a las muestras inoculadas con microorganismos se muestran en las Tablas 13-18. No se han incluido los datos relativos a las muestras fúngicas en las que no se ha registrado crecimiento por ser muy similares a los de los patrones correspondientes.

En los resultados obtenidos en las muestras no tratadas con biocidas (capítulo 3), el principal cambio registrado fue la desaparición del pico correspondiente al ácido abiético, con un aumento del dehidroabiético, acompañada de una moderada tendencia a producir derivados oxidados en posición 7 ( $\Delta Ni=3.28$  en *C. sitophila*), y en el caso del hongo *C. sitophila*, también en posición 15 ( $\Delta Ni=4.62$ ).

En las resinas tratadas con biocidas se ha inhibido totalmente el crecimiento de los hongos *C. sitophila* y *P. chrysogenum*, a excepción de las preparadas con Preventol ON extendido, en las que se ha observado un moderado desarrollo de los dos microorganismos (Figura 2). En estas muestras se ha producido una desaparición del pico correspondiente al ácido abiético ( $\Delta Ni=-6.84$ ), si bien los derivados oxidados del ácido dehidroabiético no han aumentado en ningún caso, lo que se puede relacionar con la actividad fúngica y a una escasa eficacia del tratamiento aplicado de esta forma. La bacteria *Arthrobacter oxydans* ha mostrado un comportamiento similar en el tratamiento con Preventol ON (ext) y Metatín N (ext), lo que puede

indicar una menor utilidad del tratamiento biocida en estos casos, no habiéndose observado cambios significativos en el resto de muestras.

### 13-T. veneciana-Cloruro benzalconio

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>33.67</b>	<b>10.70</b>	<b>0.49</b>	<b>1.50</b>	<b>0.71</b>
<i>A. oxydans</i>	36.10 (+2.43)	9.36 (-1.34)	0.73 (+0.24)	1.73 (+0.23)	0.50 (-0.21)

### 14-T. veneciana-Cloruro benzalconio (ext.)

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>40.62</b>	<b>0</b>	<b>2.20</b>	<b>2.22</b>	<b>4.14</b>
<i>A. oxydans</i>	46.69 (+6.07)	0	2.84 (+0.64)	3.07 (+0.85)	2.77 (-1.37)

### 15-T. veneciana -Metatín N

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>21.89</b>	<b>20.16</b>	<b>0.47</b>	<b>1.78</b>	<b>0.30</b>
<i>A. oxydans</i>	24.29 (+2.40)	18.80 (-1.36)	0.78 (+0.31)	2.31 (+0.53)	0.44 (+0.14)

### 16-T. veneciana-Metatín N (ext.)

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
<b>Patrón</b>	<b>34.16</b>	<b>1.58</b>	<b>2.91</b>	<b>3.80</b>	<b>3.38</b>
<i>A. oxydans</i>	39.33 (+5.17)	0 (-1.58)	2.75 (-0.24)	2.87 (-0.93)	3.06 (-0.32)

**17-T. veneciana-Preventol ON**

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
Patrón	<b>41.05</b>	<b>2.01</b>	<b>0.35</b>	<b>1.27</b>	<b>0.34</b>
<i>A.oxydans</i>	36.71 (-4.34)	2.77 (+0.76)	0.66 (+0.31)	1.83 (+0.56)	0.57 (+0.23)

**18-T. veneciana-Preventol ON (ext.)**

	DHA	AA	7-OH-DHA	15-OH-DHA	7-oxo-DHA
Patrón	<b>33.84</b>	<b>6.84</b>	<b>2.74</b>	<b>4.66</b>	<b>2.04</b>
<i>C.sitophila</i>	35.42 (+1.58)	0 (-6.84)	2.43 (-0.31)	2.69 (-1.97)	2.51 (+0.47)
<i>P.chrysogenum</i>	31.28 (-2.56)	0 (-6.84)	2.36 (-0.38)	2.24 (-2.42)	2.55 (+0.51)
<i>A.oxydans</i>	31.16 (-2.68)	0 (-6.84)	2.76 (+0.02)	2.84 (-1.82)	3.63 (+1.59)

**Tablas 13-18.** Análisis por GC-MS de los diterpenos abietanos de la trementina veneciana tratada con los biocidas cloruro de benzalconio, Metatín N y Preventol ON incorporados al barniz y extendidos en superficie (ext.) e inculada con microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis). (AA=Ácido abiético; DHA=Ácido dehidroabiético, 7-oxo-DHA= Ácido 7-oxo-dehidroabiético; 7-OH-DHA= Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético).

### 6.3.2.3 Sandáracas

En la Tabla 19 se muestran los resultados analíticos correspondientes a la sandáracas tratada con los biocidas en relación al barniz original. No se han observado cambios de importancia como resultado de la interacción de los tratamientos biocidas con el barniz.

	Manool	Ac..sandaracopimárico	Ac. isopimárico	OH-sandaracopimárico
Sandaraca	<b>28.92</b>	<b>40.68</b>	<b>17.16</b>	<b>13.25</b>
Cloruro Benzalconio	36.13	40.54	15.12	8.19
Cloruro Benzalconio (ext)	28.51	47.85	10.90	12.73
Metatín N	29.37	43.43	18.21	8.98

**Tabla 19.** Análisis por GC-MS de los principales diterpenos del barniz de sandáracas tratado con los biocidas cloruro de benzalconio incorporados al barniz y extendidos en superficie (ext), y Metatín N (mezclado) en relación a la composición del barniz no tratado con biocidas (valores expresados en Ni).

Los resultados correspondientes a las muestras inoculadas con microorganismos se muestran en las Tablas 20-22. Los datos relativos a las muestras fúngicas (*Chrysonilia sitophila* y *Penicillium chrysogenum*), en las que no se ha registrado crecimiento, no se han incluido por ser muy similares a los de los patrones correspondientes, lo que demuestra la eficacia de los tratamientos ensayados. En las muestras correspondientes a la bacteria *S. cellulofans* se han producido cambios en la composición del barniz dispersos y de dudosa interpretación. El principal cambio observado en el capítulo cuarto de la presente tesis doctoral en los hongos con crecimiento y las bacterias *A. oxydans* y *S. cellulofans* inoculados sobre sandáracas no tratada con biocida fue la gran disminución del pico correspondiente al derivado hidroxilado del ácido sandaracopimárico, lo cual no ha ocurrido después del tratamiento con los biocidas estudiados.

**20-Sandáracas-Cloruro benzalconio**

	Manool	Ac..sandaracopimárico	Ac. isopimárico	OH-sandaracopimárico
Patrón	<b>36.13</b>	<b>40.54</b>	<b>15.12</b>	<b>9.19</b>
<i>S. cellulofans</i>	22.34 (-13.79)	55.96 (+15.42)	8.76 (-6.36)	12.92 (-3.73)

**21-Sandáracas-Cloruro benzalconio (ext.)**

	Manool	Ac..sandaracopimárico	Ac. isopimárico	OH-sandaracopimárico
Patrón	<b>28.51</b>	<b>47.85</b>	<b>10.90</b>	<b>12.73</b>
<i>S. cellulofans</i>	24.54 (-3..97)	49.94 (+2.09)	10.41 (-0.49)	15.10 (+2.37)

**22-Sandáracas-Metatín N**

	Manool	Ac..sandaracopimárico	Ac. isopimárico	OH-sandaracopimárico
Patrón	<b>29.37</b>	<b>43.43</b>	<b>18.21</b>	<b>8.98</b>
<i>S. cellulofans</i>	18.43 (-10.94)	54.33 (+10..90)	13.58 (-4.63)	13.65 (+4.67)

**Tablas 20-22.** Análisis por GC-MS del barniz de sandáracas tratado con los biocidas cloruro de benzalconio y Metatín N incorporados y entendidos en superficie (ext.) e inoculado con microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis)

### 6.3.2.4 Copal de Manila

En la Tabla 23 se muestran los resultados analíticos correspondientes al copal de Manila tratado con los biocidas, incorporados y extendidos en superficie, en relación al barniz original. Los tratamientos han provocado ciertos cambios en los diterpenos libres presentes en la composición de la resina, siendo el más importante la práctica desaparición del ácido agatálico para dar ácido agático por oxidación del grupo aldehído, reacción bastante favorecida químicamente dada la inestabilidad de estos compuestos. También se ha registrado un ligero aumento de la cantidad relativa del ácido acetoxi agatólico.

Los resultados correspondientes a las muestras inoculadas con microorganismos se muestran en las Tablas 24-27. Los datos relativos a las muestras fúngicas, en las que no se ha registrado crecimiento, no se han incluido por ser muy similares a los de los patrones correspondientes. En el estudio realizado en la presente tesis doctoral con el copal de Manila inoculado con microorganismos y no tratado con biocida, el principal cambio observado en la fracción diterpénica libre del barniz fue una gran disminución de la cantidad relativa de ácido agatálico, acompañada del aumento del ácido agático. Otras tendencias observadas fueron el moderado pero generalizado aumento del pequeño pico correspondiente al ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico y un significativo descenso del ácido acetoxi agatólico en los hongos *R. oryzae* y *C. sitophila*.

	Ác.19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico	Ác. agatálico	Ác. agático	Ác acetoxi agatólico
<b><i>Copal de Manila</i></b>	<b>2.97</b>	<b>7.89</b>	<b>42.53</b>	<b>24.19</b>
Cloruro de benzalconio	1.28	0.56	49.05	29.21
Cloruro de benzalconio (ext)	1.77	0.83	51.90	29.68
Metatín N	2.55	0.66	47.35	28.24
Metatín N (ext)	1.44	0.60	50.21	29.70

**Tabla 23.** Análisis por GC-MS (valores expresados en *Ni*) de los diterpenos del barniz de copal de Manila tratado con los biocidas cloruro de benzalconio y Metatín N incorporados al barniz y extendidos en superficie (ext,) en relación a la composición del barniz no tratado con biocidas.

Los tratamientos ensayados han inhibido el crecimiento de los hongos *C. sitophila* y *P. herbarum* en todos los casos, siendo en estas muestras los resultados analíticos muy similares a los patrones. En el caso de la bacteria *A. oxydans* resulta difícil establecer comparaciones con los resultados del capítulo cuarto, ya que el principal cambio que se registró en las muestras inoculadas fue el descenso del ácido agatálico. En cualquier caso, no se han encontrado diferencias significativas en el resto de los componentes de la resina en relación a los patrones tratados con biocida, pudiéndose destacar un pequeño aumento del pequeño pico correspondiente al ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico.

#### 24-C. Manila-Cloruro benzalconio

	Ác.19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico	Ác. agatálico	Ác. agático	Ác acetoxi agatálico
Patrón	<b>1.28</b>	<b>0.56</b>	<b>49.05</b>	<b>29.21</b>
<i>A. oxydans</i>	3.31 (+2.03)	1.07 (+0.51)	45.73 (-3.32)	28.06 (-1.15)

#### 25-C. Manila-Cloruro benzalconio (ext.)

	Ác.19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico	Ác. agatálico	Ác. agático	Ác acetoxi agatálico
Patrón	<b>1.77</b>	<b>0.83</b>	<b>43.90</b>	<b>37.68</b>
<i>A. oxydans</i>	2.16 (+0.39)	0.53 (-0.50)	45.82 (+1.92)	34.13 (-3.55)

#### 26-C. Manila-Metatín N

	Ác.19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico	Ác. Agatálico	Ác. agático	Ác acetoxi agatálico
Patrón	<b>2.55</b>	<b>0.66</b>	<b>40.35</b>	<b>35.24</b>
<i>A. oxydans</i>	3.80 (-1.25)	0.49 (0.17)	40.59 (+0.24)	33.85 (-1.39)

**27-C. Manila-Metatín N (ext.)**

	Ác.19-norlabda- 8(20),13-dien-15-oico	Ác. agatálico	Ác. agático	Ác acetoxi agatólico
<b>Patrón</b>	<b>1.44</b>	<b>0.60</b>	<b>48.21</b>	<b>31.70</b>
<i>A.oxydans</i>	2.40 (+0.96)	0 (-0.60)	50.28 (+2.07)	26.00 (-5.70)

**Tablas 24-27.** Análisis por GC-MS del copal de Manila tratado con los biocidas cloruro de benzalconio y Metatín N incorporados y extendidos en superficie (ext.) e inoculado con microorganismos (valores expresados en  $N_i$  e  $\Delta N_i$ , entre paréntesis)

## Referencias

- Ariño X, Canals A, Gómez-Bolea A, Sáiz Jiménez C (2002). Assesment of the performance of a water-repelent/biocide treatment after 8 years. In: Galán E and Zezza F (Eds). *Protection and conservation of cultural heritage of the mediterranean cities. Proceedings of the 5th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin*, Sevilla, pp 121-125
- Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (1994). *La biología nel restauro*. Nardini editore, Florence, pp 145-175.
- Caneva G, Nugari MP, Pinna D, Salvadori O (1998). *Il controllo del degrado biologico*. Nardini editore, Florence, pp 1-180.
- Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (2005). *La Biologia vegetale per i Beni Culturali. Biodeterioramento e Conservazione*, Vol. 1. Nardini Editore, Florence, 400pp.
- Commissione Normal (1991). *Raccomandazioni Normal: 30/89. Metodi di controllo del Biodeterioramento*. C.N.R.—I.C.R., Rome, Italy.
- Doménech-Carbó MT, Osete-Cortina L, de la Cruz Cañizares J, Bolívar-Galiano F, Romero-Noguera J, Fernández-Vivas MA, Martín-Sánchez I (2006). Study of the microbiodegradation of terpenoid resin-based varnishes from easel painting using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chemistry*, 385 (7): 1265 – 1280.
- Ferone C, Pansini M, Mascolo MC, Vitale A (2000). Preliminari study on the set up of mortars displaying biocidal activity. In: Fassina V (Ed), *Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Venice, Vol 2, Elsevier, Amsterdam, pp 371-378.
- Gómez-Alarcón G, Blázquez AB, Lorenzo I (1999). Biocides used in the control of microorganisms on stone monuments. In: *Extended abstracts: Of Microbes and art, an international conference on microbiology and conservation*, Florence. pp 228-232.
- Koestler RJ, Salvadori O (1998). Methods of evaluating biocides for the conservation of porous building materials. *Science and tecnology for cultural heritage*, 5 (1): 1963-1968.
- Koestler RJ (2000). Polymers and resins as food for microbes. In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G. (Eds.), *Of Microbes And Art. The Role of Microbial Communities in the*

*Degradation and Protection of Cultural Heritage*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, pp. 153–167.

Krumbein WE y Gross M (1992). Interactions of biocides of biodeterioration microbiota in agar diffusion and rock cube test. *Proceedings of the 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Lisbon, pp 501-509.

Malagodi M, Nugari MP, Altieri y Lonati G (2000). Effects of combined application of biocides and protectives on marble. In: Fassina V (Ed), *Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Venice, Vol 2, Elsevier, Amsterdam, pp 225-233.

Martinez-Ramírez S, Puertas F, Blanco Varela MT, Thompson GE (1998). Effect of dry deposition of pollutants on the degradation of lime mortars with sepiolite. *Cement and concrete research*, 28 (1): 125-133.

Nugari MP, D'Urbano MS, Salvadori O (1993). Test methods for comparative evaluation of biocide treatments. In Thiel MJ (Ed.). *Proceedings of the International UNESCO/RILEM Congress on Conservation of Stone and Others Materials*, E&FN Spon, London, 565-572.

Nugari MP (1999). Interference of antimicrobial agents on stone. In: *Extended abstracts: Of Microbes and Art, an International Conference on microbiology and conservation*, Florence, pp 211-214.

Nugari MP, Salvadori O (2003). Biocides and treatment of stone: limitation and future prospects. In: Koestler, R.J., Koestler, V.H., Charola, E.A.E., Nieto-Fernandez, F.E. (Eds.), *Art, Biology and Conservation: Biodeterioration of Works of Art*. The Metropolitan Museum of Art, New York, pp. 518–535.

Pietrini AM, Ricci S, Bartolini M (1999). Long term evaluation of biocide efficacy on algal growth. In: *Extended abstracts: Of Microbes and art, an international conference on microbiology and conservation*, Florence, pp 238-245.

Quaresima R, Baccante A, Volpe R, Corain B (1997). Realisation and possibility of polymeric metalo-organic matrixes with biocide activity. In: Moropoulou A, Zezza F, Ollias E y Papachristodoulou (Eds.), *Proceedings of the 4th International Symposium on the conservation monuments in the Mediterranean*, Rhodes. Vol 3, pp 323-335.

de Souza A, Gaylarde CC (2002). Biodeterioration of varnished wood with and without biocide: implications for standard test methods. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49: 21-25.

Tiano P (1998). Biodeterioration of monumental rocks: decay mechanisms and control methods. *Science and technology for cultural heritage*, 7 (2): 19-38.

Urzi C, de Leo F (2007). Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. *International Biodeterioration & Biodegradation*, in press.

Warscheid T, Braams J (2000). Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 343–368.

Yebra DM, Kül S, Weinell CE, Dam-Johansen K (2006). Presence and effects of marine microbial biofilms on biocide-based antifouling paints. *Biofouling*, 22 (1-2): 33-41.

Zhang Q, van Palenstein WH, van't Hof MA, Truin GJ (2006). Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review. *Eur J Oral Sci.* 114(6): 449-55.

*Tratamientos biocidas*

---

## 7 Conclusiones

A continuación se indican las conclusiones más importantes obtenidas en la tesis doctoral, correspondientes a los capítulos en que se ha dividido el estudio.

### Colofonia y trementina veneciana

*Chrysonilia sitophila* ha desarrollado micelio a partir de un inóculo de esporas sobre los barnices de colofonia y trementina veneciana. *Penicillium chrysogenum* ha mostrado el mismo comportamiento sólo en este último barniz. El resto de hongos ensayados no mostraron desarrollo observable.

Los hongos mencionados y las bacterias *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Streptomyces cellulofans* han producido cambios químicos en las resinas.

En la colofonia dichos cambios han consistido en un aumento importante de las formas oxidadas del ácido dehidroabiético: los ácidos 7-oxo-dehidroabiético y 15-hidroxi-7-oxo-dehidroabiético, acompañada de una fuerte disminución de los abietanos originales, los ácidos abiético y dehidroabiético, habiendo mostrado las bacterias una tasa de transformación superior a la de los hongos.

En la trementina de Venecia el principal fenómeno observado ha sido la interconversión del ácido abiético en dehidroabiético.

Los abietanos de tipo pimarano de ambas resinas no han sufrido cambios significativos.

## Sandáracas y copal de Manila

*Chrysonilia sitophila*, *Mucor rouxii*, *Penicillium chrysogenum* y *Rhizopus oryzae* han desarrollado micelio a partir de un inóculo de esporas sobre el barniz de sandáracas. Lo mismo ha ocurrido con *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Chrysonilia sitophila* y *Phoma herbarum* en copal de Manila. El resto de hongos ensayados no mostraron desarrollo observable.

Los hongos mencionados, y las bacterias *Arthrobacter oxydans* y *Streptomyces cellulofans* en la sandáracas, y *Arthrobacter oxydans* en el copal de Manila, han producido cambios químicos en las resinas.

En el barniz de sandáracas, el principal cambio en la fracción diterpénica libre, predominantemente pimaránica, ha sido el descenso de un derivado hidroxilado del ácido sandaracopimárico. No se han observado cambios significativos en la fracción polimérica.

En el copal de Manila, los cambios más importantes en la fracción diterpénica libre afectan al ácido agatálico (aldehído), que se oxida hasta ácido agático, observándose también un aumento del ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico. En la fracción polimérica, el principal cambio observado ha sido un descenso en la cantidad relativa del ácido cis-comúnico.

## Dammar y almáciga

*Chrysonilia sitophila*, *Penicillium chrysogenum* y *Phoma herbarum* han desarrollado micelio a partir de un inóculo de esporas sobre las dos resinas estudiadas. El resto de hongos ensayados no mostraron desarrollo observable.

Los hongos mencionados y las bacterias *Arthrobacter oxydans*, *B. amyloliqueaciens* y *Streptomyces cellulofans* han producido cambios químicos en las resinas.

En el caso del dammar, los hongos han producido principalmente un aumento de las formas del ácido dammarenólico, acompañado de un importante descenso de la cantidad relativa de hidroxidammarenona, excepto en el caso de *Chrysonilia sitophila*. En los componentes pentacíclicos se ha observado un claro aumento de las formas más oxidadas: el ácido ursónico y especialmente el ácido oleanónico. Las bacterias han mostrado tendencias semejantes, si bien de forma más moderada.

En el barniz de almáciga los cambios más importantes se refieren al fuerte aumento de la cantidad relativa de ácido morónico, acompañada de una apreciable disminución en la fracción de nor- $\beta$ -amirona, ácido oleanónico e hidroxidammarenona. Los cambios observados en los componentes tetracíclicos han sido poco destacables.

## Tratamientos biocidas

### *Colofonia*

Los biocidas cloruro de benzalconio, Preventol ON y Metatín N, mezclados y extendidos sobre el barniz, no han producido cambios oxidativos en el barniz de colofonia en ausencia de microorganismos.

Los biocidas ensayados han inhibido el desarrollo de *Chrysonilia sitophila* sobre el barniz de colofonia. En el caso de los biocida extendidos sobre la resina se ha observado un escaso crecimiento fúngico, lo que denota una menor eficacia de los tratamientos aplicados de esta forma.

Los resultados analíticos no han mostrado cambios significativos en las resinas inoculadas con *Chrysonilia sitophila* y *Bacillus amyloliquefaciens* respecto a los patrones, no habiéndose registrado el aumento de formas oxidadas de los diterpenos abietanos observada en el estudio realizado sin biocidas.

### *Trementina veneciana*

Los tratamientos con cloruro de benzalconio extendido sobre el barniz y Preventol ON mezclado, han producido una oxidación del ácido abiético hasta dehidroabiético en la trementina veneciana no inoculada con microorganismos.

Los biocidas ensayados (cloruro de benzalconio, Preventol ON, y Metatín N, mezclados y extendidos sobre el barniz) han mostrado un efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos *Chrysonilia sitophila* y *Penicillium chrysogenum*. Sólo se ha registrado un crecimiento escaso de ambos microorganismos en la muestra correspondiente al Preventol ON extendido sobre el barniz.

Los resultados analíticos no han mostrado cambios significativos en las resinas inoculadas con los hongos mencionados y la bacteria *Arthrobacter oxydans* respecto a los patrones, excepto en el caso de las muestras tratadas con Preventol ON extendido sobre el barniz, en las que se ha registrado un descenso del ácido abiético.

## *Conclusiones*

### *Sandáracas*

Los tratamientos biocidas no han producido cambios de importancia en la composición de la sandáracas.

Los biocidas ensayados (cloruro de benzalconio y Metatín N, incorporados al barniz y cloruro de benzalconio extendido sobre el barniz) han inhibido el crecimiento de los hongos *Chrysonilia sitophila* y *Phoma herbarum* sobre el barniz de sandáracas en todos los casos.

Los resultados analíticos han mostrado escasas alteraciones en las resinas inoculadas con los hongos mencionados y la bacteria *Streptomyces cellulofans* respecto a los patrones.

### *Copal de Manila*

Los tratamientos biocidas han producido en el barniz una oxidación del ácido agatálico hasta agático en el copal de Manila no inoculado con microorganismos.

Los biocidas ensayados (cloruro de benzalconio y Metatín N, mezclados y extendidos sobre el barniz) han inhibido el crecimiento de los hongos *Chrysonilia sitophila* y *Phoma herbarum* sobre el copal de Manila en todos los casos.

Los resultados analíticos no han mostrado cambios significativos en las resinas inoculadas con los hongos mencionados y la bacteria *Arthrobacter oxydans* respecto a los patrones.

---

## 8 Conclusioni

A continuazione s'indicano le conclusioni piu importanti della tesis doctoral, corrispondenti ai capitoli dello studio:

### Colofonia e trementina veneziana

*Chrysonilia sitophila* ha generato micelio, in seguito allo sviluppo di un inoculo di spore, sulle vernice di colofonia e trementina veneziana. *Penicillium chrysogenum* ha mostrato lo stesso comportamento solo sulla trementina veneziana soltanto. Gli altri funghi studiati non hanno mostrato sviluppo osservabile.

I funghi mencionati e i batteri *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus amyloliquefaciens* ed *Streptomyces cellulofans* hanno prodotto cambi chimici nelle resine.

Nella colofonia questi cambi sono stati uno aumento importante nelle forme ossidate dell'acido deidroabietico: 7-osso-deidroabietico e 15-idrossi-7osso-deidroabietico, inoltre una forte diminuzione degli abietani originali, gli acidi abietico e deidroabietico. I batteri hanno mostrato una capacità di trasformazione superiore a quella dei funghi.

Nella trementina veneziana, il principale cambio osservato é stato la conversione dell'acido abietico in deidroabietico.

Gli abietani di tipo pimarano non hanno prodotto cambi rilevanti.

## Sandaraca e copale Manila

*Chrysonilia sitophila*, *Mucor rouxii*, *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus oryzae* hanno generato miceli, in seguito allo sviluppo di un inoculo di spore, sul vernice di sandaraca. *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Chrysonilia sitophila* e *Phoma herbarum* hanno generato micelio sul copale Manila. Gli altri funghi studiati non hanno mostrato sviluppo osservabile.

I funghi menzionati, e i batteri *Arthrobacter oxydans* ed *Streptomyces cellulofans* sulla sandaraca e *Arthrobacter oxydans* sul copale Manila, hanno prodotto cambi chimici nelle resine.

Nella sandaraca, il cambio più importante tra i componenti terpenici liberi, principalmente pimarani, è stato una forte diminuzione di un derivato idrossilato dell'acido sandaracopimarico. La frazione polimerica non ha presentato cambi importanti.

Nel copale Manila, i cambi più importanti tra i componenti terpenici liberi, sono stati una ossidazione dell'acido agatalico, producendo acido agatico e un aumento dell'acido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico. Nella frazione polimerica il principale cambio osservato è stato una diminuzione della quantità relativa dell'acido cis-comunico.

## Dammar e mastice

*Chrysonilia sitophila*, *Penicillium chrysogenum* e *Phoma herbarum* hanno generato miceli, in seguito allo sviluppo di un inoculo di spore, sulle vernice di dammar e mastice. Gli altri funghi studiati non hanno mostrato sviluppo osservabile.

I funghi menzionati e i batteri *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus amyloliqueaciens* e *Streptomyces cellulofans* hanno prodotto cambi chimici nelle resine.

Nel dammar, i funghi (tranne *Chrysonilia sitophila*) hanno prodotto un aumento dell'acido dammarenolico accompagnato da una importante diminuzione della quantità relativa di idrossidammarenona. Nei componenti tetraciclici abbiamo osservato un importante aumento delle forme più ossidate: l'acido ursonico e soprattutto l'oleanonico. I batteri hanno mostrato un comportamento simile, sebbene in forma più lieve.

Nel mastice, i cambi più importanti riguardano il forte aumento della quantità relativa di acido moronico e la diminuzione di nor  $\beta$  amirone, l'acido oleanonico e l'idrossidammarenone. I cambi osservati nella frazione tetraciclica sono stati poco significativi.

## Trattamenti biocidi

### Colofonia

I biocidi cloruro di benzalconio, Preventol ON y Metatín N, mescolati ed estesi sul vernice non hanno prodotto cambi ossidativi importanti nella composizione della colofonia.

I biocidi studiati hanno mostrato effetto inibitorio sullo sviluppo di *Chrysonilia sitophila* sul vernice di colofonia. Nei campioni trattati con biocidi stesi sulla resina è stato osservato uno scarso sviluppo fungino, che denota una minore efficacia dei trattamenti applicati in questa forma.

I risultati analitici non hanno mostrato cambi ossidativi rilevanti nei campioni inoculate con *Chrysonilia sitophila* e *Bacillus amyloliquefaciens*, come quelli osservati nello studio realizzato senza biocidi.

### Trementina veneziana

I trattamenti con cloruro de benzalconio (esteso) e Preventol ON (mescolato) hanno prodotto una ossidazione dell'acido abietico per rendere deidroabietico nella trementina veneziana non inoculata con microorganismi.

I biocidi studiati (cloruro de benzalconio, Preventol ON y Metatín N, mescolati ed estesi sul vernice) hanno mostrato effetto inibitorio sullo sviluppo di *Chrysonilia sitophila* e *Penicillium chrysogenum* sul vernice. Si è osservato unicamente uno scarso sviluppo dei due funghi nel campione trattato col Preventol ON esteso sul vernice.

I risultati analitici non hanno mostrato cambi significativi nei campioni inoculati con i funghi menzionati e il batterio *Arthrobacter oxydans* rispetto al vernice non inoculato con microorganismi (controllo), tranne i campioni trattati con Preventol ON esteso sul vernice, in cui si è osservata una diminuzione dell'acido abietico.

## *Conclusioni*

### *Copale Manila*

I trattamenti biocidi hanno prodotto un'ossidazione dell'acido agatalico per rendere acido agatico nel copale Manila non inoculato con microorganismi.

I biocidi studiati (cloruro de benzalconio e Metatín N, mescolati ed estesi sul vernice) hanno mostrato effetto inibitorio sullo sviluppo di *Chrysonilia sitophila* e *Penicillium chrysogenum* sul vernice.

I risultati analitici non hanno mostrato cambi significativi nei campioni inoculati con i funghi mencionati e il batterio *Arthrobacter oxydans* rispetto al vernice non inoculato con microorganismi (controllo).

### *Sandaraca*

I trattamenti biocidi non hanno prodotto cambi importanti nella composizione della sandaraca.

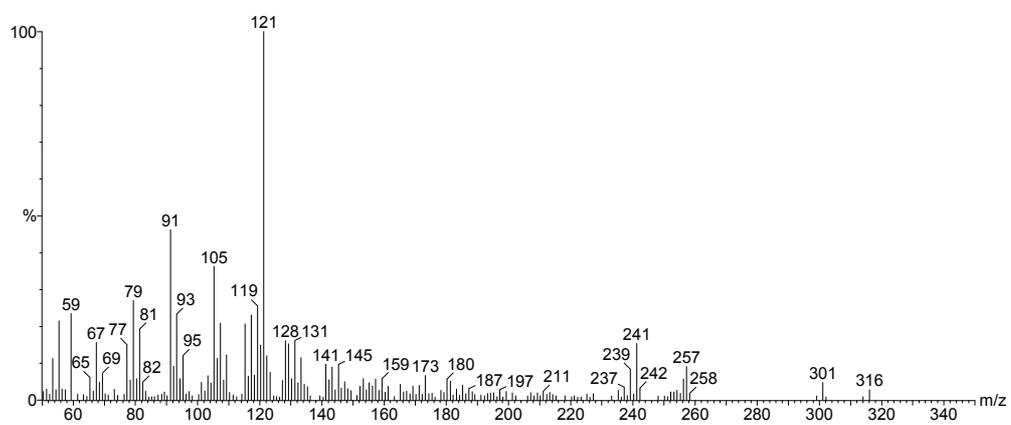
I biocidi studiati (cloruro de benzalconio e Metatín N mescolati e cloruro di benzalconio esteso sul vernice) hanno mostrato effetto inibitorio sullo sviluppo di *Chrysonilia sitophila* e *Phoma herbarum*.

I risultati analitici non hanno mostrato cambi d'importanza nei campioni inoculati con i funghi menzionati e il batterio *Streptomyces cellulofans* rispetto al vernice non inoculato con microorganismi (controllo).

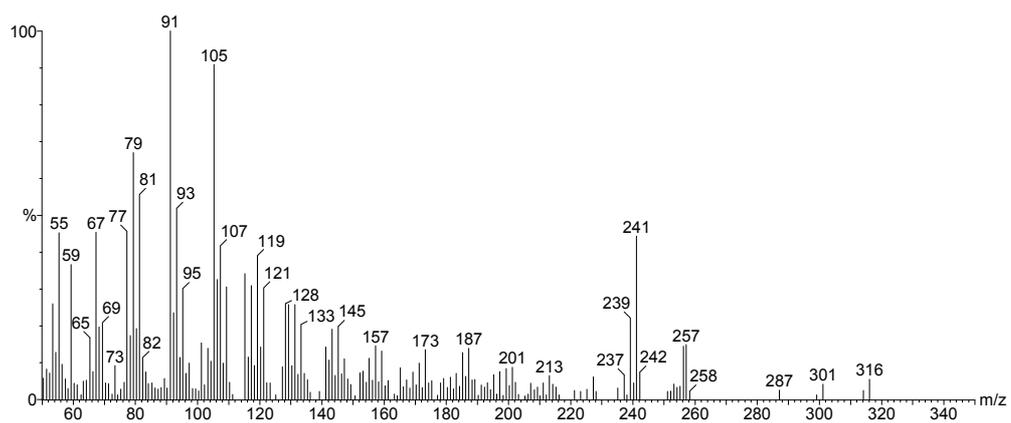
---

## Anexo 1. Espectros de masas (diterpenos)

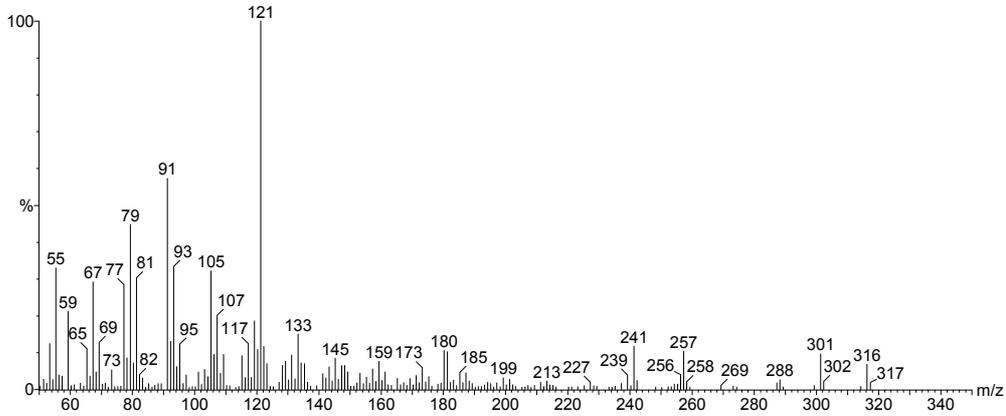
Ácido pimárico, metil éster



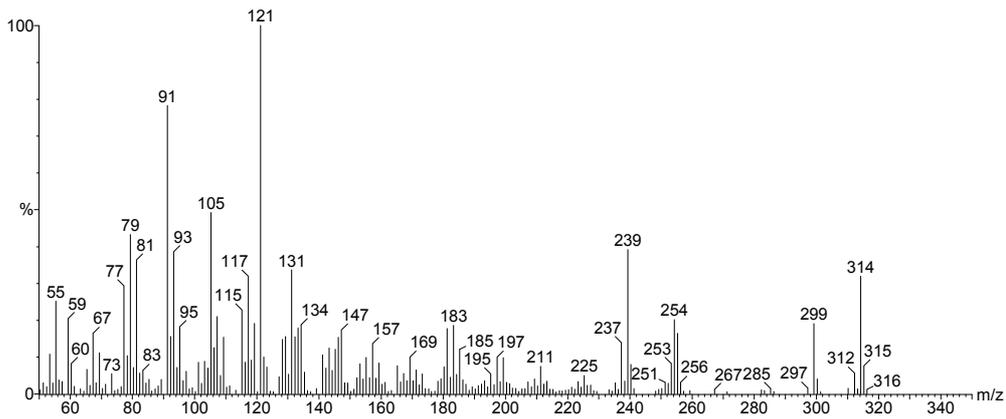
Ácido isopimárico, metil éster



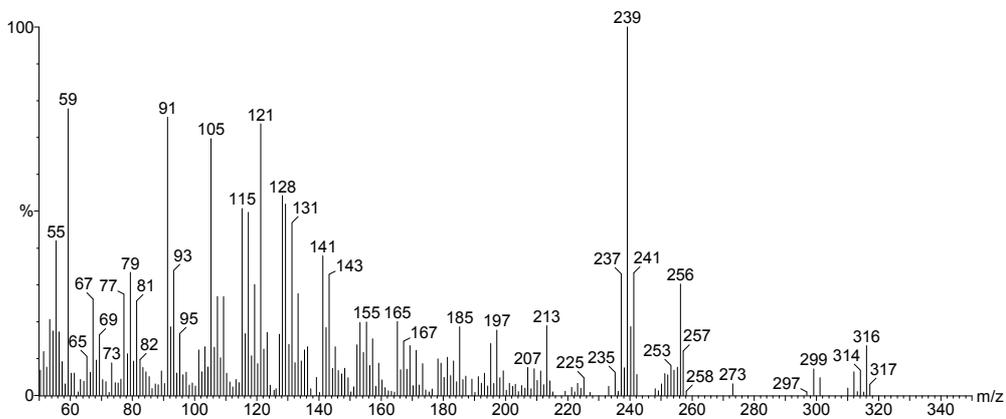
Ácido sandáracopimárico, metil éster



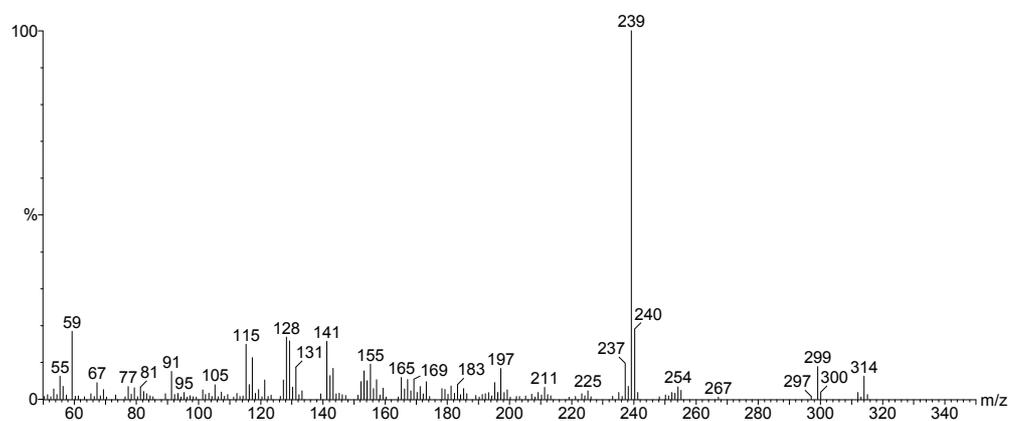
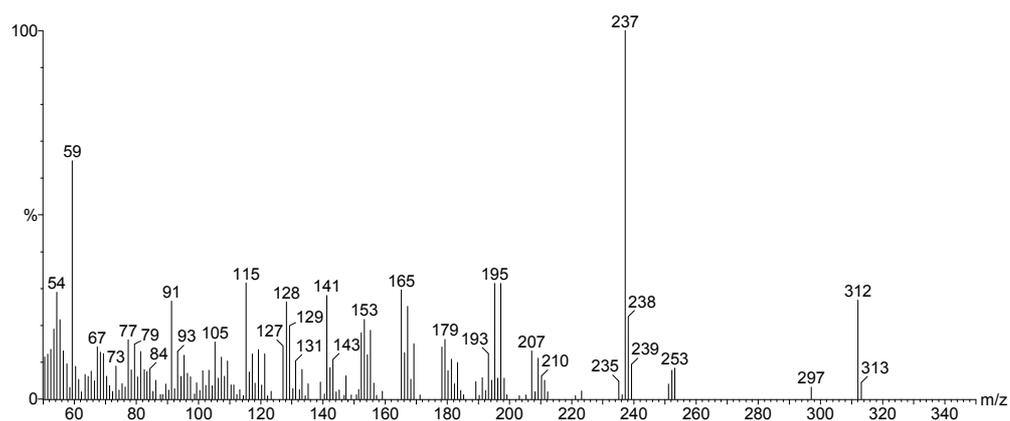
Ácido hidroxí-sandaracopimárico, metil éster



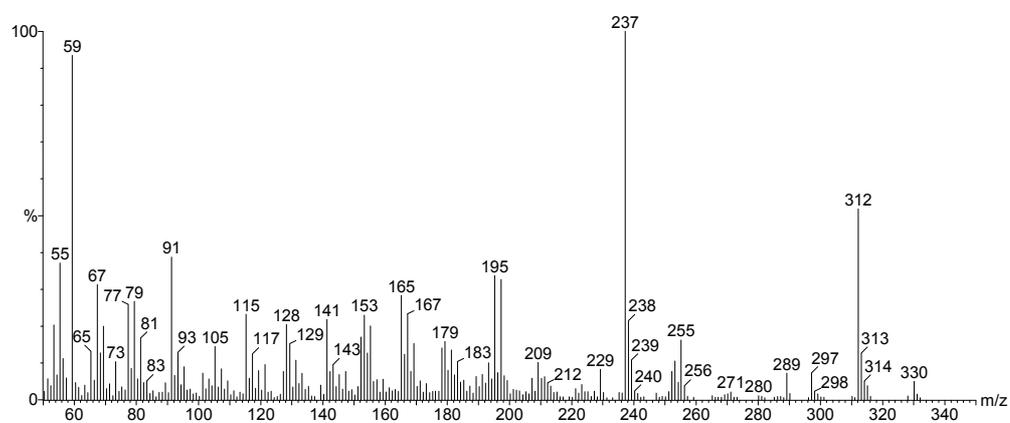
Ácido abietico, metil éster



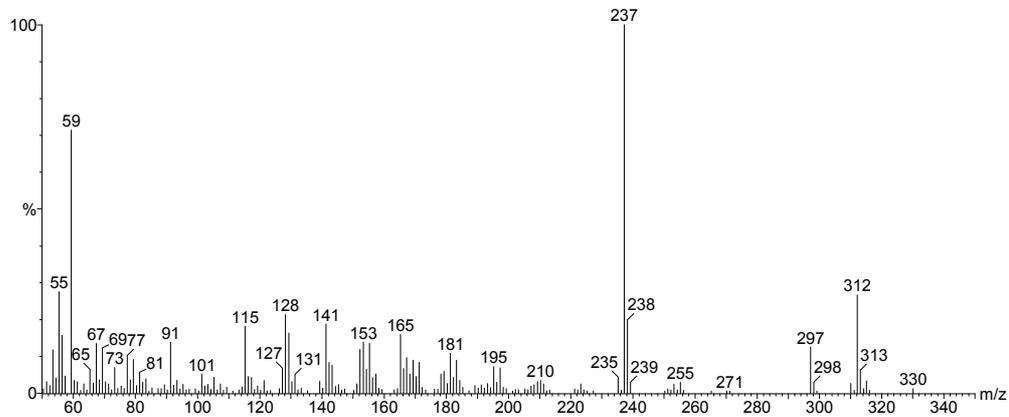
## Ácido dehidroabiético, metil éster

Ácido  $\Delta^6$ -dehidro-dehidroabiético, metil éster

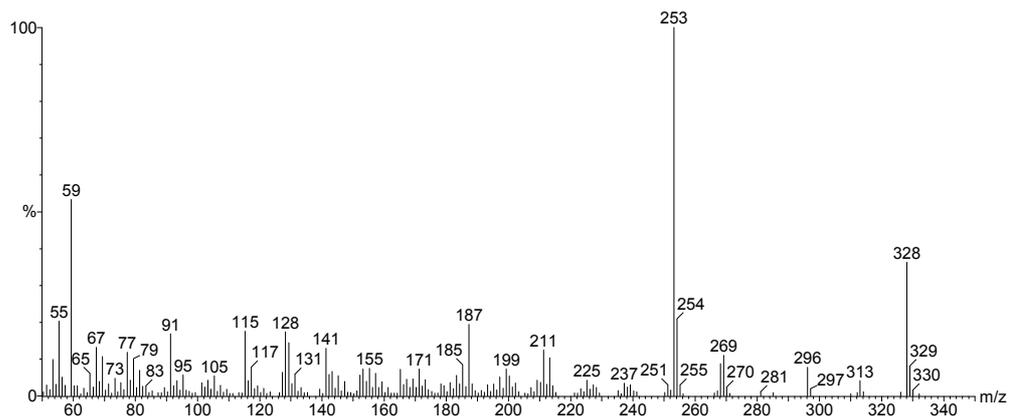
## Ácido 7-hidroxi-dehidroabiético, metil éster



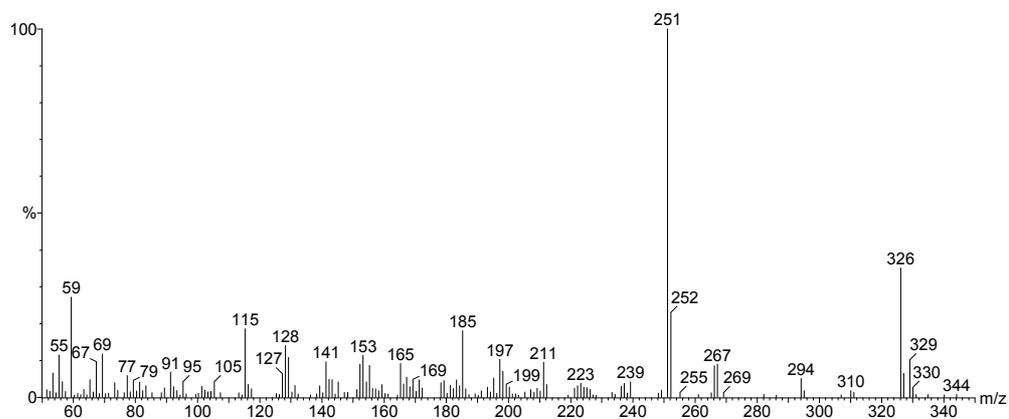
Ácido 15-hidroxi-dehidroabiético, metil éster



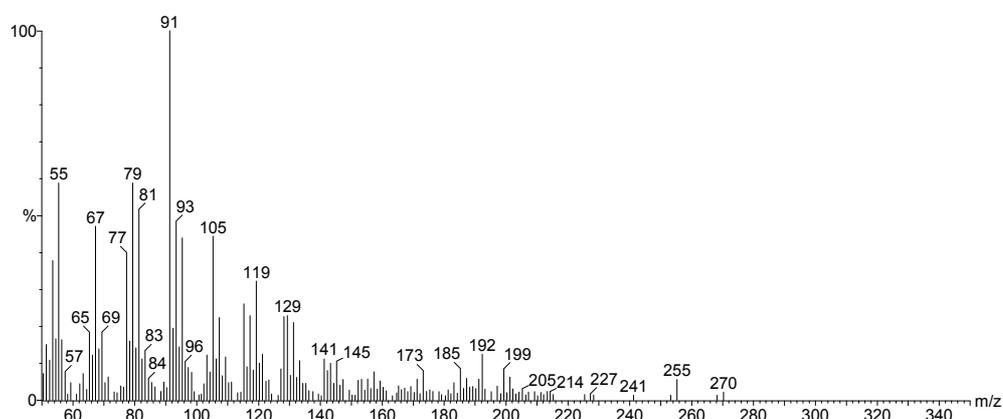
Ácido 7-oxo-dehidroabiético, metil éster



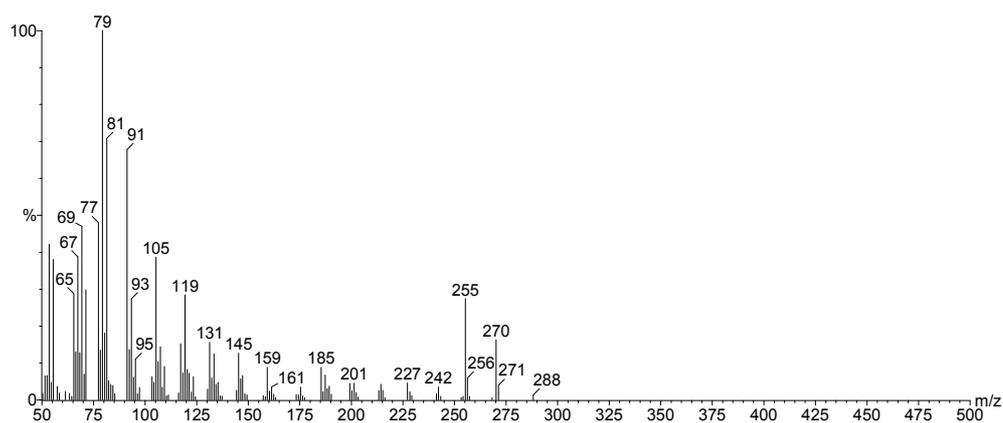
Ácido 15-hidroxi-7-oxo-dehidroabiético, metil éster



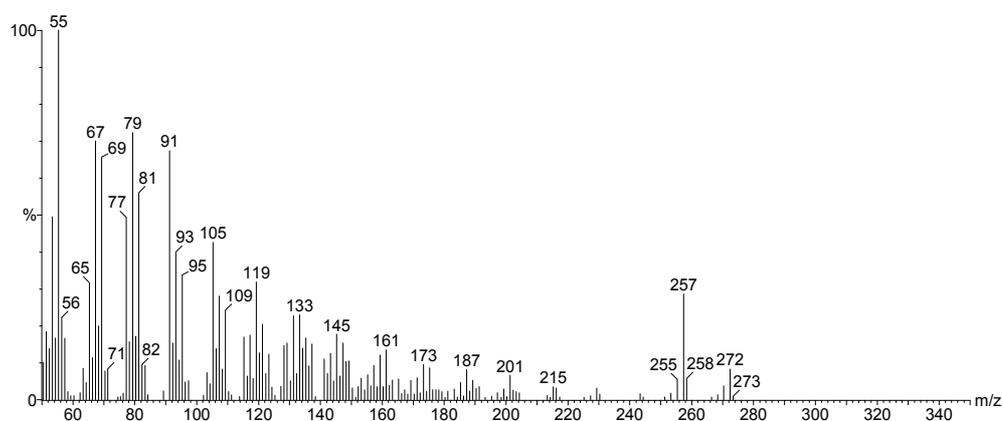
Larixol



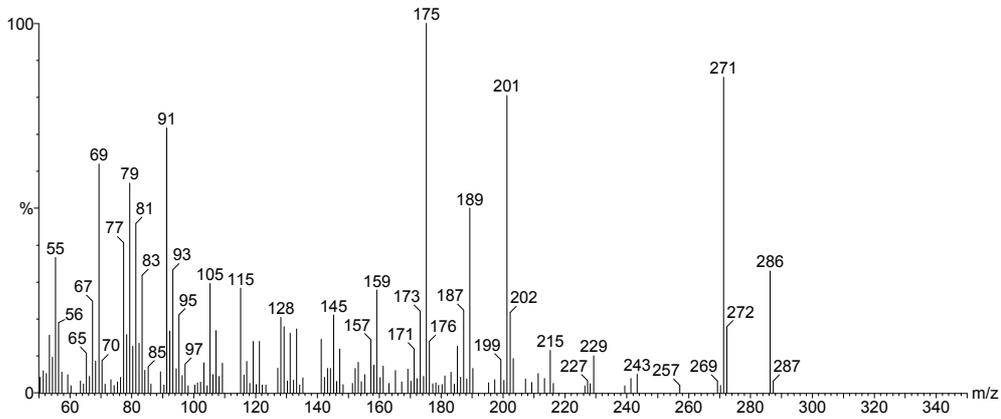
Acetato de larixilo



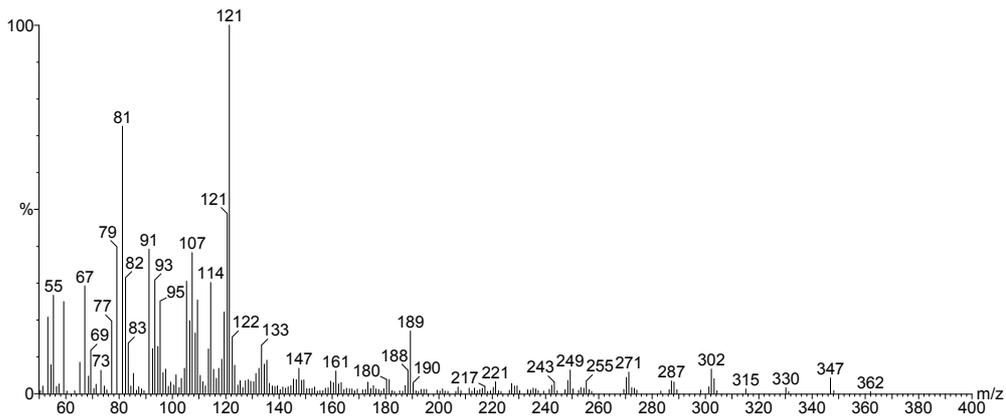
Manool



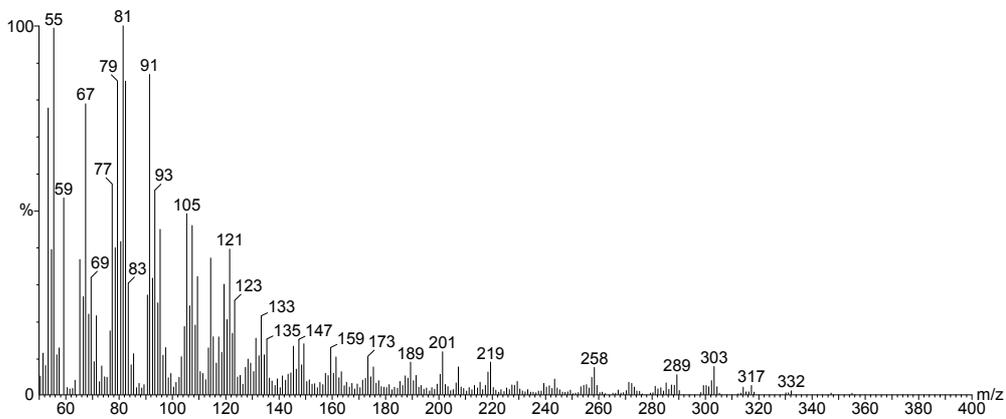
Totarol



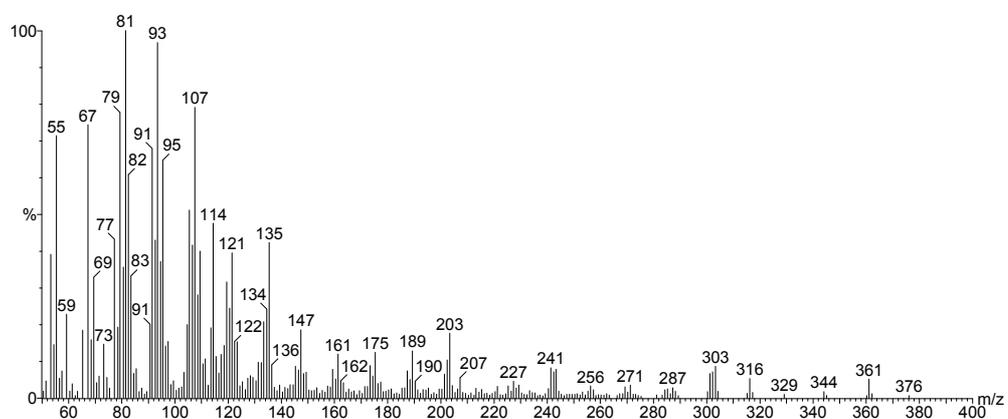
Ácido agático, metil éster



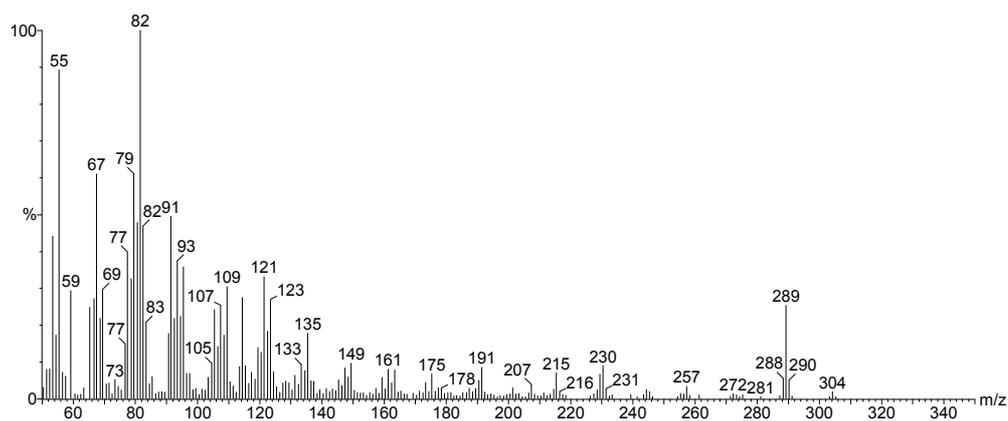
Ácido agatálico, metil éster



Ácido acetoxi agatolico, metil éster



Ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico, metil éster

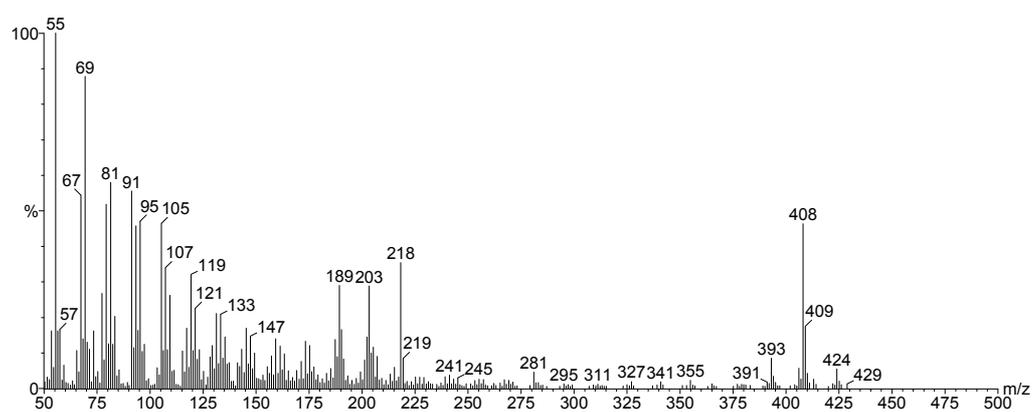


*Anexos*

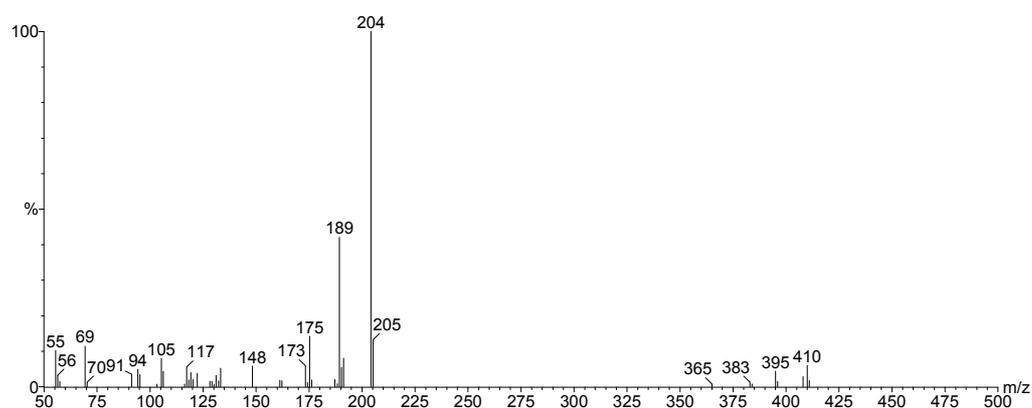
---

## Anexo 2. Espectros de masas (triterpenos)

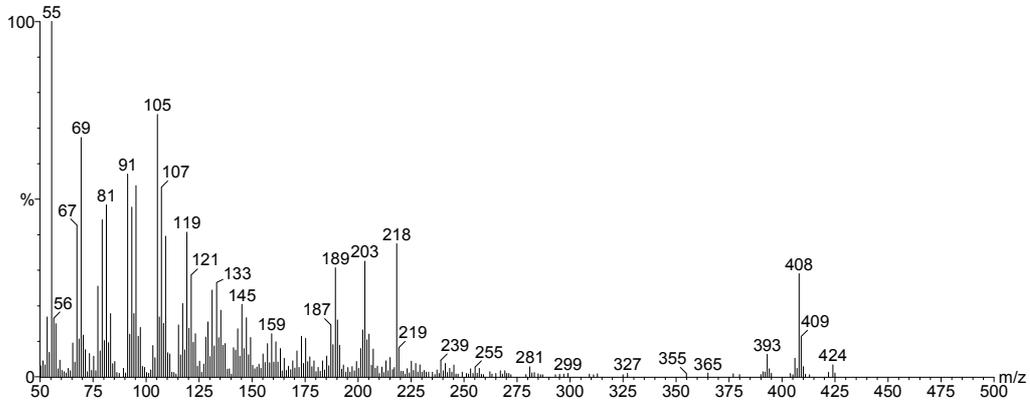
### $\alpha$ -amirona



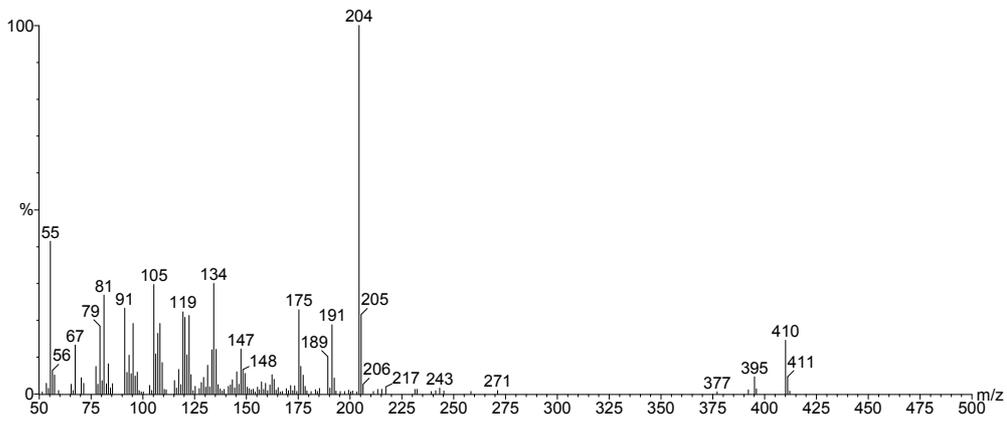
### Nor- $\alpha$ -amirona



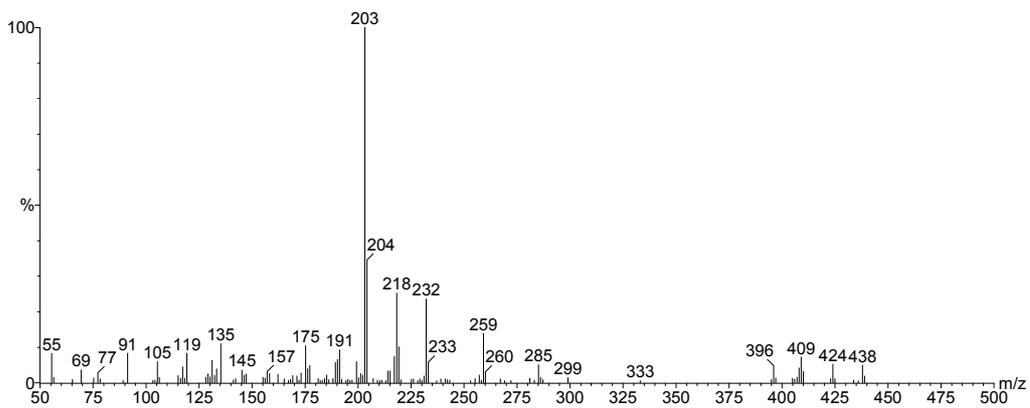
$\beta$ -amirona



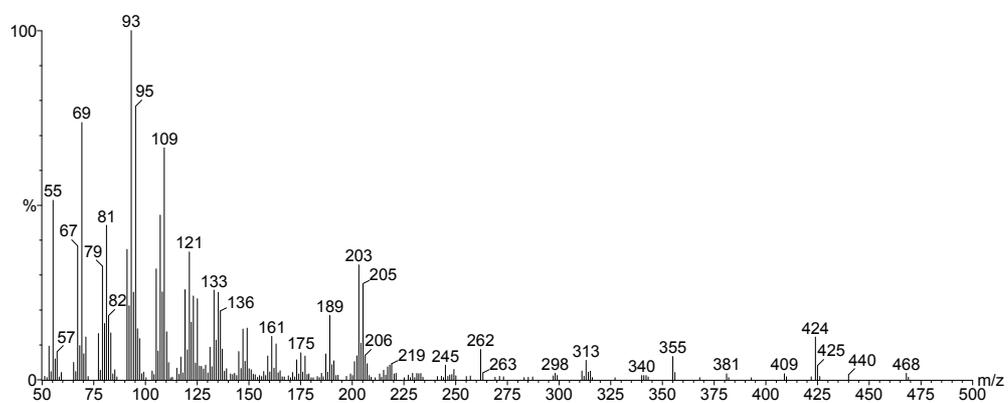
Nor- $\beta$ -amirona



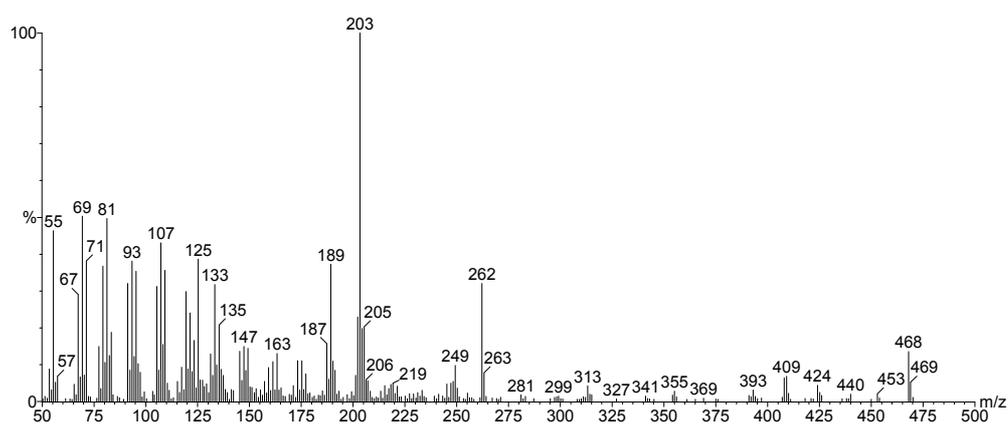
Aldehído oleanónico



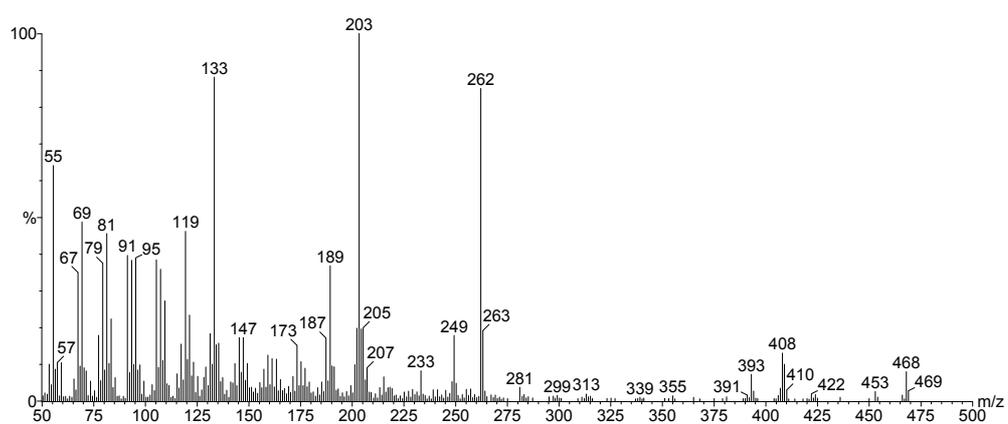
## Ácido oleanónico e hidroxidammarenona, metil éster



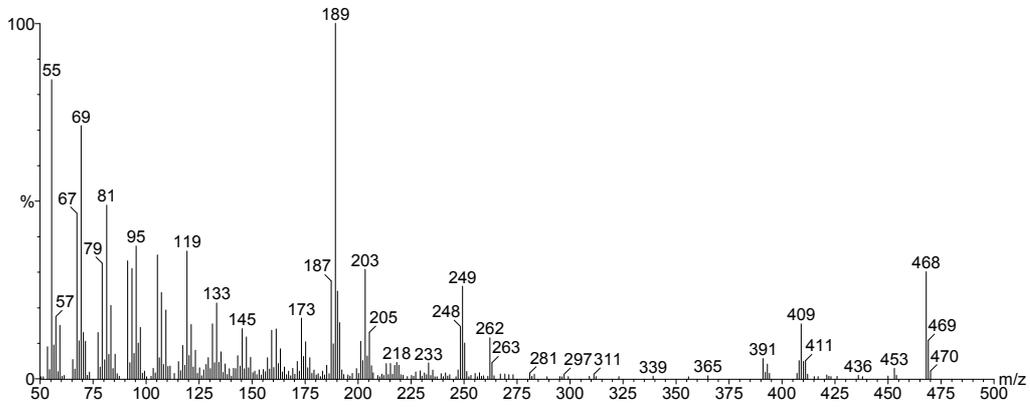
## Ácido oleanónico, metil éster



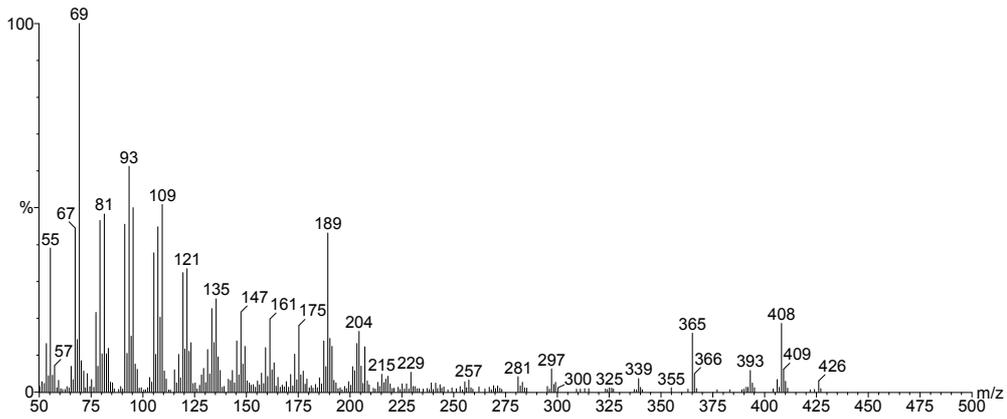
## Ácido ursónico, metil éster



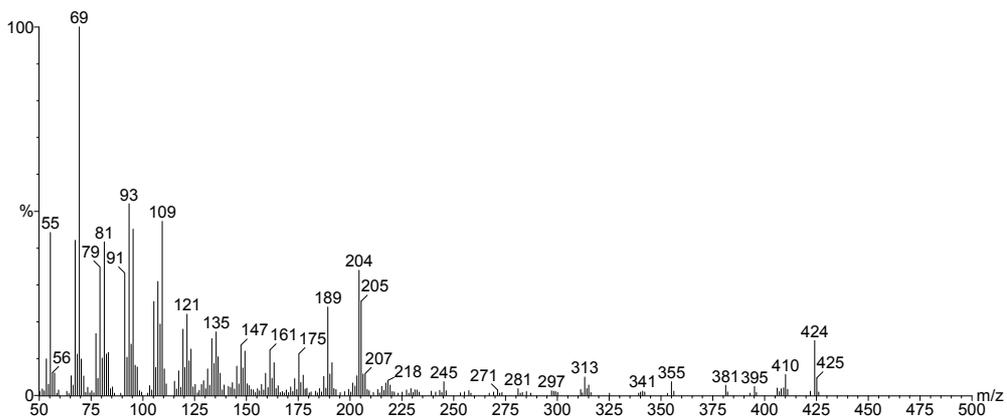
### Ácido morónico



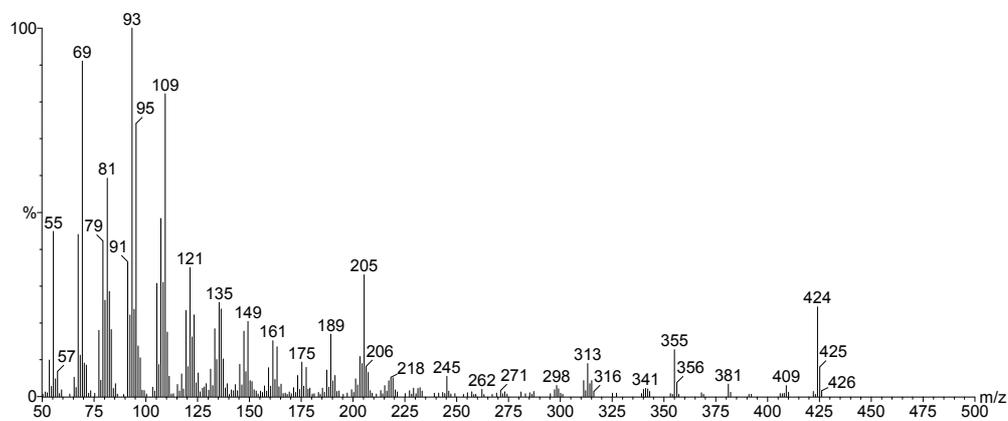
### Dammaradienol



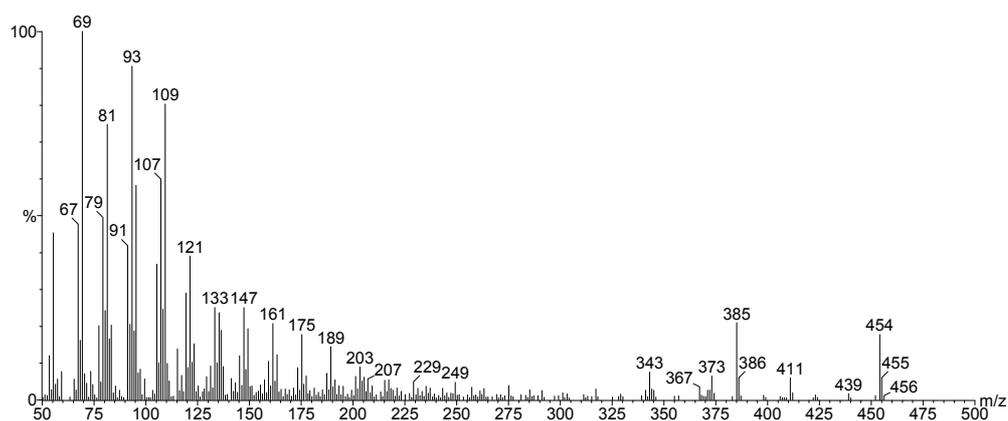
### Dammaradienona + nor $\beta$ amirona



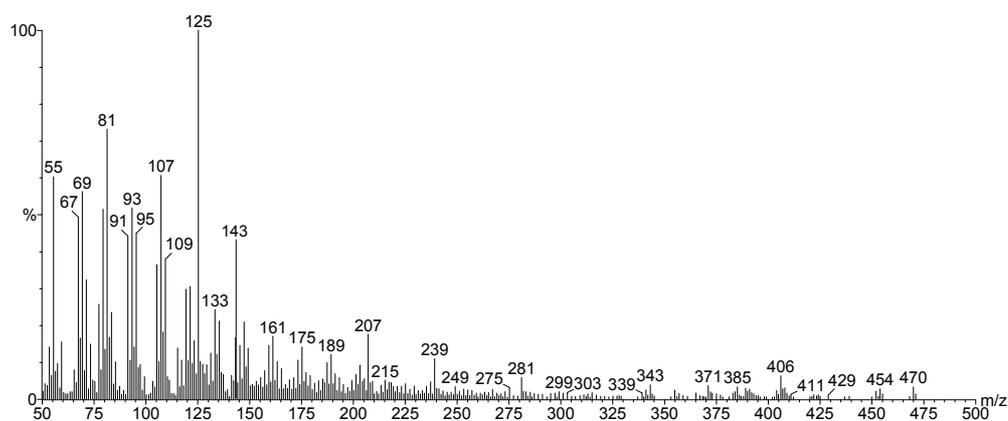
## Hidroxi dammarenona



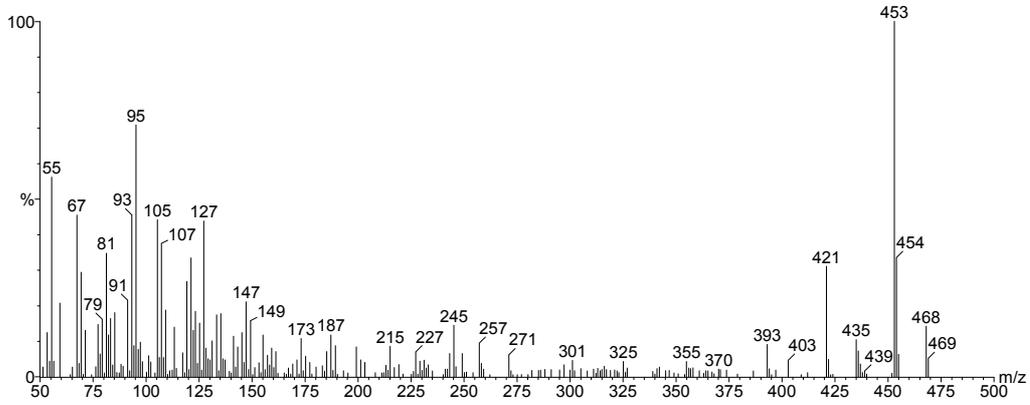
## Ácido dammarenólico, metil éster



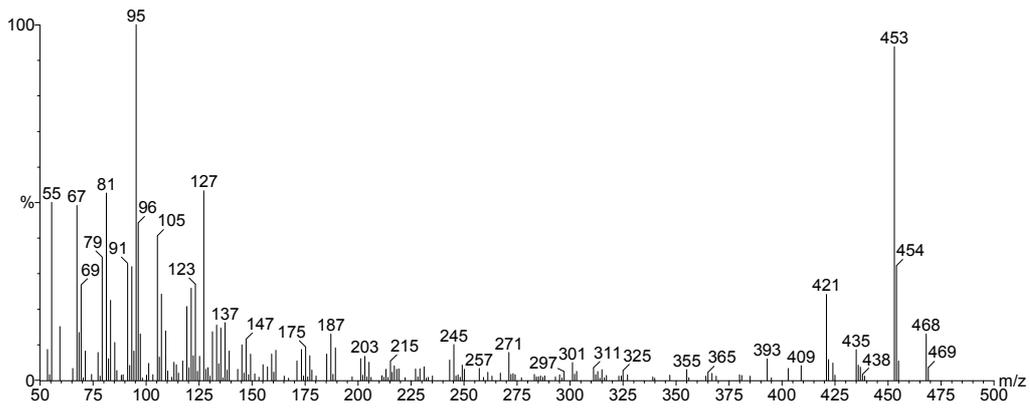
## Ácido 20,24-epoxi-25-hidroxi-3,4-seco-4(28)-dammaren-3-oico, metil éster



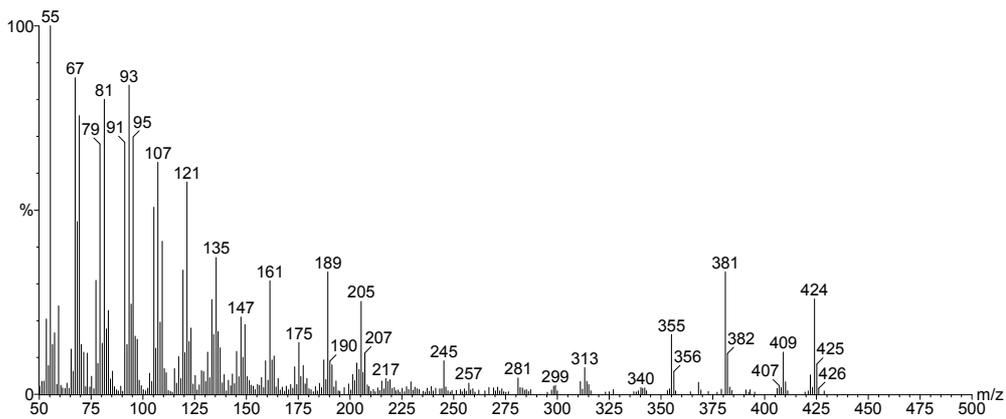
Ácido masticadienoico (o isómero), metil éster



Ácido masticadienoico (o isómero), metil éster



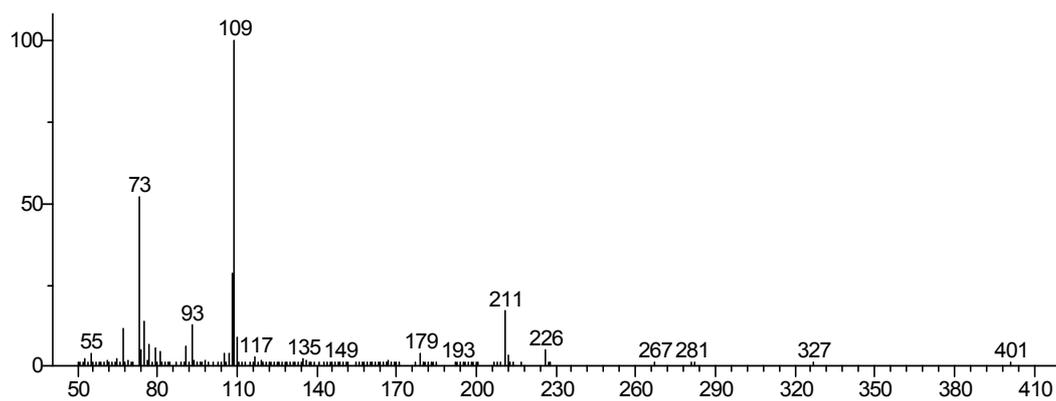
Hidroxihoanona



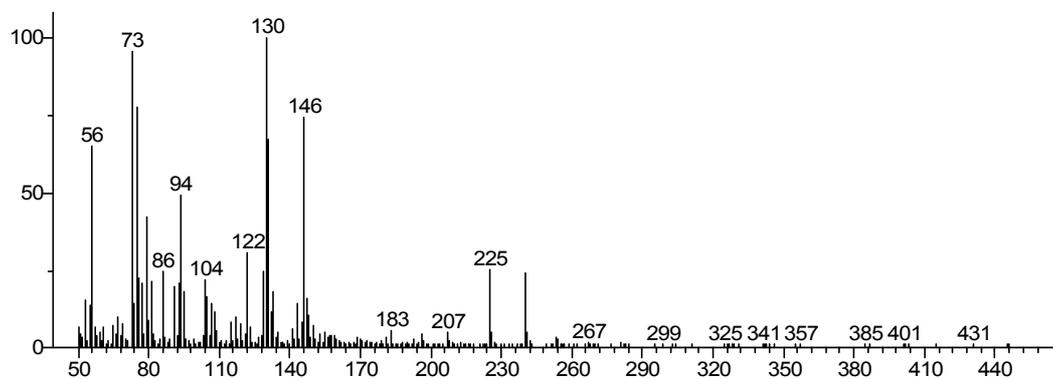
---

## Anexo 3. Espectros de masas (pirólisis)

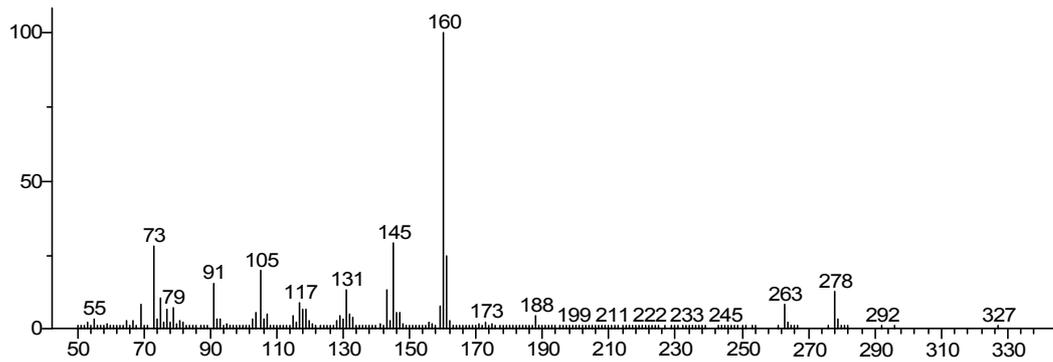
**1-**Ácido 1,3-dimetil-ciclohexa-2-en-carboxílico, TMS éster



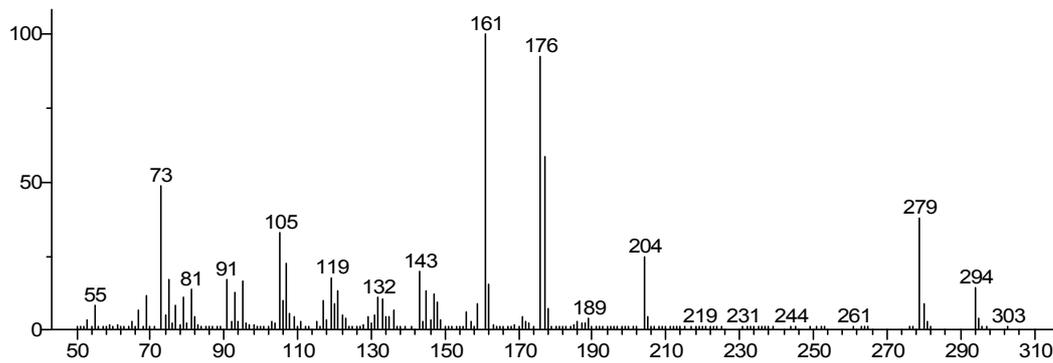
**2-**Ácido 1,2,3-trimetil-ciclohexa-2-en-carboxílico, TMS éster



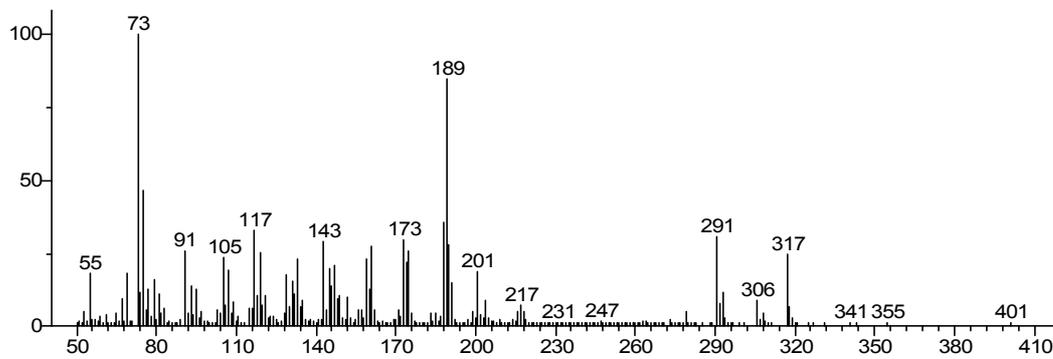
**3-** Ácido 1,4a,6-trimetil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-naftalencarboxílico, TMS éster

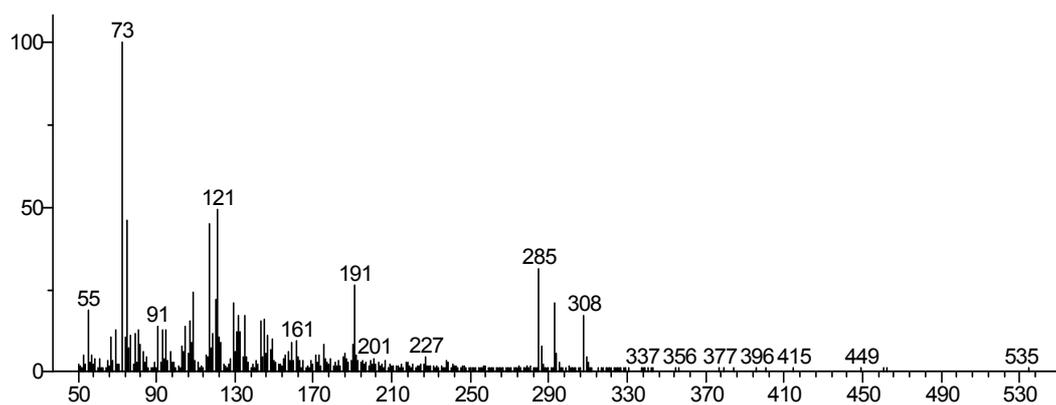
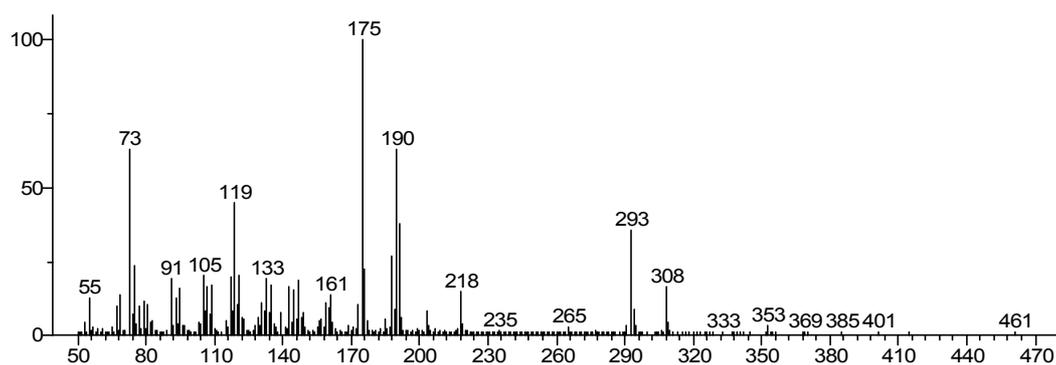
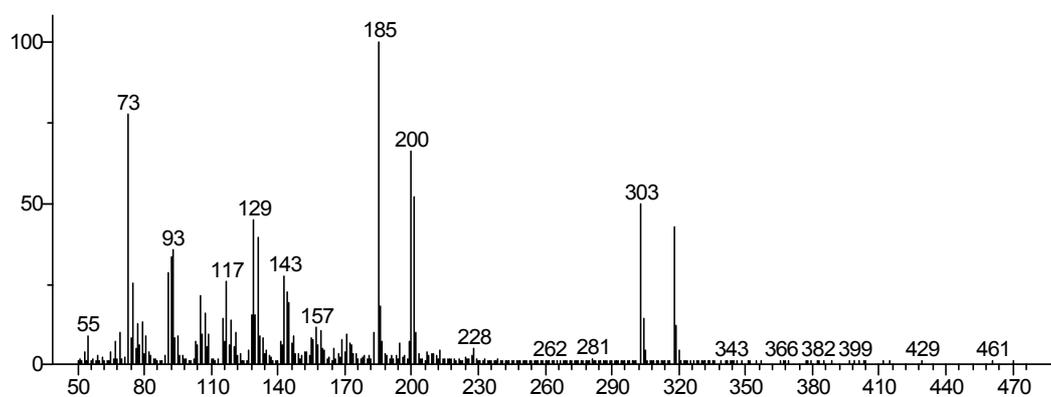


**4-** Isómero del compuesto 3

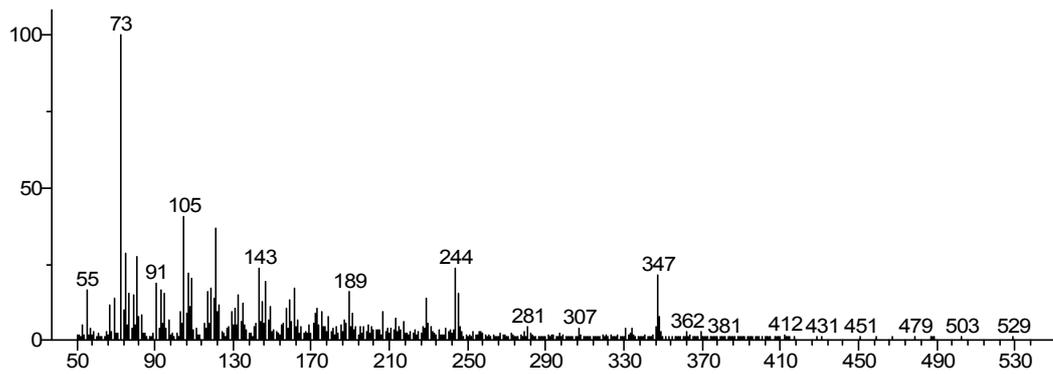


**5-** Ácido 1,4a,6-trimetil-5-metilén 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-naftalencarboxílico, TMS éster

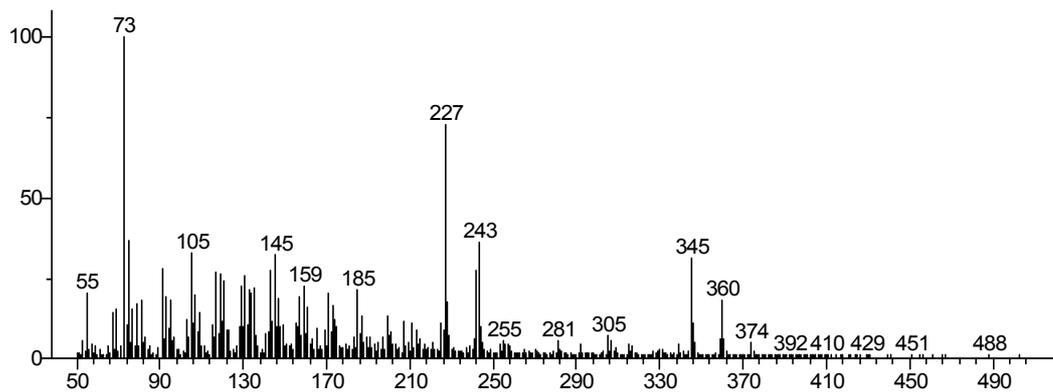


**6-** Ácido 1,4a,5,6-tetrametil-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-naftalencarboxílico, TMS éster**7-** Isómero del compuesto 5**8-** Ácido 5-etil-1,4a,6-trimetil-1,2,3,4-tetrahidro-naftalencarboxílico, TMS éster

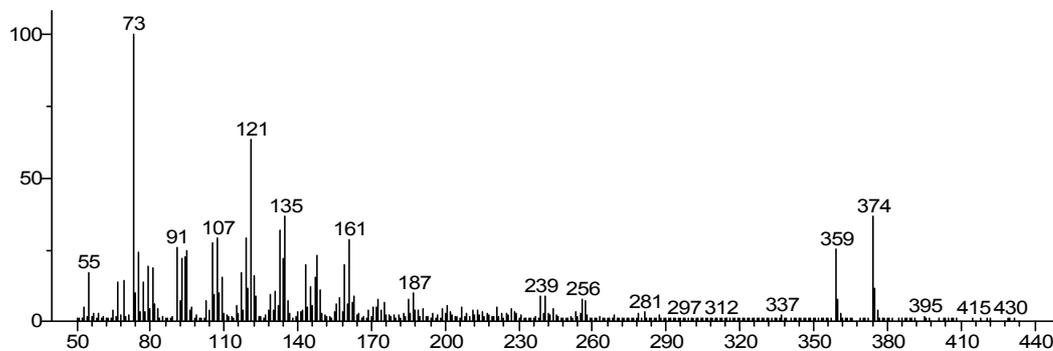
**9**-5-(3-metil-but-2-enil)-6-metilén-1,4a,6-trimetil-decahidro-naftalencarboxilato



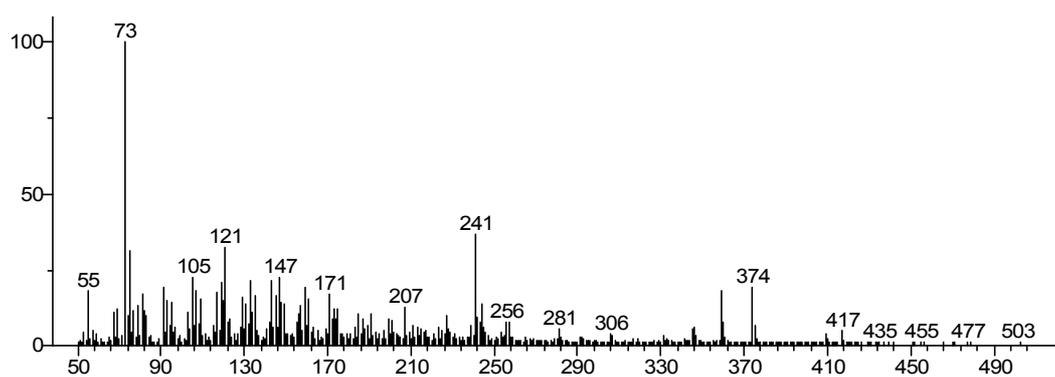
**10**- Ácido 3-metil-(5,5,8a-trimetil-2-metilén-decahidro-naftalén-1-il)-3-metil-pent-2-enoico, TMS éster



**11**- Ácido cis-comúnic, TMS éster



12- Ácido trans-comúnicico, TMS éster



*Anexos*

## Bibliografía general

Agraval OP, Dhawan S, Garg KL (1989). Microbial deterioration of paintings: A review. Intach Conservation Centre, Lucknow, India, pp 1-51.

Alev Aksoy, Nizami Duran, Fatih Koksal (2006). In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and mutans streptococci. Archives of Oral Biology, 51 (6): 476-481.

Anderson KB (1995). New evidence concerning the structure, composition, and maturation of class I (polyabdanoid) resinites, in K.B.Anderson, J.C. Crelling (Eds.), Amber, resinite and fossil resins, 617: 105.

Arai H (2000). Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. International biodeterioration & biodegradation, 46: 181-188.

Ariño X, Canals A, Gómez-Bolea A, Sáiz Jiménez C (2002). Assesment of the performance of a water-repelent/biocide treatment after 8 years. In: Galán, E and Zezza F (Eds). Protection and conservation of cultural heritage of the mediterranean cities. Proceedings of the 5th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin, Sevilla, pp 121-125.

Arteni SC, Sánchez Posada M (1984). From handcraft to mass production: notes on the manufacture of oil painting materials, in: Proceedings of the 7th Triennial Meeting of the ICOM Committee for Conservation, Copenhagen.

Assimopoulou AN, Papageorgiou VP (2005). GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part I. Pistacia terebinthus var. Chia .Biomed. Chromatography, 19: 285–311.

Assimopoulou AN, Papageorgiou VP (2005). GC-MS analysis of penta- and tetracyclic triterpenes from resins of Pistacia species. Part II. Pistacia terebinthus var. Chia .Biomed. Chromatography, 19: 586–605.

Bicho PA, Martin V, Saddler JN (1995). Growth, induction and substrate specificity of dehydroabietic acid-degrading bacteria isolated from a kraft mill effluent enrichment. Applied and environmental microbiology, 61 (9): 3245-3250.

Biellmann JF, Branlant G, Gero- Robert M, Poiret M (1973). Degradation bacterienne de l'acide dehydroabietique par *Flavobacterium resinovorum*. *Tetrahedron*, 29: 1227-1236.

Biellmann JF, Branlant G, Gero- Robert M, Poiret M (1973). Degradation bacterienne de l'acide dehydroabietique par un *Pseudomonas* et une *Alcaligenes*. *Tetrahedron*, 29: 1237-1241

Bolívar-Galiano FC (1995). Los Agentes de Biodeterioro del Patrimonio Pictórico, Textil y Gráfico. PH. Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, 12: 50-51.

Bravery AF (1998). Biodeterioration of paint. A state of the art comment. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 466- 485.

Caneva G, Nugari MP, Pinna D, Salvadori O (1998). Il controllo del degrado biologico. Nardini editore, Florence, pp 1-180.

Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (1994). La biología nel restauro. Nardini editore, Florence, pp 92-175.

Caneva G, Nugari MP, Salvadori O (2005). La Biologia vegetale per i Beni Culturali. Biodeterioramento e Conservazione, Vol. 1. Nardini editore, Florence, 400pp.

Cennini C (1998). El libro del Arte. Akal, Madrid, p.141.

Ciferri O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and environmental microbiology*, 65 (3): 879-885.

Clifford DJ, Hatcher PG (1995). Structural transformations of polyabdanoid resinates during maturation. *Org. Geochem*, 23 (5): 407-418.

Colombini MP, Modugno F, Giannarelli S, Fuoco R, Mateini M (2000). GC-MS characterization of paint varnishes. *Microchemical journal*, 67: 385-396.

Commissione Normal (1991). Raccomandazioni Normal: 30/89. Metodi di controllo del Biodeterioramento. C.N.R.—I.C.R., Rome, Italy.

Da Vinci L (1995). Tratado de pintura, 3º ed. Akal, Madrid, p 141.

De la Rie ER (1988). Photochemical and thermal degradation of films of dammar resin. *Studies in Conservation*, 33: 53-70.

De Souza A, Gaylarde CC (2002). Biodeterioration of varnished wood with and without biocide: implications for standard test methods. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49: 21-25.

Dethlefs F, Gerbardtz KO, Stan HJ (1996). Gas Chromatography/Mass Spectrometry of 13 Resin Acids as their PFB Esters. *Journal of Mass Spectrometry*, 31: 1163-1168.

Doerner M (1998). *Los materiales de pintura y su empleo en el arte*. 1ª ed. Reverté, Barcelona, pp 94-100.

Doménech-Carbó MT, Osete-Cortina L, de la Cruz Cañizares J, Bolívar-Galiano F, Romero-Noguera J, Fernández-Vivas MA, Martín-Sánchez I (2006). Study of the microbiodegradation of terpenoid resin-based varnishes from easel painting using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chemistry*, 385 (7): 1265 – 1280.

Ferone C, Pansini M, Mascolo MC, Vitale A (2000). Preliminary study on the set up of mortars displaying biocidal activity. In: Fassina V (Ed.), *Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Venice, vol 2, Elsevier, Amsterdam, pp 371-378.

Giacobini, C, De Cicco MA, Tiglie I, Accardo G (1988). Actinomycetes and Biodeterioration in the Field of Fine Art. In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW (Eds.), *Biodeterioration 7*, Elsevier, New York, pp 418-423.

Giacobini C, Pedica M, Spinucci M (1991). Problems and Future Projects on the Study of Biodeterioration: Mural and Canvas Paintings. In. *Proceedings of the 1st International Conference on the Biodeterioration of Cultural Property*. Mc Millan India Ltd, New Delhi. Cap 31, pp 275-286.

Gómez-Alarcón G, Blázquez AB, Lorenzo I (1999). Biocides used in the control of microorganisms on stone monuments. In: *Extended abstracts: Of Microbes and art, an international conference on microbiology and conservation*, Florence, pp 228-232

Heim R, Francoise F, Nicot J (1968). "Combating Moulds Which Develop on Cultural Properties in Tropical Climates." *Conservation of Cultural Properties with Special Reference to Tropical Climates*. Lausanne, Switzerland: UNESCO, pp 45-48.

Inoue M, Koyano M. (1991) Fungal Contamination of Oil Paintings in Japan. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 28: 23-35.

Koestler RJ y Salvadori O (1998). Methods of evaluating biocides for the conservation of porous building materials. *Science and technology for cultural heritage*, 5 (I): 1963-1968.

Koestler RJ (2000). Polymers and resins as food for microbes. In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G. (Eds.), *Of Microbes And Art. The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 153–167.

Krumbein WE y Gross M (1992). Interactions of biocides of biodeterioration microbiota in agar diffusion and rock cube test. In: *Proceedings of the 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Lisbon, pp 501-509.

Kutney JP, Choi LSL, Hewitt GM, Salisbury PJ, Singh M (1985). Biotransformation of dehydroabietic acid with resting cell suspensions and Calcium alginate immobilized cells of *Mortierella isabellina*. *Applied environmental microbiology*, 49 (1): 96-100.

Kutney JP, Berset JD, Hewitt GM, Singh M (1988). Biotransformation of dehydroabietic, abietic and isopimaric by *Mortierella isabellina* immobilized in polyurethane foam. *Applied environmental microbiology*, 54 (4): 1015-1022.

Lin SJ, Short RE, Ford SP, Grings EE, Rosazza ZP (1998). In vitro biotransformations of isocupressic acid by cow rumen preparations: formation of agathic and dihydroagathic acids. *Journal of natural products*, 61(1): 51-56.

Liss SN, Bicho PA, Saddler JN (1997). Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can J Microbiol*, 75: 599–611 (and references cited therein).

Malagodi M, Nugari MP, Altieri y Lonati G (2000). Effects of combined application of biocides and protectives on marble. In: Fassina V (Ed), *Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Venice, vol 2, Elsevier, Amsterdam, pp 225-233.

Martin WJJ, Mohn WW (1999). A novel aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase from the diterpenoid-degrading bacterium *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *Wat. Sci. Tech*, 40 (11-12): 273-280.

Martin VJJ, Yu Z, Mohn WW (1999). Recent advances in understanding resin acid biodegradation: microbial diversity and metabolism. *Arch. Microbiol*, 172: 131-138.

Martinez-Ramírez S, Puertas F, Blanco Varela MT, Thompson GE (1998). Effect of dry deposition of pollutants on the degradation of lime mortars with sepiolite. *Cement and concrete research*, 28 (1):125-133.

Masschelein-Kleiner L (1992). *Liants, vernis et adhésifs anciens*. Institut Royal du Patrimoine Artistique, Bruxelles, pp 86-100.

Mayer R (1985). *The artist's handbook of materials and techniques*. 1<sup>a</sup> ed. Blume, Madrid, pp 156-185.

Mills JS, White R (1994). *The Organic Chemistry of Museum Objects*. Butterworths, London, pp 99-108.

Montes Estellés RM (1994). Estudio de la contaminación fisicoquímica y microbiológica, en el conjunto patrimonial de la basílica de la Virgen de los Desamparados de Valencia. *Comunicaciones técnicas, libro segundo*. II Congreso Nacional de Medio Ambiente. Madrid, 21-25 noviembre 1994, pp 23-37.

Nugari MP, D'Urbano MS, Salvadori O (1993). Test methods for comparative evaluation of biocide treatments. In Thiel MJ (Ed.). *Proceedings of the International UNESCO/RILEM Congress on Conservation of Stone and Others Materials*, E&FN Spon, London, pp 565-572.

Nugari MP (1999). Interference of antimicrobial agents on stone. In: *Extended abstracts: Of Microbes and Art, an International Conference on microbiology and conservation*, Florence, pp 211-214.

Nugari MP, Salvadori O (2003). Biocides and treatment of stone: limitation and future prospects. In: Koestler, RJ, Koestler VH, Charola, EAE, Nieto-Fernandez FE (Eds.), *Art, Biology and Conservation: Biodeterioration of Works of Art*. The Metropolitan Museum of Art, New York, pp 518-535.

Osete-Cortina L, Doménech-Carbó MT, Mateo-Castro R, Gimeno-Adelantado JV, Bosch-Reig F (2004). Identification of diterpenes in canvas painting varnishes by gas chromatography-mass spectrometry with combined derivatisation. *Journal of Chromatography A*, 1024: 265-278.

Osete-Cortina L, Doménech-Carbó MT (2005). Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry with on line trimethylsilylation. *Journal of Chromatography A*, 1065 (2): 265-278.

Palomino A (1947). *El museo pictórico y escala óptica*. Ed. Aguilar, Madrid, p 745.

Papageorgiou VP, Bakola-Christianopoulou MN, Apazidou KK, Psarros EE (1997). Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of chromatography A*, 769: 263-273.

Pastorova I, van der Berg KJ, Boon JJ, Verhoeven JW (1997). Análisis of oxidised diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMHA. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 43: 41-57.

Petushkova JP, Lyalikova NN (1986). Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings. *Studies in Conservation*, 31: 65-69.

Pietrini AM, Ricci S, Bartolini M (1999). Long term evaluation of biocide efficacy on algal growth. In: *Extended abstracts: Of Microbes and art, an international conference on microbiology and conservation*, Florence, pp 238-245.

Proefke ML, Rinehart KL (1992). Analysis of an egyptian mummy resin by mass spectrometry *Journal of American Society Mass of Spectrometry*, 3: 582-589.

Quaresima R, Baccante A, Volpe R, Corain B (1997). Realisation and possibility of polymeric metalo-organic matrixes with biocide activity. In: *Moropoulou A, Zezza F, Ollias E y Papachristodoulou (Eds.), Proceedings of the 4th International Symposium on the conservation monuments in the Mediterranean, Rhodes, Vol 3*, pp 323-335.

Ross RT (1963). Microbiology of paint films. *Adv. Appl.Mirob*, 5: 217- 234.

Scalarone D, Lazzari M, Chiantore O (2002). Ageing behaviour and pyrolytic characterisation of diterpenic resins used as art materials: colophony and Venice turpentine. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 64: 345–361.

Scalarone D, Lazzari M, Chiantore M (2003). Ageing behaviour and analytical pyrolysis characterisation of diterpenic resins used as art materials: Manila copal and sandarac. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 68-69: 115-136.

- Seves A, Sora S, Ciferri O. (1996). The microbial colonization of oil paintings. A laboratory investigation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37 (3-4): 215-224.
- Seves A, Romano H, Scilione G, Maifreni T, Sora S. (2000). A laboratory investigation of the microbial degradation of cultural heritage (ICMC). In: Ciferri O, Tiano P, Mastromei G (Eds.), *Of microbes and art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*, pp 121-133.
- Shedrinsky AM, Wampler TP, Indictor N, Baer NS (1989). Application of analytical pyrolysis to problems in art and archaeology: A review. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 15: 393-412.
- Skoog DA, Leary JJ (1994). *Análisis Instrumental*. McGraw-Hill, Madrid.
- Strzelczyk AB (1981). *Paintings and Sculptures*. In: Rose AH (Ed.), *Microbial deterioration*. Academic Press, London, pp 203-234.
- Tiano P (1998). Biodeterioration of monumental rocks: decay mechanisms and control methods. *Science and technology for cultural heritage*, 7 (2): 19-38.
- Urzi C, de Leo F (2007). Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. *International Biodeterioration & Biodegradation*, in press.
- Valentín N (1990). *Contaminación biológica en materiales arqueológicos y su erradicación por medio de tratamientos no tóxicos*. Cuadernos del Instituto de Conservación de Bienes Culturales, Madrid, pp 113-120.
- Valentín N, Vaillant M, Guerrero H. (1996). Control integrado de plagas en bienes culturales de países de clima mediterráneo y tropical. XI Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales. Castellón, 3-6 octubre. Ed. Diputación de Castellón, pp 205-215.
- Van Aarssen BGK, Cox HC, Hoogendoorn P, De Leeuw, JW (1990). A cadinene biopolymer present in fossil and extant dammar resins as a source for cadinanes and bicadinanes in crude oils from Southeast Asia. *Geochimica et Cosmochimica*, 54: 3021-3031.

Van den Berg KJ, Van der Horst J, Boon JJ, Sudeijer OO (1998). Cis-1,4-poly- $\beta$ -myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated. *Tetrahedron Letters*, 39 (17, 23): 2645-2648.

Van den Berg KJ, Boon JJ, Pastorova I, Spetter LFM (2000). Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in old Masters paintings. *Journal of Mass Spectrometry*, 35: 512-533.

Van der Doelen GA, Van den Berg KJ, Boon JJ (1998). Comparative chromatographic and mass-spectrometric studies of triterpenoids varnishes: fresh materials and aged simples from paintings. *Studies in Conservation*, 43: 249-264.

Van der Doelen GA, Van den Berg KJ, Boon JJ, Shibayama N, de la Rie ER, Genuit WJL (1998). Analysis of fresh triterpenoid resins and aged triterpenoid varnishes by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation (tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 809: 21-37.

Van der Doelen GA (1999). Molecular studies of fresh and aged triterpenoid varnishes. PhD thesis. University of Amsterdam, Amsterdam.

Van der Doelen GA, Boon JJ (2000). Artificial ageing of varnish triterpenoids in solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 134: 45-57.

Walsh JH (2001). Ecological considerations of biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48: 16-25.

Warscheid T, Braams J (2000). Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 343-368.

Wilson AEJ, Edward R, Moore B y Mohn WW (1996). Isolation and characterization of isopimaric acid-degrading bacteria from a sequencing batch reactor. *Applied and environmental microbiology*, 62 (9): 3146-3151.

Yebra DM, Kül S, Weinell CE, Dam-Johansen K (2006). Presence and effects of marine microbial biofilms on biocide-based antifouling paints. *Biofouling*, 22 (1-2): 33-41.

Zhang Q, van Palenstein WH, van't Hof MA, Truin GJ (2006). Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review. *Eur J Oral Sci.*, 114 (6): 449-55.