



**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

## **TESIS DOCTORAL**



**Avances en la aplicación de imágenes hiperespectrales de espectroscopía infrarroja y Raman para la caracterización de materiales naturales y artificiales y sus transformaciones químicas**

**PRESENTADA POR:**

**María González Cabrera**

**DIRIGIDA POR:**

**María José Ayora Cañada**

**Ana Domínguez Vidal**

**JAÉN, 19 de Febrero de 2021**





**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

**Avances en la aplicación de imágenes hiperespectrales de espectroscopía infrarroja y Raman para la caracterización de materiales naturales y artificiales y sus transformaciones químicas**

Memoria presentada por María González Cabrera  
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Jaén  
“Mención Doctorado Internacional”

VºBº Directora y Tutora  
Dra. María José Ayora Cañada  
Universidad de Jaén

VºBº Directora  
Dra. Ana Domínguez Vidal  
Universidad de Jaén

Fdo. María González Cabrera  
Jaén, a 19 de Febrero de 2021



La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro

El esfuerzo total es una victoria completa

Mahatma Gandhi



## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras María José y Ana, sin las cuales esta tesis no sería posible. Ha sido un placer aprender con y de vosotras, algo que he hecho desde el primer momento en el que nos conocimos (hace ya nueve años), cuando comenzaba el grado en Química sin saber que llegaría hasta aquí de vuestra mano.

Agradecer también a todos los compañeros que han pasado por la sala de doctorandos en algún momento durante estos cuatro años, ya que todos acabamos formando parte de la misma familia. A todos vosotros: Abel, Lorena, Carmen, Inés, Julia, M<sup>a</sup>Mar, Fran, Juan.... Por haberme animado y, sobre todo, por todas las horas que hemos pasado juntos discutiendo sobre ciencia y la vida en general. A Teresa, que me ha hecho reír cada día y con la que he compartido incontables comidas y cafés, por distraerme y apoyarme. A Paco, por guiarme en la travesía del doctorado y ayudarme en los obstáculos, siempre con una broma guardada. Y a M<sup>a</sup>Paz, mi compañera diaria, la que me ha aguantado y comprendido en todas las etapas de este camino; sin ti todo hubiera sido mucho más difícil.

Al grupo de investigación FQM-363 y a los miembros del CICT de la Universidad de Jaén, donde he pasado muchas horas entre mapas y medidas; y en especial a Macarena, con la que he compartido mucho tiempo e innumerables ensayos. También agradezco enormemente al grupo del profesor Bernhard Lendl en la Universidad Técnica de Viena, por acogerme e integrarme entre ellos como uno más. Allí conocí a Mili, Christoph, Karin, Stephan y Hans, con los que tuve la suerte de trabajar y aprender cada día.

A mis amigos, que siempre han vivido estos momentos a mi lado y se han alegrado conmigo; sobre todo a Aroa y María, mis químicas y compañeras desde el primer minuto.

A mi madre y mi hermana, que me han sufrido y apoyado a partes iguales. Siempre puedo contar con vosotras y nunca dejaré de agradeceros todo lo que hacéis por mí.

Y, por supuesto, a Álex. Aunque entre nosotros sobran las palabras, no puedo dejar de agradecerte que siempre estés a mi lado y me acompañes en cada paso. Te quiero

## **Financiación**

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la financiación recibida del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte en su convocatoria de becas y ayudas para la formación de doctores del programa nacional de formación del profesorado universitario 2015 (referencia FPU15/03119), a través de los subprogramas de Formación y Movilidad incluidos en el Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016.

Además, también se ha contado con la financiación del proyecto de investigación BIA2017-87131-R, del Programa estatal de I+D+I Orientada a los Retos de la Sociedad (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) y el grupo de investigación FQM-363 de la Universidad de Jaén.

La realización de la estancia internacional enmarcada en esta Tesis Doctoral fue financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, a través de su convocatoria para ayudas complementarias destinadas a beneficiarios del subprograma de formación del profesorado universitario convocatoria 2017 (referencia EST17/00296). Dicha estancia de investigación fue realizada en el centro: Institute of Chemical Technologies and Analytics. Division of Environmental and Process Analytical Chemistry, bajo la dirección del Prof. Dr. Bernard Lendl, de la Universidad Técnica de Viena (Austria).



# ÍNDICE

---



# Índice

Resumen.....	19
Abstract .....	25
<b>1. Introducción.....</b>	<b>29</b>
1.1 Términos y conceptos básicos .....	33
1.2 Modos de registro y adquisición de imágenes hiperespectrales .....	35
1.2.1 Métodos de escaneo espacial .....	35
1.2.2 Métodos de escaneo espectral .....	37
1.3 Ventajas e inconvenientes de las imágenes hiperespectrales .....	41
1.4 Aplicaciones de las imágenes hiperespectrales .....	44
1.5 Espectroscopía vibracional e imágenes hiperespectrales .....	55
1.5.1 Espectroscopía infrarroja .....	56
1.5.2 Espectroscopía Raman .....	58
1.5.3 Configuración para la adquisición de imágenes hiperespectrales en infrarrojo y Raman .....	61
1.6 Tratamiento de datos y quimiometría .....	74
<b>2. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>85</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>89</b>
3.1 Muestras analizadas.....	91
3.1.1 Muestras de origen biológico. Aceitunas .....	91
3.1.2 Muestras de interés pictórico .....	93
3.1.3 Muestras de origen plástico.....	101
3.2 Procedimiento experimental e instrumentación.....	102
3.2.1 Preparación de muestra para la medida.....	102
3.2.2 Adquisición de imágenes hiperespectrales .....	105
3.2.3 Análisis complementarios.....	110
3.2.4 Herramientas de software y quimiometría.....	119

<b>4. Bibliografía.....</b>	121
<b>5. Discusión conjunta de resultados.....</b>	141
5.1 Estudios de transformaciones químicas .....	144
<i>Imágenes hiperespectrales de espectroscopía FTIR para el estudio del proceso de maduración de la aceituna/Hyperspectral FTIR imaging of olive fruit for understanding ripening processes.....</i>	144
Abstract .....	146
1. Introduction.....	147
2. Materials and methods .....	149
2.1 Fruit samples .....	149
2.2 Sample preparation .....	150
2.3 FTIR- Hyperspectral imaging acquisition.....	150
2.4 Chemometrics analysis .....	150
3. Results and discussion.....	151
3.1 Infrared spectra of the olive fruit.....	151
3.2 FTIR imaging of olive fruit tissues .....	153
3.3 Characterization of spectral changes during ripening.....	159
4. Conclusions .....	164
Acknowledgments.....	166
References .....	166
<i>Monitorización de procesos de degradación de muestras pictóricas acelerados por radiación UV, empleando microimágenes hiperespectrales FTIR y quimiometría/Monitoring UV-accelerated alteration processes of paintings by means of hyperspectral micro-FTIR imaging and chemometrics.....</i>	173
Abstract .....	175
1. Introduction.....	176
2. Materials and methods .....	179
2.1 Samples preparation.....	179

2.2 Instrumentation .....	180
2.2.1 Ageing approach.....	180
2.2.2 Sample characterization.....	180
2.2.3 Data analysis.....	182
3. Results .....	182
3.1 Visual and colorimetric impact of ageing .....	183
3.2 IR microspectroscopic characterization.....	187
4. Conclusions .....	199
Acknowledgments.....	200
References .....	201
5.2 Análisis multimodal.....	208
<i>¿Natural o sintético? Microimágenes hiperespectrales simultáneas de señal Raman/luminiscencia para la diferenciación rápida de pigmentos de azul ultramar/Natural or synthetic? Simultaneous Raman/luminiscence hyperspectral microimaging for the fast distinction of ultramarine pigments .....</i>	<i>209</i>
Abstract .....	210
1. Introduction.....	211
2. Materials and methods .....	215
2.1 Pigment samples.....	215
2.2 Historical blue decorations .....	215
2.3 Instrumentation .....	216
3. Results .....	219
3.1 Pigments characterization: colour and elemental composition.....	219
3.2 Raman Microspectroscopy.....	222
3.3 Application to the investigation of historical decorations .....	230
4. Conclusions .....	235

Acknowledgments.....	236
References .....	236
<i>Cubo multisensor por fusión de imágenes hiperespectrales para el microanálisis de pigmentos azul ultramar/Multisensor hyperspectral imaging approach for the microchemical analysis of ultramarine blue pigments ...</i>	243
Abstract .....	246
1. Introduction.....	247
2. Materials and methods .....	249
2.1 Samples .....	249
2.2 Instrumentation .....	250
2.3 Multimode hyperspectral imaging procedure.....	252
2.4 Spectral descriptors selection and chemometrics .....	253
3. Results and discussion.....	255
3.1 Exploratory analysis .....	255
3.2 Multisensor analysis .....	259
Conclusions.....	263
Acknowledgments.....	264
References .....	264
5.3 Mediciones en modo remoto .....	271
<i>Imágenes hiperespectrales Raman para la identificación remota de materiales: comparación entre el registro a distancia en modo punto a punto y mediante captura directa/Comparing mapping and direct hyperspectral imaging in stand-off Raman spectroscopy for remote material identification.....</i>	271
Abstract .....	273
1. Introduction.....	274
2. Materials and methods .....	277

2.1 Pointwise stand-off Raman imager (PI).....	278
2.2 Direct stand-off hyperspectral Raman imager (HSRI) .....	279
2.3 Chemometric methods .....	279
2.4 Chemicals.....	280
3. Results and discussion.....	280
3.1 Illumination system.....	280
3.2 Spectral investigations .....	282
3.3 Signal to noise.....	284
3.4 Chemometric image analysis.....	291
4. Conclusions .....	293
Acknowledgments.....	295
References .....	295
<i>Identificación de pigmentos históricos mediante espectroscopía Raman a distancia .....</i>	<i>299</i>
Resultados y conclusiones.....	299
Bibliografía .....	309
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>311</b>
Conclusions .....	317
<b>Anexo 1: Contribuciones científicas .....</b>	<b>321</b>
Publicaciones .....	323
Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.....	325
Actividades de divulgación científica.....	329
<b>Anexo 2: Estancias en centros de investigación I+D .....</b>	<b>331</b>



## RESUMEN

---



## Resumen

Esta Tesis presenta el estudio de imágenes hiperespectrales (HSI) de espectroscopía vibracional para demostrar su potencial analítico en diversas aplicaciones de interés científico. La memoria, que se presenta por la modalidad de compendio de artículos, está estructurada en una serie de capítulos que recogen los aspectos clásicos de una investigación científica: Introducción, Objetivos, Materiales y Métodos, Discusión de Resultados y Conclusiones.

Así, la Introducción desarrolla las características más destacadas de las imágenes hiperespectrales, sus ventajas y principales aplicaciones. En esta Tesis se han utilizado las HSI para el estudio de transformaciones químicas y la caracterización de diversos materiales. Para ello, se profundiza en las espectroscopías infrarroja y Raman como técnicas principales de adquisición de la información hiperespectral, las cuales destacan por su carácter no invasivo, no destructivo y por la escasa necesidad de preparación de muestra. Se exponen los Objetivos y, además, se presentan los casos de estudio, los cuales incluyen desde la investigación de los cambios químicos en la maduración de la aceituna y el envejecimiento de pinturas, a la caracterización de materiales pictóricos y plásticos. Las principales características de estas muestras se recogen en el capítulo de Materiales y Métodos, en el que se describe en detalle la instrumentación analítica utilizada y los modos de adquisición empleados en cada caso.

Debido a la cantidad de espectros registrados para cada imagen hiperespectral, es indispensable el uso de herramientas de análisis multivariante. Con ellas ha sido posible, en primer lugar, la gestión y reducción de datos espectrales para condensar al máximo toda la información relevante contenida en los mismos. En este contexto pueden incluirse las técnicas de preprocesamiento espectrales

y espaciales, así como la obtención de imágenes químicas en falso color que muestren la distribución de la intensidad, área o ratio de los componentes químicos deseados. Entre ellas destacan los métodos iniciales de reconocimiento o exploración como el análisis de componentes principales (PCA), los métodos de segmentación, como el análisis jerárquico de conglomerados (HCA), los de resolución de mezclas espectrales como el análisis de componentes vértice (VCA) y los de regresión y clasificación como el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

El capítulo de Discusión de Resultados está compuesto por cuatro artículos publicados en revistas internacionales e indexadas en el JCR, uno más que está en proceso de redacción y algunos resultados no publicados. Además del propio artículo, en todos los casos se incluye una breve introducción que recoge el interés de cada caso de estudio, sus principales características y los resultados obtenidos, incidiendo en la importancia del uso de las HSI.

En el caso de los trabajos dedicados al estudio de las transformaciones químicas en procesos en evolución, el énfasis se centra en entender los cambios espectrales producidos durante los mismos. Entre ellos se encuentra, por una parte, el proceso biológico que tiene lugar en el fruto de la aceituna durante la maduración, prestando especial atención a los cambios en la composición bioquímica de sus distintos tejidos. Por otra parte, se ha estudiado la degradación de materiales pictóricos sobre soporte de yeso con muestras modelo de varias mezclas pigmento-aglutinante, sometidas a sucesivos envejecimientos acelerados mediante exposición a radiación ultravioleta (UV).

Se ha profundizado, además, en la utilización de HSI para la caracterización multimodal de muestras de interés histórico y cultural. En estos casos se ha hecho especial hincapié en la utilidad de combinar información espectral de

distinto origen. Así, se han utilizado dos estrategias, aprovechar toda la información espectral de distinto origen que, en ocasiones, se puede obtener con un único instrumento; y combinar información de diferentes instrumentos. Ambos casos se han enfocado en la caracterización del ultramar, un pigmento azul muy apreciado a lo largo de la historia. Para la primera estrategia se tiene en cuenta que el espectro Raman de este pigmento, registrado con una excitación de 785 nm, contiene no sólo información acerca de la dispersión Raman, sino también señales de luminiscencia. El uso combinado de toda esta información espectral resulta muy eficaz para diferenciar entre pigmentos de distinta naturaleza (natural o sintética) y ha demostrado su utilidad a la hora de establecer un rango de calidad entre en muestras naturales obtenidas por purificación del lapislázuli de diferente calidad de extracción (desde muestra pura a cenizas).

Como segunda estrategia, se ha ahondado en el tratamiento de imágenes mediante la combinación de datos hiperespectrales registrados con diversas técnicas analíticas sobre la misma muestra de pigmento. De esta forma, la creación de un cubo multisensor permite el análisis complementario y posibilita la obtención de información analítica más completa y robusta sobre la sustancia en cuestión, habiendo fusionando técnicas vibracionales, elementales e isotópicas en un mismo estudio. Para ello, se han empleado la microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de dispersión de energías (SEM-EDX), la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente y ablación láser (LA-ICP-MS).

Finalmente, el último apartado de Resultados se dedica a la adquisición de imágenes Raman en modo remoto o a distancia. Esta metodología combina el poder analítico de la espectroscopía con las ventajas de realizar experimentos

manteniendo una distancia física entre el investigador y los objetos de estudio. Se han comparado distintas metodologías de registro hiperespectral, incluyendo métodos de escaneo espacial, como el registro punto a punto, y métodos de escaneo espectral, como la captura de área. Así, se han podido analizar muestras poliméricas de distinta naturaleza situadas a 15 m y se han realizado estudios de viabilidad de identificación de pigmentos históricos.

Como complemento a las imágenes hiperespectrales, en ocasiones se ha recurrido al uso de medidas puntuales adicionales con diversas técnicas analíticas para completar la información de las muestras. Para ello, se han empleado, entre otras, microscopía óptica digital, espectroscopía de reflectancia de fibra óptica (FORS) y colorimetría, técnicas cristalográficas como la difracción de rayos X (XRD) y técnicas de análisis elemental como la fluorescencia de rayos X (XRF). De esta forma, ha sido posible, por ejemplo, comprobar la presencia de minerales accesorios en la composición de pigmentos naturales de azul ultramar o demostrar la variación en cuanto a color, luminosidad y brillo de distintos pigmentos sometidos a tratamientos de envejecimiento controlados.

## Abstract

This Thesis aims to demonstrate the analytical potential of the hyperspectral images (HSI) of vibrational spectroscopy for several applications of scientific interest. The Ph.D. Dissertation, according to University's regulations, is presented as a compendium of published articles. It has been organized in chapters that collect the classic aspects of scientific research: Introduction, Objectives, Materials and Methods, Results and Discussion, and Conclusions.

Thus, the Introduction chapter is devoted to the most outstanding characteristics of hyperspectral imaging, as well as the advantages over conventional single measurements. In this Thesis, HSI have been used for the study of chemical processes and the characterization of several materials. To achieve that, infrared and Raman spectroscopies, very well known for their non-invasive and non-destructive nature and the low necessity of sample preparation, have been employed as main hyperspectral acquisition techniques. Hypothesis and general aims are exposed in the corresponding chapter together with the cases of study. They include the analysis of chemical changes in olive fruit ripening and the artificial ageing of paints, as well as the characterization of pictorial and plastic materials. The main characteristics of these samples are discussed in the Materials and Methods section, describing in detail the analytical instrumentation required and the acquisition modes used in each case.

Due to the large number of spectra recorded in each mapping, the use of multivariate analysis tools becomes essential. With them, it has been possible, first, to manage and reduce spectral data in order to condense as much as possible all relevant information contained. This includes both spectral and spatial preprocessing, as well as false-color chemical imaging to show the

distribution of the intensity, area or ratio of the desired chemical components. Exploratory analysis was performed by using principal component analysis (PCA) and segmentation methods such as hierarchical cluster analysis (HCA). Furthermore, spectral mixture resolution techniques such as vertex component analysis (VCA), and those of regression and classification such as partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), were employed.

Results and Discussion chapter is composed by the transcription of four research papers (already published in international journals indexed in JCR©), one work still in the revising/writing process and some unpublished results. In addition to the article itself, in all cases a brief introduction is presented, including its scientific interest and the main results obtained, emphasizing the importance of the employment of HSI.

In the case of studies devoted to the analysis of chemical processes, the greater significance lies in the understanding of the spectral changes monitored. These studies include, on the one hand, the biological process happening in the olive fruit during ripening, paying special attention to biochemical changes in the composition of its different tissues. On the other hand, the degradation of pictorial materials on plaster support has been studied with model samples, composed of various pigment-binder mixtures subjected to successive accelerated ageing by exposure to ultraviolet (UV) radiation.

Furthermore, the use of HSI for the multimodal characterization of samples of cultural and historical interest has been deeply explored. In this context, special emphasis has been placed on the usefulness of combining spectral information from different sources. Thus, two strategies have been followed: to take advantage of all the spectral information from different sources that

can sometimes be obtained with a single instrument; and combining information from different instruments. In both cases, the study has focused on the characterization of ultramarine, a blue pigment highly appreciated throughout history. The first strategy takes into account that the Raman spectrum of this pigment, when recorded with a 785 nm excitation source, contains not only information about the Raman scattering, but also luminescence signals. The combined use of all this spectral data is very effective in distinguishing between pigments of different nature (natural or synthetic) and has proven its feasibility to establish a quality range in natural samples obtained by purification of semi-precious lapis lazuli rock.

As a second strategy, image processing has been further developed by combining hyperspectral data recorded with different analytical techniques on the same pigment sample. In this way, the creation of a multisensor cube allows complementary analysis and makes it possible to obtain more robust and complete analytical information of the sample. To get that, vibrational, elemental and isotopic techniques have been merged in the same study. Raman microspectroscopy, scanning electron microscopy with energy dispersion spectroscopy (SEM-EDX), secondary ion mass spectrometry (SIMS), and inductively coupled plasma mass spectrometry and laser ablation (LA-ICP-MS) were used.

Finally, the last section of this dissertation is dedicated to the acquisition of remote Raman images. This methodology combines the analytical power of vibrational spectroscopy with the advantages of conducting experiments while maintaining a physical distance between the researcher and the studied sample. Different hyperspectral recording techniques have been compared, including spatial scanning, such as point-to-point and spectral scanning, such

## Abstract

as starting. Thus, it has been possible to analyze polymeric samples of different nature located at 15 m and to evaluate the feasibility of identifying historical pigments.

As a complement to hyperspectral images, it has sometimes been necessary to register single measurements to complete the information of the samples. For this purpose, optical microscopy, fiber optic reflectance spectroscopy (FORS), X-ray diffraction (XRD) and X-ray fluorescence (XRF) have been used, among others. In this way, it has been possible, for example, to verify the presence of accessory minerals in the composition of ultramarine blue pigments or to demonstrate the variation in terms of color, luminosity and brightness of different pigments subjected to controlled ageing treatments.

# 1. INTRODUCCIÓN

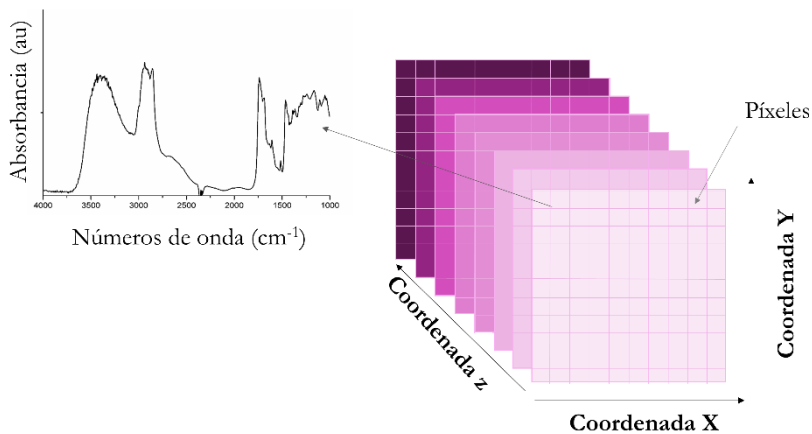
---



## 1. Introducción

El gran potencial de adquisición de información que proporciona el registro de imágenes hiperespectrales ha permitido que numerosos campos científicos adopten su utilización como un método común de análisis. Además, el desarrollo tecnológico producido en las últimas décadas y los avances relativos a la ingeniería de la instrumentación, han hecho viable su uso en multitud de ámbitos.

Una imagen hiperespectral puede definirse como un cubo de datos en tres dimensiones (hipercubo), que contiene información espacial (vectores espaciales  $x$  e  $y$ ) y la componente espectral (vector  $z$ ). De esta manera y, como se muestra en la Figura 1, la imagen visible registrada está constituida por multitud de píxeles; es decir, por áreas perfectamente definidas que tienen asociadas dos coordenadas espaciales únicas y las características espectrales recogidas en el rango de medida <sup>1,2</sup>.



**Figura 1.** Esquema básico de una imagen hiperespectral en el que se incluyen las coordenadas espaciales y componente espectral

## Introducción

Así, para que una imagen hiperespectral sea considerada como tal, deben cumplirse dos condiciones principales:

- Que cada uno de los píxeles que la conforman pueda ser expresado y diferenciado en base a sus características espectrales y, por tanto, puede ser objeto de transformaciones espectrales, tratamientos de datos o diferentes tipos de análisis post-adquisición.
- Poseer un elevado y suficiente número de variables espectrales, normalmente establecido como mayor de 100.

De hecho, ésta puede considerarse como la principal diferencia entre una imagen hiperespectral y una imagen multispectral. Las imágenes multispectrales están compuestas por un número limitado de variables (bandas espectrales) y, además, no siempre es necesario que sean contiguas en el rango escogido<sup>2</sup>. Sin embargo, de una imagen hiperespectral se obtiene un espectro continuo en todo el rango de medida y en todos los píxeles analizados, ya que sí está compuesta por bandas contiguas entre sí. Esto se considera como una ventaja, debido a que las imágenes hiperespectrales no necesitan un conocimiento ni estudio profundo previo de las muestras a analizar, por lo que no hay que seleccionar bandas espectrales específicas antes del registro<sup>3</sup>.

A continuación (Tabla 1) se muestran las principales diferencias entre espectroscopía, imágenes multispectrales e imágenes hiperespectrales.

**Tabla 1.** Características diferenciadoras entre imágenes hiperespectrales, multiespectrales y espectroscopía

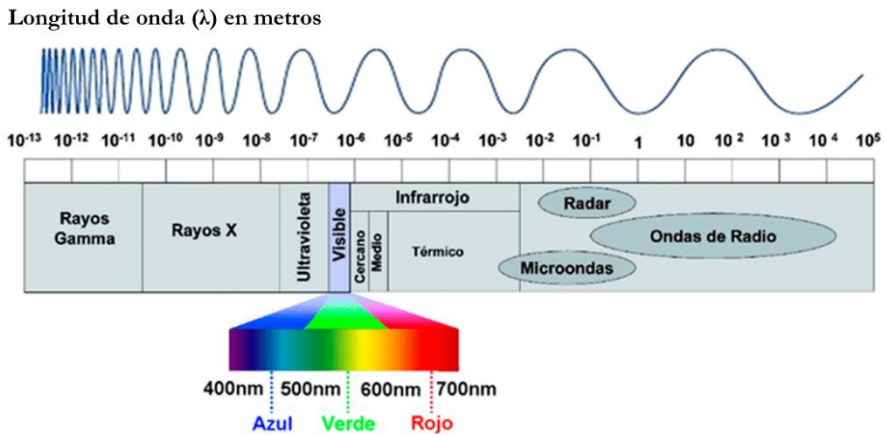
	<b>Imágenes hiperespectrales</b>	<b>Imágenes multiespectrales</b>	<b>Espectroscopía</b>
Información espectral	✓	Limitada	✓
Información espacial	✓	✓	✗
Información cualitativa y cuantitativa	✓	Limitada	✗
Información multi-componente simultánea	✓	Limitada	✓
Capacidad de creación mapas de distribución	✓	Limitada	✗
Detección sustancias de tamaño mínimo	✓	✓	✗
Necesidad preparación de muestra específica	✗	✓	✓

## 1.1 Términos y conceptos básicos

A la hora de caracterizar todas las variables que tienen un papel significativo en la adquisición y tratamiento de las imágenes hiperespectrales, es primordial definir algunos conceptos básicos y expresiones comunes. Además, cuando se procede al registro experimental, existen numerosos parámetros relativos a la calidad del espectro o imagen obtenidos y a la instrumentación utilizada<sup>4,5</sup>:

- Rango espectral: referido a la región del espectro electromagnético escogida para la medida. Cada una de estas regiones (mostradas en la Figura 2) se relaciona con una transición atómica o molecular diferente,

dependiendo de la energía correspondiente. Usualmente, los sistemas de espectroscopía de imagen pueden cubrir desde la zona ultravioleta (4-400 nm) hasta la zona de infrarrojo cercano (800-2500 nm), pasando por el espectro visible (380-800 nm), en función de la aplicación deseada.



**Figura 2.** Espectro electromagnético clasificado según la longitud de onda ( $\lambda$ ) de las distintas regiones. Fuente: Viera-González, 2014<sup>6</sup>

- Resolución espectral: es un término que expresa el límite máximo de la capacidad del sistema (espectrómetro) para diferenciar y separar dos caracteres espectrales adyacentes. Está, por tanto, estrechamente relacionado con el ancho de las bandas obtenidas (a mayor resolución espectral, menor anchura de banda) y con la frecuencia con la que el sensor registra información.
- Resolución espacial: indica la unidad espacial más pequeña de muestra que el sensor puede distinguir y atribuir como diferente al resto de características espaciales que le rodean. Es decir, cuanto mayor sea la resolución espacial de un sistema de imagen, mayor capacidad de detalle

y fidelidad a la realidad podrá ser conseguida. A efectos prácticos, esta resolución espacial suele estar representada en el tamaño de cada píxel bidimensional de medida.

- **Relación Señal/Ruido:** explica la relación existente entre el nivel de señal deseada (por ejemplo, intensidad de banda) con respecto al nivel de ruido de fondo obtenido. En este contexto, cuanto más alta sea dicha relación, menos molesto es el ruido de fondo a la hora de resolver e interpretar correctamente una banda espectral<sup>7</sup>.

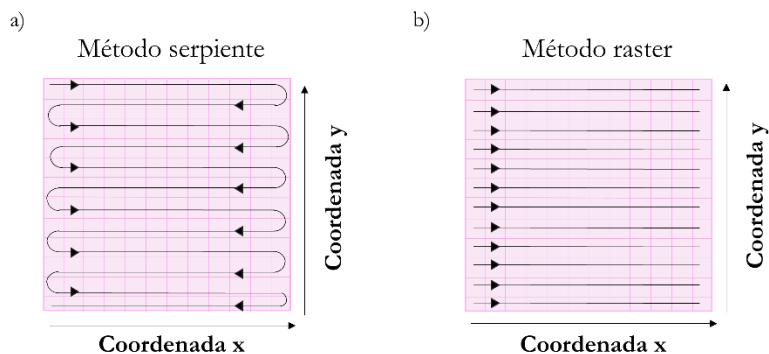
## **1.2 Modos de registro y adquisición de imágenes hiperespectrales**

Dentro de los métodos de adquisición de imágenes hiperespectrales pueden encontrarse dos modalidades<sup>8,9,10</sup> : **espacial** y **espectral**, las cuales se clasifican en función de la técnica de escaneo empleada (ver Figura 4). A continuación, se detallan las particularidades y características propias de cada uno de ellos, así como las principales aplicaciones en las que su uso es más ventajoso:

### **1.2.1 Métodos de escaneo espacial**

Son aquellos métodos en los que la muestra es trasladada de un píxel a otro tras la finalización de cada medida, modificando de esta forma, sus coordenadas espaciales en dicho movimiento<sup>2,8,11</sup>. Existen dos tipos de escaneo espacial: punto a punto y lineal.

- En el método de escaneo **punto a punto** (también conocido como “*whiskbroom*”), se obtiene el espectro de un píxel de la imagen en cada movimiento, utilizando la pletina motorizada en dos direcciones para posicionar la muestra en el siguiente píxel (variables espaciales x e y diferentes) tras acabar la adquisición<sup>12,13</sup>. Una vez finalizada la primera línea de píxeles en la imagen visible, se continúa con el mismo procedimiento en la segunda línea, y así sucesivamente hasta finalizar todos los píxeles de la zona deseada. Esto puede realizarse mediante el método serpiente o el método *raster*, en función de la dirección de adquisición entre líneas de píxeles consecutivas (ver Figura 3).



**Figura 3.** Diferentes métodos de escaneo punto a punto: (a) serpiente o (b) raster

Por lo tanto, en el cubo de datos hiperespectrales obtenido, la información es secuencial y puede visualizarse un espectro completo (en el rango espectral escogido) en cada píxel de la imagen visible, lo cual desemboca en una gran cantidad de datos siempre accesibles desde el software de tratamiento. Sin embargo, este método de adquisición es el que más tiempo total emplea, puesto que hay que recolocar la muestra después de cada medida.

- El método de **escaneo lineal** (también denominado “*pushbroom*”), puede considerarse como una extensión del anterior, en el que la única variación consiste en adquirir simultáneamente las características, tanto espectrales como espaciales, de una fila (o columna) de píxeles completa<sup>14,15,16</sup>. En consecuencia, el resultado final es un cubo de datos hiperespectrales completo, con información en todo el rango espectral de medida para cada uno de los píxeles que forman parte de la línea bidimensional escogida (de la cual se obtiene una imagen visible completa y asociada a las medidas experimentales llevadas a cabo). Una vez finalizada la adquisición en dicha línea, se puede continuar con otra línea o con varias de ellas, hasta conseguir el volumen de datos que se desee.

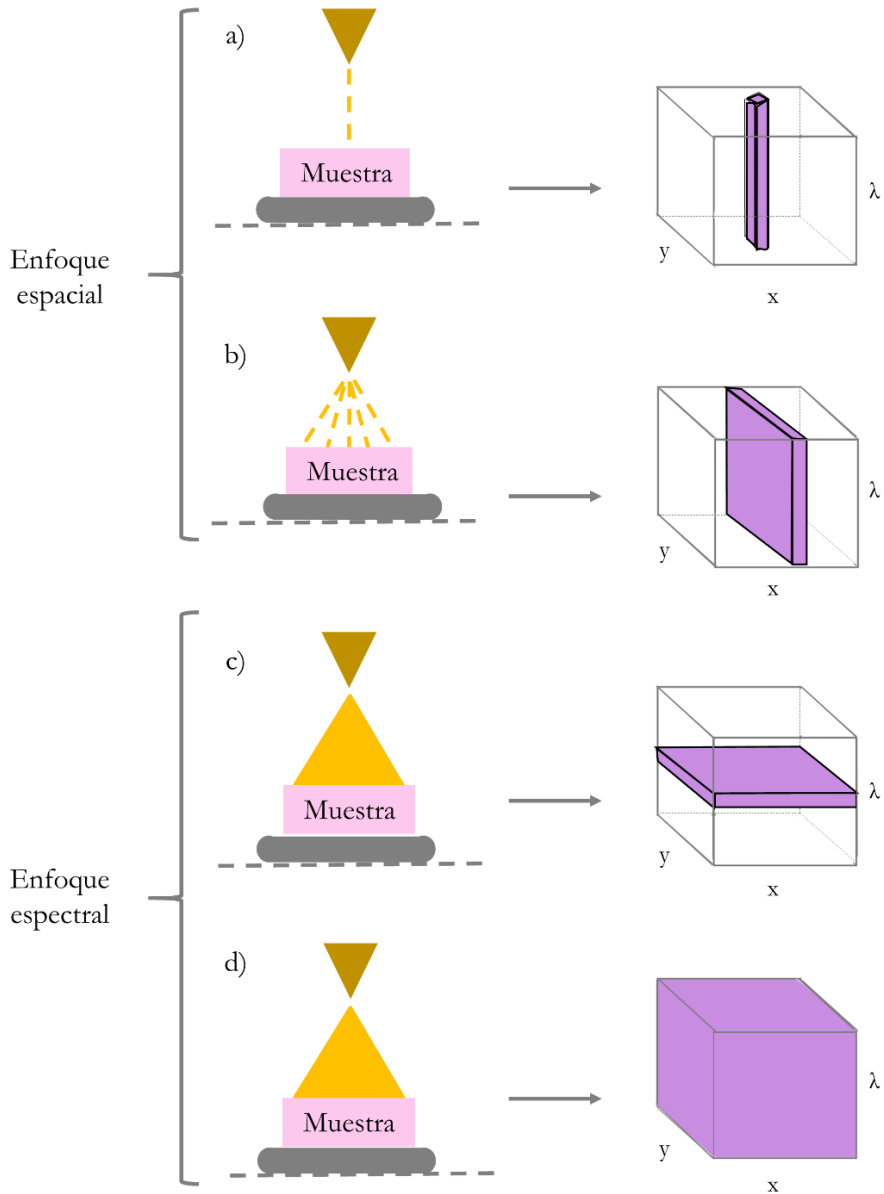
Al registrar una línea de píxeles a la vez, este método reduce considerablemente el tiempo de exposición con respecto al método de punto a punto<sup>17</sup>. Es aconsejable para muestras con características espectrales especialmente representativas en una zona aislada, o en el caso de cintas transportadoras en continuo movimiento, como las que se utilizan en las industrias alimentarias con secciones de procesado de alimentos. De hecho, esta es la técnica más utilizada en las empresas de inspección y gestión de la calidad alimentaria<sup>18,19,20</sup>.

### 1.2.2 Métodos de escaneo espectral

Son aquellos en los que la muestra permanece estática en su soporte durante todo el transcurso de la medida, siendo la longitud de onda la variable que cambia para cada adquisición<sup>2,8,21</sup>. Pueden dividirse en enfoque de área y captura espectral.

- En el método de **escaneo por área** (o modo de banda secuencial, “*staring*”), se selecciona una única variable espectral (longitud de onda) y se obtiene una imagen visible en dos dimensiones (coordenadas espaciales x e y) en las que se representa la distribución espacial de dicha variable en toda la zona escogida<sup>22,23</sup>. Después de la adquisición, se pueden seguir escogiendo variables del rango espectral que se desee para construir el cubo hiperespectral de datos completo. Por lo tanto, el resultado final será una secuencia de longitudes de onda con su distribución espacial asociada en la imagen visible de la muestra. Es idóneo para las aplicaciones en las que lo primordial es la obtención de la información espacial relacionada con cada banda espectral y, debido a que la muestra no sufre ninguna traslación durante la medida experimental, también es de aplicación para las muestras que deban permanecer estacionarias durante un cierto tiempo. Además, es posible variar el tiempo de exposición para cada adquisición (según los requerimientos de cada experimento).

- Por último, el método de escaneo de **captura espectral** (“*snapshot*”) es aquel en el que se recoge toda la información espacial y espectral de la zona de muestra escogida en una única adquisición<sup>24,25</sup>. En este caso y, a diferencia de todos los métodos anteriores, ningún escaneo en las direcciones espaciales x, y o z son necesarias a la hora de obtener la imagen hiperespectral completa en 3 dimensiones. Sin embargo, este tipo de escaneo es aún el menos utilizado, pues es el que se encuentra menos desarrollado tecnológicamente en la actualidad y presenta mayores retos en cuanto a la selección de rangos espectrales y valores óptimos de resolución (tanto espaciales como espectrales). Sería el método idóneo para aquellas aplicaciones en las que se requieran adquisiciones rápidas de toda la muestra, como por ejemplo en cadenas industriales con medidas rutinarias de control.



**Figura 4.** Métodos de escaneo y adquisición de imágenes hiperespectrales. Enfoque espacial: (a) punto a punto y (b) lineal y enfoque espectral: (c) de área y (d) de captura espectral. Adaptado de Qin, 2010<sup>8</sup>, Grahn, 2007<sup>2</sup> y Lu, 2017<sup>21</sup>.

## Introducción

Además, se puede considerar la adquisición de imágenes hiperespectrales en modo microscópico y en modo macroscópico.

La elección del método de adquisición idóneo y más eficaz va a depender siempre de la aplicación de uso y de la instrumentación disponible. A modo de ejemplo, si el objetivo es analizar una sustancia en detalle, buscando analizar componentes minoritarios o detectar impurezas a nivel microscópico, el método de enfoque espacial de escaneo de punto a punto sería el más adecuado. Si, por el contrario, se desea analizar una única zona de muestra y se requiere de movimiento, el modo de escaneo lineal puede ser muy útil. Por último, en aquellos casos en los que la finalidad sea obtener información general de la muestra y se disponga de un gran número de muestras a analizar de forma sistemática, el modo de escaneo espectral de área podría suponer la mejor opción.

En modo macroscópico, uno de los aspectos de más interés es la posibilidad de realizar medidas en modo remoto, de camino abierto o *stand-off*. En esta técnica se establece una distancia física entre la instrumentación y la muestra a analizar. De esta forma, se consiguen ciertas ventajas como la mayor seguridad del operario y permite el estudio de objetos o sustancias difíciles de alcanzar para una medida convencional o que pudieran resultar frágiles o potencialmente peligrosas (como, por ejemplo, debido a su naturaleza explosiva).

### **1.3 Ventajas e inconvenientes de la adquisición de imágenes hiperespectrales**

En el análisis de ciertas muestras (especialmente si se trata de materiales heterogéneos) y en el estudio de diversos procesos, el hecho de poder contar con información espacial en correspondencia con los datos espectrales, es vital para poder caracterizar, analizar y obtener datos cuantitativos de la muestra.

En comparación con las medidas puntuales de adquisición de espectros y las técnicas de imagen tradicionales, el registro de imágenes hiperespectrales presenta numerosas ventajas, lo cual las hace muy versátiles para multitud de aplicaciones científicas:

- ✓ No requiere preparación de muestra específica. Si bien es cierto que es conveniente un estudio preliminar de la superficie a analizar, en la mayoría de casos no requiere de tratamientos físico-químicos relevantes.
- ✓ Se trata de una técnica respetuosa con el medio ambiente, no invasiva y no destructiva, por lo que la muestra puede someterse a análisis sucesivos e, incluso, ser reutilizada y estudiada con posterioridad mediante el empleo de otras metodologías analíticas.
- ✓ Permite seleccionar las zonas de interés antes de la medida, pudiendo variar el tamaño o forma de la imagen visible y siendo posible la modificación de los parámetros instrumentales establecidos tras la adquisición.

## Introducción

- ✓ Proporciona información cualitativa y cuantitativa, posibilitando así la detección y cuantificación de componentes diferentes de forma simultánea en la misma muestra.
- ✓ A partir de la información espectral contenida en la totalidad de la medida, es posible diferenciar entre varias zonas o componentes incluso cuando presenten el mismo color visible o características superficiales similares.
- ✓ Mediante un tratamiento de datos adecuado, ofrece información selectiva y específica sobre la distribución espacial de los distintos componentes (bio)-químicos de una determinada muestra. Es decir, basándose en el principio de que compuestos de composición química similar deben exhibir patrones espectrales similares, se pueden construir mapas bidimensionales de distribución espacial usando una escala en falso color. Éstos representan un mapa de la intensidad relativa de la altura, área o ratio de las bandas espectrales deseadas en la totalidad de la imagen visible seleccionada utilizando para ello tonalidades frías (como azul o morado) para los valores bajos o colores cálidos (como naranja o rojo) para valores elevados<sup>5,26,27</sup>. Aunque estas formas de representación son ampliamente usadas para todo tipo de sustancias, la información obtenida es especialmente relevante en materiales heterogéneos, en los cuales queda patente la diferenciación indudable entre zonas o áreas visiblemente distinguibles.

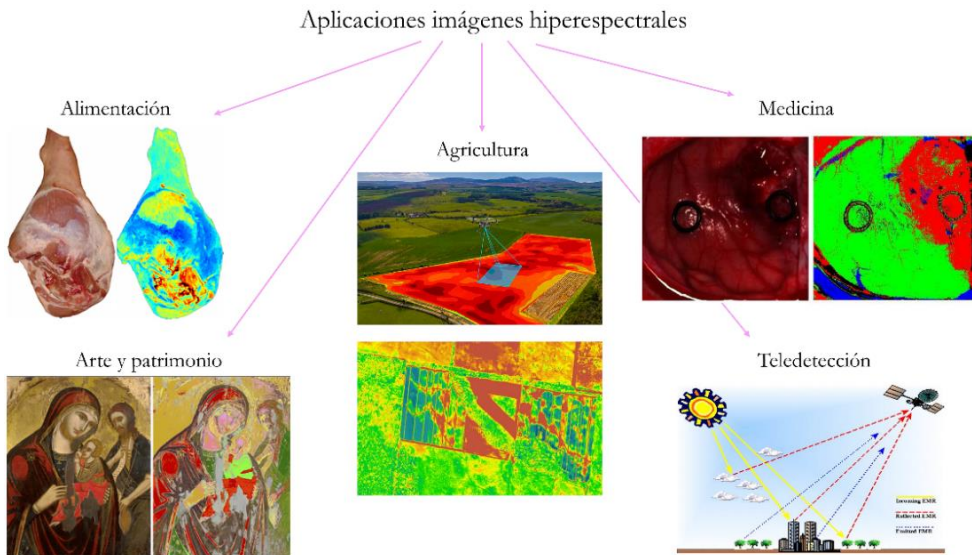
A pesar de todos los aspectos anteriores, en los que las imágenes hiperespectrales destacan por su versatilidad y potencial para numerosas aplicaciones científicas, también cuentan con algunas desventajas:

- ✘ Puesto que en su registro se adquiere tanto la información espacial como espectral en un elevado número de píxeles, el resultado final es un cubo de datos de gran tamaño, necesitando en la mayoría de los casos de sofisticados programas de software y avanzadas técnicas de quimiometría para su interpretación.
- ✘ El potencial y la relevancia de la información obtenida van a verse mermados en el caso de líquidos o muestras demasiado homogéneas. Incluso si existen pequeñas heterogeneidades, éstas deben presentar pautas espectrales diferentes para poder ser diferenciadas.
- ✘ A veces, al registrar el espectro de un determinado píxel se obtiene una combinación espectral con contribuciones de varios de los componentes presentes (píxeles mezcla). En estos casos pueden observarse bandas solapadas o espectros con multitud de bandas en el rango adquirido.
- ✘ En muchas ocasiones, tanto el tiempo de adquisición en cada píxel (y, por tanto, el tiempo total de la medida), como el tratamiento de datos posterior, se ven incrementados hasta convertirse en una técnica no rentable para medidas in situ, análisis de control rutinarios o determinadas aplicaciones industriales. No obstante, siempre existe la posibilidad de, mediante un escaneo previo, seleccionar un número limitado de variables o longitudes de onda cuya distribución espacial sea de interés y registrar una imagen multiespectral, reduciendo de esta forma el tiempo de adquisición y el volumen de datos obtenidos<sup>28</sup>.

## 1.4 Aplicaciones de las imágenes hiperespectrales

Los primeros usos científicos del término “Imagen Hiperespectral” datan de la década de 1980, cuando su utilización en el campo de la detección remota empezó a mostrar sus frutos con aplicaciones de mapeos de depósitos minerales terrestres<sup>29,30,31</sup>. A raíz de dichas investigaciones, se comenzó a hacer uso de esta tecnología para el análisis de parámetros biofísicos con fines forestales<sup>32</sup>, ecología y vegetación mediante el empleo de sensores<sup>31,33</sup> o estudios atmosféricos<sup>34</sup>, entre otros. A su vez, también comenzaron a desarrollarse los primeros programas informáticos de software para el tratamiento del gran volumen de datos generados con estas medidas, algo pionero en la época<sup>35</sup>.

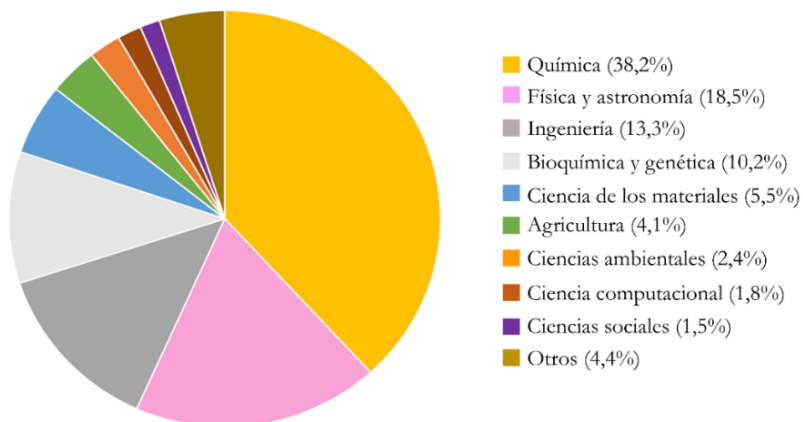
Desde entonces, la adquisición de imágenes hiperespectrales empezó a establecerse como una metodología habitual en muchas áreas diferentes. El reconocimiento de objetivos militares como misiles, aviones o transportes terrestres<sup>36,37,38,39</sup>, diagnósticos médicos orientados a identificar células malignas y cancerosas<sup>40,41,42</sup>, estudios sobre una gran variedad de tejidos (micro) biológicos<sup>43,44,45,46</sup>, o el potencial agrícola del terreno en base a sus componentes<sup>47,48,49,50</sup> son sólo algunos de los múltiples sectores que actualmente utilizan las imágenes hiperespectrales de manera habitual y con multitud de objetivos diferentes<sup>51</sup> (ver Figura 5).



**Figura 5.** Ejemplo de aplicaciones comunes de las imágenes hiperespectrales en distintos sectores científicos en la actualidad. Adaptado de (Román-González, 2013)<sup>52</sup>, (Cosentino, 2015)<sup>53</sup> y AECC (Asociación Española de Comunicación Científica)<sup>54</sup>

Si se lleva a cabo una revisión bibliográfica incluyendo todos aquellos libros y artículos científicos publicados en revistas internacionales e indexadas en el Journal of Citation Reports® que emplean la adquisición de imágenes hiperespectrales, pueden encontrarse un total de más de nueve mil publicaciones (más de dieciocho mil si además se tienen en cuenta actas de congresos, revisiones, cartas, etcétera). De entre todas las aplicaciones científicas antes mencionadas, el uso de esta metodología en química está, desde hace un par de décadas, en continuo y exponencial crecimiento. De hecho, cabe destacar que, de entre todos los resultados obtenidos, más del 38% corresponden a análisis o estudios relacionados con la química (ver Figura 6), seguidos en orden decreciente por investigaciones en áreas como la física y astronomía (18,5%), distintas ramas de la ingeniería (13,3%) y la bioquímica, genética y biología molecular (10,2%). Es igualmente reseñable el hecho de que más del 90% de

estos estudios han sido realizados en los años comprendidos entre el 2010 y la actualidad (datos recogidos hasta enero del año 2021).



**Figura 6.** Gráfico porcentual que muestra la relación entre el número de artículos científicos publicados sobre imágenes hiperespectrales en distintas áreas de conocimiento. Fuente: Scopus (28/01/2021)

Dentro de todos los resultados obtenidos para las imágenes hiperespectrales en química, las palabras clave más repetidas son espectroscopía (utilizada en casi un 72% de los estudios), tratamiento de datos, incluyendo términos como quimiometría, procesamiento de imágenes o análisis espectrales (47%) y análisis remoto (25%).

El empleo de las imágenes hiperespectrales ha sido ampliamente explorado en combinación con distintas técnicas analíticas. Por ejemplo, existen estudios en los cuales se han registrado mediante el uso de espectroscopía de fluorescencia de Rayos X<sup>55</sup> para muestras de sedimentos, espectrometría de masas<sup>56,57</sup> para análisis de antibióticos y muestras biológicas o microscopía electrónica de barrido<sup>58</sup> aplicada al estudio de polímeros y materiales con distintas propiedades conductoras. Sin embargo, el mayor porcentaje de uso y aprovechamiento del

potencial de esta metodología se está realizando a través de la microespectroscopía infrarroja y la espectroscopía Raman.

En primer lugar, en relación a las investigaciones realizadas mediante la adquisición de **microimágenes hiperespectrales de infrarrojo**<sup>59</sup>, pueden encontrarse numerosas aplicaciones de interés químico, siendo las más relevantes el análisis agroalimentario, la investigación clínica y la industria medioambiental y de los materiales, aunque también existen algunos estudios en el ámbito farmacéutico<sup>60</sup> y planetario<sup>61</sup>.

En la Tabla 2 pueden observarse ejemplos representativos de las aplicaciones mencionadas, indicando la muestra analizada y las propiedades químicas o procesos biológicos monitorizados.

- a) En primer lugar y siendo con mucha diferencia el área más ampliamente estudiada, se encuentra el **análisis agroalimentario**, categoría entre la que se incluyen multitud de investigaciones acerca de propiedades químicas de contaminantes<sup>62</sup>, factores de calidad<sup>63</sup>, contenido en nutrientes<sup>64</sup> y mecanismos biológicos de distintos frutos, alimentos o cultivos comunes en nuestra dieta y que aportan información relevante sobre sus características físico-químicas y procesos de maduración<sup>65,66</sup>.
- b) La aplicación de esta forma de análisis en el **campo biomédico y clínico** ha sido especialmente útil a la hora de estudiar propiedades biológicas de distintos tipos de tejidos y biomarcadores celulares<sup>67</sup>, así como para monitorizar cambios bioquímicos a partir de mapas de distribución en materiales celulares, óseos y cerebrales<sup>44,68</sup> con fines médicos como, por ejemplo, el estudio de enfermedades degenerativas<sup>69</sup>.

- c) La espectroscopía infrarroja es una de las técnicas más empleadas en la caracterización de **materiales de naturaleza medioambiental y plásticos**. Se incluyen estudios en los que su combinación con el uso de imágenes hiperespectrales ha logrado la clasificación de diferentes sustancias plásticas<sup>70</sup> y la cuantificación y predecicción del contenido en nutrientes y polisacáridos de distintos materiales orgánicos<sup>71,72</sup>.

También cabe recalcar que, aunque el campo del **patrimonio artístico y la conservación** está aún poco explorado en comparación con las aplicaciones anteriores, recientemente se han llevado a cabo contribuciones relevantes que refuerzan el potencial de esta técnica para el análisis de obras de arte y muestras policromadas<sup>73,74</sup>. A pesar de que existe alguna investigación sobre pigmentos mediante el empleo de imágenes hiperespectrales en la región del infrarrojo medio<sup>75</sup>, la mayoría de los análisis realizados involucran la adquisición de imágenes e información espectral en la región del infrarrojo cercano y el espectro visible. Entre estos últimos, se pueden encontrar estudios de reflectancia en obras de arte<sup>76</sup> y estudios enfocados en la caracterización de ciertos pigmentos<sup>77,78</sup>, aglutinantes<sup>79,80</sup> y, en general, materiales artísticos empleados en la creación de dichas obras<sup>81</sup>.

**Tabla 2.** Principales áreas de investigación mediante el empleo de imágenes hiperespectrales de microespectroscopía infrarroja y ejemplos aplicaciones prácticas

<b>Campo de aplicación</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Propiedad estudiada</b>
Alimentación	Cerezas	Monitorización de cambios en la distribución espacial de Vitamina C durante la maduración <sup>66</sup>
	Pimientos	Medición y predicción de la humedad, capacidad antioxidante y contenido total fenólico <sup>63</sup>
	Semillas de trigo	Detección de la expansión de brotación de semillas durante periodos temporales en las primeras 48h de crecimiento <sup>65</sup>
	Nueces	Discriminación entre 200 unidades de cinco variedades diferentes <sup>82</sup>
Cuantificación del contenido en peróxidos y nutrientes minerales en árboles de nueces comestible <sup>64</sup>		
Aplicaciones clínicas	Biomarcadores celulares	Caracterización del metabolismo celular para diagnóstico y evaluación de la salud celular <sup>67</sup>
	Material óseo	Evaluación del estado diagenético de restos de materiales óseos <sup>68</sup>
	Material cerebral	Estudio de secciones histológicas para el análisis de biomarcadores relacionados con el Alzheimer <sup>69</sup>
	Tejidos biológicos	Obtención de distribuciones espaciales de multitud de contribuciones biológicas en variados tejidos <sup>44</sup>
Materiales	Microplásticos	Diferenciación y clasificación de microplásticos mediante el uso de análisis quimiométricos <sup>70</sup>
	Fibras de madera	Cuantificación del contenido en lignina y hemicelulosa en fibras de origen natural y sintético <sup>71</sup>
	Suelos	Predicción del contenido en nitrógeno y carbono orgánico en suelos mineros <sup>72</sup>

En cuanto al uso de la **microespectroscopía Raman** para el registro de imágenes hiperespectrales, encontramos estudios y áreas de investigación muy diversas que la emplean asiduamente<sup>83</sup>. Aunque existen trabajos en los ámbitos del medio ambiente<sup>84</sup>, análisis forense<sup>85</sup> o desarrollos metodológicos<sup>86</sup>, las tres grandes aplicaciones de esta metodología se concentran en la medicina y farmacología, la geología con el estudio de materiales y el análisis agroalimentario (pesticidas y contaminantes).

Con el fin de ejemplificar los resultados más relevantes de dichas disciplinas, se ha elaborado una Tabla resumen (ver Tabla 3) en la que se incluyen algunos de los trabajos más recientes al respecto, indicando en cada uno de ellos el tipo de muestra analizada y la propiedad analítica estudiada.

- a) En los últimos años, esta metodología se ha revelado como una de las principales formas de análisis en **medicina y bioquímica**; concretamente en el sector farmacéutico<sup>87</sup>, debido a la posibilidad de obtener información tanto cualitativa como cuantitativa en muestras en estado sólido. Entre las aplicaciones más comunes pueden encontrarse la caracterización espectral de pastillas y tabletas de medicamentos<sup>88</sup>, la determinación del tamaño de ciertas partículas o grosor de recubrimientos<sup>89</sup>, estudios de homogeneidad espacial o la identificación de falsificaciones y adulteraciones en determinadas sustancias medicinales o drogas<sup>90,91</sup>.

- b) Aunque la espectroscopía Raman puntual es ampliamente utilizada en el **ámbito geológico**, el acoplamiento con microimágenes hiperespectrales la ha convertido en una técnica imprescindible en el análisis industrial, mineralógico y del terreno, puesto que mediante su uso es posible determinar diferencias cristalográficas y de composición química tanto espectral como espacialmente (estudios en dos y tres dimensiones empleando imágenes químicas)<sup>92,93,94</sup>.
- c) Por último, es una técnica muy aplicada en el **análisis de calidad y autenticación de alimentos**, así como detección de contaminantes y estudios relativos a aditivos utilizados durante la elaboración de los mismos<sup>95,96</sup>. En este sentido, se está comenzando a automatizar el uso de la adquisición en modo barrido lineal<sup>97</sup>, pues es el que proporciona mayores ventajas a la hora de estudiar la superficie de los productos agrícolas o alimentarios.

**Tabla 3.** Principales áreas de investigación mediante el empleo de imágenes hiperespectrales de microespectroscopía Raman y ejemplos de aplicaciones prácticas

<b>Campo de aplicación</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Propiedad estudiada</b>
Estudios en medicina	Tejidos celulares	Comparativa de distribución de componentes celulares en nanofibras de tejidos en crecimiento <sup>98</sup>
	Células cerebrales	Monitorización de beneficios terapéuticos de medicamentos en tumores cerebrales <sup>99</sup>
	Tabletas farmacéuticas	Mapeos sucesivos para controlar el grosor y propiedades de sus recubrimientos <sup>89</sup>
	Dientes	Caracterización de componentes biogénicos que forman el esmalte en dientes humanos <sup>100</sup>
Industria y materiales	Estructuras de silicio	Caracterización en forma de películas delgadas y dopadas con distintos iones <sup>94</sup>
	Ternesitas	Estudio de la formación y propiedades de la descomposición a altas temperaturas <sup>101</sup>
	Nanotubos	Localización química de nanotubos dopados con perileno en muestras diluidas <sup>93</sup>
	Vidrios aluminosilicatados	Análisis estructural y cristalino de muestras de vidrio <sup>92</sup>
Aditivos y contaminantes	Peróxidos de benzoilo (BPO)	Análisis secuencial para optimizar parámetros espectrales <sup>96</sup>
		Detección en harinas y estudios de penetración en mezclas con distinta concentración de BPO <sup>102</sup>
	Sandías	Diferenciación entre semillas sanas y contaminadas con agentes bacterianos <sup>95</sup>
	Guisantes y pistachos	Detección de adulterantes en amplio rango de concentraciones <sup>103</sup>

En cuanto a la mayoría de investigaciones realizadas en el **ámbito cultural** usando la microespectroscopía Raman<sup>104,105</sup>, es importante resaltar que ésta interviene o bien jugando un papel principal a través de la adquisición de medidas puntuales<sup>106,107,108,109</sup>, o bien de forma complementaria a otras imágenes hiperespectrales, obtenidas mediante espectroscopía de fluorescencia de Rayos X<sup>110,111</sup> o medidas de reflectancia<sup>76,112</sup>.

A pesar de que las microimágenes hiperespectrales Raman pueden suponer un gran avance en cuanto a caracterización de obras de arte, la determinación de distribuciones espaciales de pigmentos y compuestos relevantes presentes en dichos materiales, esta metodología no ha sido aún muy explorada, existiendo actualmente pocos estudios al respecto, entre los que destaca el realizado en 2008<sup>113</sup> sobre la pintura del siglo XVI “Retrato de una Joven”.

En relación con la adquisición de **imágenes hiperespectrales en modo remoto o de camino abierto** cabe destacar que, aunque ha sido recientemente combinada con la espectroscopía de infrarrojo<sup>114,115,116,117</sup> o la espectroscopía inducida por láser (LIBS)<sup>118,119,120,121</sup> para analizar muestras de gran variedad (componentes traza superficiales, objetos explosivos, materiales para aplicaciones forenses o distintos tipos de aceros, rocas o meteoritos), la técnica más utilizada en la actualidad en este sentido es la espectroscopía Raman. Su empleo en todo tipo de ámbitos científicos ha tenido un crecimiento exponencial en los últimos años, cubriendo un gran rango de aplicaciones<sup>122,123</sup>.

Como se ha comentado previamente, el primer uso de esta metodología fue en el análisis terrestre<sup>124</sup>. Las mayores preocupaciones en la época se basaban en la sensibilidad (bajos niveles de señal recogida), el establecimiento de los rangos de distancia y, en la mayoría de los casos, pequeñas concentraciones de la sustancia analizada en la muestra de interés. Sin embargo, con el desarrollo de láseres de

## Introducción

alta potencia, la dificultad de la distancia física entre muestra y espectrómetro fue parcialmente resuelta, puesto que se puede establecer y mantener el haz láser colimado a través de largas trayectorias del mismo. Así, gracias al posterior desarrollo de la investigación y tecnología, se han llegado a estudiar muestra sólidas y líquidas a distancias de entre 6 y 16 metros<sup>125</sup> y minerales y sustancias de naturaleza orgánica e inorgánica<sup>126,127,128,129</sup> a distancias de incluso 200 y 400 metros<sup>130,131</sup>.

Además, las medidas en modo remoto también han sido implementadas en la investigación en términos de seguridad, debido a las ventajas que ofrece una técnica no destructiva y sin contacto físico con la muestra. En este contexto, se han llevado a cabo estudios incluyendo el rastreo y detección de explosivos y sustancias tóxicas variadas<sup>132,133,134,135,136</sup> y el barrido de materiales ocultos en determinados recipientes<sup>137,138,139</sup>. Asimismo, se han registrado análisis celulares<sup>140</sup>, estudios de características de flujo<sup>141</sup> y detección de adulteraciones en productos como el aceite de oliva<sup>142</sup>.

Finalmente, también se está intentando el utilizar esta técnica en el mundo del arte y patrimonio<sup>143</sup> para la prevención de agentes de contaminación o la producción de daños superficiales a las obras estudiadas. Previamente sólo se había conseguido trabajar con instrumentación móvil<sup>144,145</sup> o a pocos centímetros de distancia de la sustancia analizada<sup>146</sup>.

Por último, y en relación al subgrupo de aplicaciones de **tratamiento de datos** obtenidos mediante la adquisición de imágenes hiperespectrales con cualquier técnica analítica, existen infinidad de artículos científicos, libros y revisiones bibliográficas que ofrecen información sobre cómo gestionar y trabajar con ellas de forma eficaz.

En primer lugar, pueden encontrarse numerosos trabajos cuyo objetivo es la implementación de paquetes informáticos o softwares de análisis quimiométrico y la explicación de su funcionamiento básico, así como de las posibilidades de reducción de datos y tratamiento de los mismos<sup>147,148</sup>.

Además, debido a que el empleo de técnicas de análisis quimiométricas resulta imprescindible a la hora de tratar los datos espaciales y espectrales contenidos en estas imágenes<sup>149</sup>, todas las áreas científicas mencionados anteriormente han usado estos métodos en sus estudios. Entre ellos se podría destacar el agroalimentario<sup>150,151</sup>, ciencias de los materiales<sup>152,153</sup>, el sector biológico y bioquímico<sup>154</sup>, análisis farmacéuticos<sup>155,156</sup>, históricos y de patrimonio<sup>157,158</sup> y geológicos<sup>159</sup>.

## **1.5 Espectroscopía vibracional e imágenes hiperespectrales**

En este apartado se aborda con más detalle el fundamento teórico de la espectroscopía vibracional y los principales elementos de configuración instrumental necesarios para su combinación con la adquisición de microimágenes hiperespectrales.

La espectroscopía vibracional consta de un conjunto de técnicas ópticas de análisis cuyo empleo en química está ampliamente extendido, especialmente desde el desarrollo técnico e instrumental de mejores dispositivos y espectrómetros más robustos y fáciles de manejar. A continuación, se detallan las dos técnicas vibracionales utilizadas durante esta tesis: la espectroscopía de infrarrojo y la espectroscopía Raman.

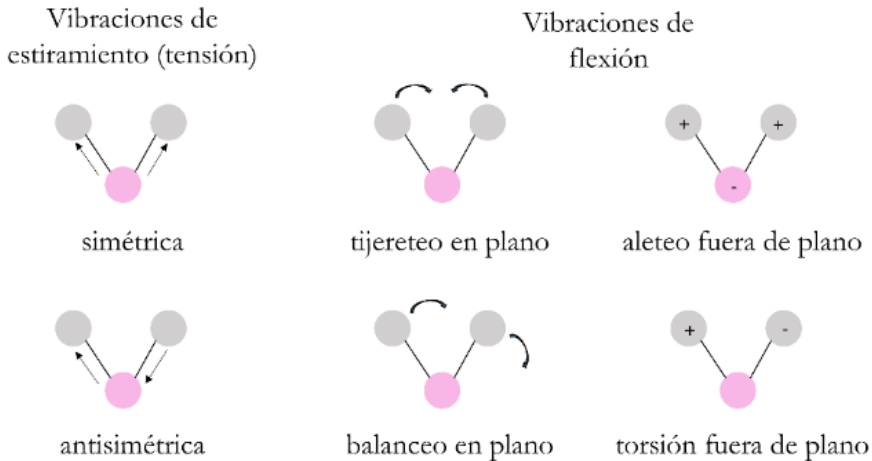
### 1.5.1 Espectroscopía Infrarroja

Esta técnica está basada en la absorción por parte de la muestra de radiaciones electromagnéticas comprendidas en la región infrarroja (entre 10 y 12500  $\text{cm}^{-1}$ ) debido a la interacción de la radiación con los enlaces químicos. Normalmente, la región infrarroja suele dividirse en tres zonas, puesto que las diferencias energéticas entre ellas son relevantes y no involucran las mismas transiciones. Mientras que en el infrarrojo cercano (NIR, entre 12500 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) aparecen las transiciones de vibración de sobretonos y bandas de combinación, en el infrarrojo medio (MIR, entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ ) lo hacen las vibraciones y rotaciones fundamentales y, por último, en el infrarrojo lejano (FIR, entre 400 y 10  $\text{cm}^{-1}$ ) pueden contemplarse las vibraciones como consecuencia de la rotación pura de las moléculas.

Para que la radiación sea absorbida por una molécula, su energía debe coincidir con la frecuencia de vibración de algún enlace de la molécula en cuestión. Además, dicha vibración debe producir un cambio en el momento dipolar de la molécula como consecuencia de la interacción producida con la radiación incidente (lo que constituye la regla de selección básica para que una molécula sea activa en la región de infrarrojo).

Por lo tanto, la interacción de la radiación infrarroja con la materia puede entenderse en términos de modificación de los dipolos moleculares asociados con vibraciones y rotaciones. Así, las vibraciones producidas pueden implicar o bien un cambio en la longitud de la distancia entre átomos a lo largo del eje del enlace (modos de estiramiento o tensión) o bien en el ángulo entre enlaces (modos de flexión) como aparece indicado la Figura 7. A su vez, los modos de tensión pueden aparecer en los enlaces de forma simétrica o antisimétrica (estando coordinados en fase o no) y los modos de flexión pueden ocurrir en

el mismo plano de la molécula o fuera de él, existiendo variedades como el tijereteo, balanceo, aleteo o torsión.



**Figura 7.** Esquema de las vibraciones moleculares fundamentales. Adaptado de (Stuar, 2004)<sup>160</sup>

Puesto que las moléculas simétricas no conducen a un cambio en el momento dipolar tan fácilmente como lo hacen las asimétricas, esto lleva a la conclusión de que las primeras tendrán menos vibraciones activas en la región infrarroja (por lo que dichas vibraciones serán más débiles que las antisimétricas). Por tanto, las vibraciones de enlaces tipo C=C o N-N producirán bandas débiles en el espectro infrarrojo, mientras que las vibraciones de enlaces formados por elementos con polaridad muy distante se asocian con bandas muy intensas. En conjunto, la simplicidad o complejidad de un espectro infrarrojo vendrá dada por el acoplamiento entre las distintas vibraciones que tienen lugar en gran parte o la totalidad de la molécula involucrada. Esto se denomina el “esqueleto vibracional” de la molécula y suele producir un patrón o huella dactilar espectral del conjunto de la misma.

El primer acoplamiento de la microscopía con un espectrómetro de infrarrojo se detalló a mitad del siglo XX, con la intención de usarlo en el estudio y análisis de áreas de muestra minúsculas. Sin embargo, los espectros obtenidos carecían de la calidad suficiente para su correcta interpretación y la resolución espacial era baja. Los avances tecnológicos relativos a instrumentación que se han producido en las dos últimas décadas<sup>26</sup>, han permitido nuevos desarrollos en los sistemas ópticos, así como en fuentes de radiación infrarroja más potentes y avances en el sector de los detectores. Todo esto ha permitido el uso masivo y la expansión de la microespectroscopía infrarroja para el estudio de sistemas complejos<sup>161,162</sup>.

### 1.5.2 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman se basa en el efecto descrito por Chandrasekhara Venkata Raman en 1928, que observó que cuando una radiación monocromática interacciona con una molécula, la radiación es dispersada de forma elástica, en mayor medida, e inelásticamente (en una proporción mucho menor). Mientras que la primera presenta la misma frecuencia que la radiación incidente (radiación Rayleigh), la radiación dispersada inelásticamente posee frecuencias tanto mayores (*anti-Stokes*) como menores (*Stokes*) a las de la radiación de excitación. Este cambio en la frecuencia de la radiación dispersada está relacionado con transiciones vibracionales y, por tanto, proporciona información relevante acerca de la estructura molecular de las sustancias implicadas.

Es una técnica que aporta datos inequívocos acerca de la identificación molecular de los materiales y ofrece numerosas ventajas, entre las que pueden destacarse su naturaleza no destructiva ni invasiva, la escasa preparación de muestra necesaria y la posibilidad que ofrece de trabajar con sustancias de

tamaño pequeño o muy reducido y en estado sólido, líquido y gaseoso. Además, en la mayoría de los casos, implica tiempos de análisis cortos y medidas fácilmente reproducibles<sup>163</sup>. Sin embargo, la mayor desventaja de la espectroscopía Raman está relacionada con el fenómeno de la fluorescencia, el cual tiene lugar cuando una molécula absorbe parte de la radiación incidente para situarse en un estado electrónico excitado<sup>164</sup>. Posteriormente, decae hasta niveles vibracionales de menor energía a través de transiciones no radiativas y, finalmente, se relaja hasta el estado electrónico fundamental emitiendo radiación. Aunque este fenómeno puede, en parte, contrarrestarse mediante el empleo de una fuente de radiación láser de menor energía (es decir, mayor longitud de onda) para evitar la transición descrita hasta el estado electrónico excitado, también implica una menor cantidad de moléculas que experimentarán la dispersión Raman (disminuyendo de igual forma la sensibilidad y efectividad de la medida).

En la espectroscopía Raman se emplea una radiación monocromática de alta intensidad (láser), un dispositivo dispersivo para seleccionar la longitud de onda deseada y descartar la radiación Rayleigh, una serie de espejos y lentes que direccionan la radiación, y por último, el detector.

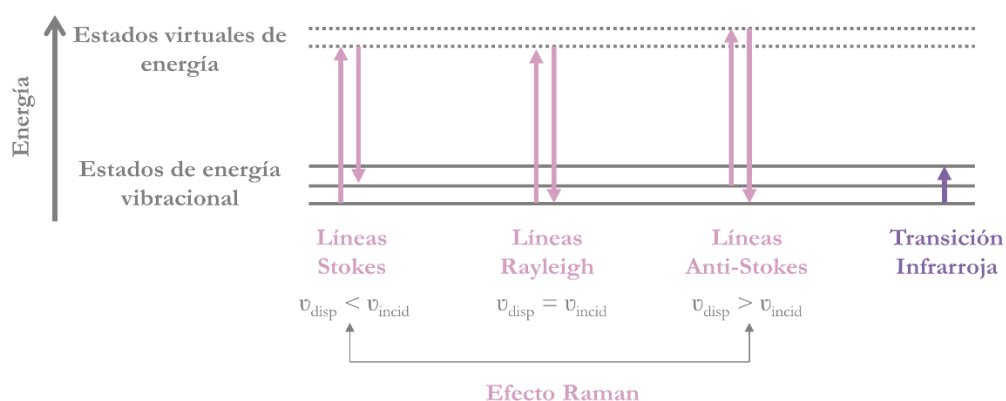
Desde que en 1966 se introdujera el concepto de que la radiación dispersada era independiente del volumen de muestra analizada, el uso de la microespectroscopía Raman creció rápidamente y fue implementada en multitud de campos científicos para el análisis no invasivo y sin apenas preparación previa de micromuestras<sup>83</sup>. Para emplear esta técnica hay que implementar un microscopio, en el cual la radiación de la fuente láser se enfoca en una pequeña hendidura para constituir una fuente de dispersión limitada y, seguidamente, se dirige sobre las lentes. Una vez la radiación Rayleigh ha sido

## Introducción

bloqueada, la dispersión Raman continúa hasta el detector, dónde se mide la intensidad recibida para cada longitud de onda.

La microespectroscopía Raman permite la obtención de un mejor enfoque de la zona deseada de muestra, característica que beneficia a la hora de realizar medidas de mapeos en los que se quiera obtener información molecular y detallada de las heterogeneidades de la misma. De esta forma, se facilita la diferenciación precisa entre tejidos, irregularidades o zonas específicas que existan en la muestra, haciendo posible los estudios de comparación entre las mismas.

A modo de resumen, las espectroscopías Raman e infrarroja son técnicas vibracionales que permiten la obtención de información molecular y de enlace de manera no invasiva, y son comúnmente consideradas como técnicas de análisis complementarias<sup>165</sup>. Esto es debido a que la diferencia de energía involucrada en las transiciones Raman es del mismo orden que la de las transiciones vibracionales que tienen lugar en la región del infrarrojo<sup>11</sup> (ver Figura 8).



**Figura 8.** Transiciones producidas entre los estados energéticos en el efecto Raman y de absorción vibracional infrarroja. Adaptado de (Mitsutake, 2019)<sup>85</sup>

### 1.5.3 Configuración para la adquisición de imágenes hiperespectrales en infrarrojo y Raman

En el caso de las imágenes hiperespectrales, la buena selección de los instrumentos, el diseño de su configuración y su correcta calibración son esenciales para obtener un buen resultado analítico. Este apartado se ha dividido en dos categorías para especificar la instrumentación necesaria en las medidas de espectroscopía infrarroja y Raman.

- **Instrumentación para el registro de imagen en infrarrojo**

Aunque la microespectroscopía infrarroja se ha usado para innumerables aplicaciones científicas durante los últimos años, los avances en tecnología (especialmente en los detectores de matriz) han hecho que el empleo de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) gane importancia en el campo de imagen.

En estos equipos, el detector suele contar siempre con la mayor relevancia, pero tanto la fuente de radiación como el interferómetro, objetivos y sistema de visionado son, de igual manera, elementos fundamentales a tener en cuenta.

- La **fuente de radiación** suele consistir en las fuentes estándar para análisis en la región infrarroja media o cercana del espectro electromagnético. Para ello, se emplea un carburo de silicio térmicamente controlado por resistencias, o bien un elemento cerámico funcionando en el rango 1100-1400 K. Para las longitudes más cortas del infrarrojo cercano se requiere de una temperatura más alta, usando para ello una lámpara de halógeno de tungsteno. Normalmente, la combinación entre el tamaño de esta fuente y el sistema óptico del interferómetro, es

diseñada a conciencia para producir una imagen homogénea de un cierto diámetro normalizado en su posición normal. Es necesario recalcar la creciente utilización de fuentes de infrarrojo sincrotrón, las cuales son entre 100 y 1000 veces más brillantes (mayor densidad de flujo) que las fuentes térmicas convencionales (a través de un orificio *pinhole* de máximo 10 o 20  $\mu\text{m}$ ). Esto es debido a que el tamaño efectivo de la fuente es más pequeño y el rango de ángulos en el que se emite la radiación es mucho más estrecho. De esta forma, es posible analizar zonas de muestra menores con una relación señal-ruido bastante aceptable, mejorando las especificaciones en cuanto a resolución espacial y calidad espectral<sup>166</sup>.

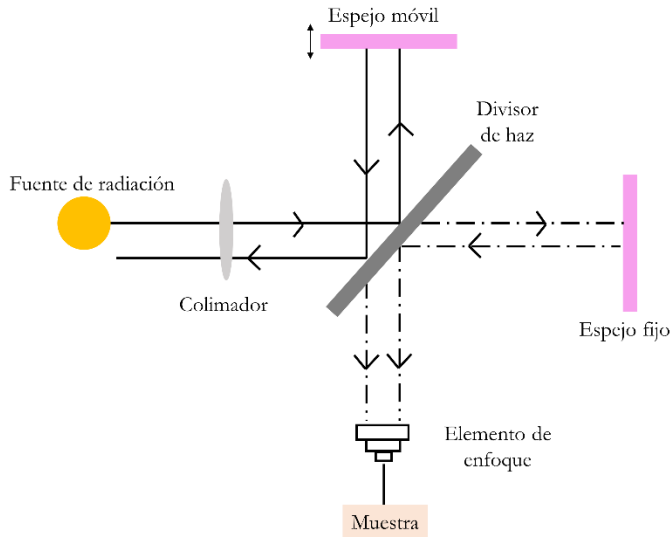
En este sentido es importante recalcar que la resolución espacial del sistema está altamente limitada por la longitud de onda de la radiación empleada y por la apertura numérica de los objetivos ( $N.A.$ )<sup>167,168</sup>, magnitud relacionada con la capacidad del sistema óptico para aceptar la luz en un determinado rango de ángulos (Ecuación 1).

$$\text{Ecuación 1} \quad N.A. = n \text{ sen}(\theta)$$

Siendo  $n$  el índice de refracción del medio en el que se encuentra el objetivo y  $\theta$  la mitad del ángulo de aceptación máximo que puede entrar o salir del mismo.

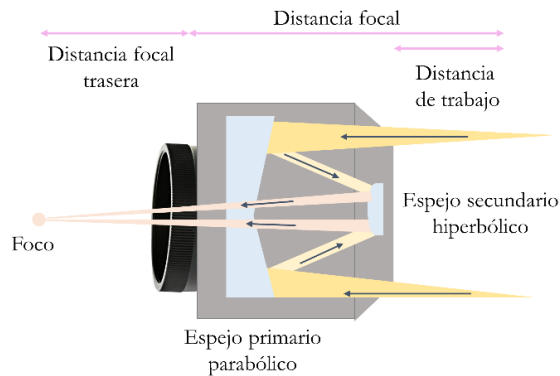
- Los **espectrofotómetros** por Transformada de Fourier están basados en el esquema del interferómetro de Michelson<sup>169</sup> (ver Figura 9). En él, la radiación incidente es inicialmente colimada para desembocar en un divisor de haz, donde el camino óptico es dividido en dos direcciones. En una de ellas la radiación es reflejada mediante el empleo de un espejo

fijo, mientras que en la otra se coloca un espejo móvil, que se desplaza paralelamente al divisor de haz. De esta forma, se consigue que los dos haces vuelvan al divisor de haz con una diferencia de fase. Posteriormente, son recombinados para que la parte utilizable de la radiación llegue hasta la muestra y, posteriormente, al detector (la otra sección vuelve en la dirección de la fuente de radiación). La diferencia de fase entre los dos haces podrá ser detectada como una señal, la cual contiene información espectral de la muestra. Dicha señal necesitará ser decodificada mediante un transformador de Fourier para, así, transformar el interferograma resultante en un espectro convencional. Por lo tanto, uno de los aspectos más importantes de este diseño es el mantenimiento de la correcta alineación de los espejos y la distancia entre ellos.



**Figura 9.** Esquema básico de un espectrofotómetro por Transformada de Fourier con Interferómetro de Michelson. Adaptado de (Ríos, 2012)<sup>163</sup>

- En cuanto a los **sistemas de enfoque**, es muy común encontrar los objetivos Cassegrain (ver Figura 10), que constan de un espejo primario cóncavo y parabólico y un espejo secundario convexo e hiperbólico. Su característica principal radica en que la trayectoria óptica se pliega sobre sí misma, confluyendo en un diseño específico en el que el punto focal queda detrás del espejo primario. Además, este tipo de objetivos cuentan con tres particularidades especialmente relevantes: su apertura numérica, su magnificación y la distancia de trabajo.



**Figura 10.** Esquema de un objetivo tipo Cassegrain

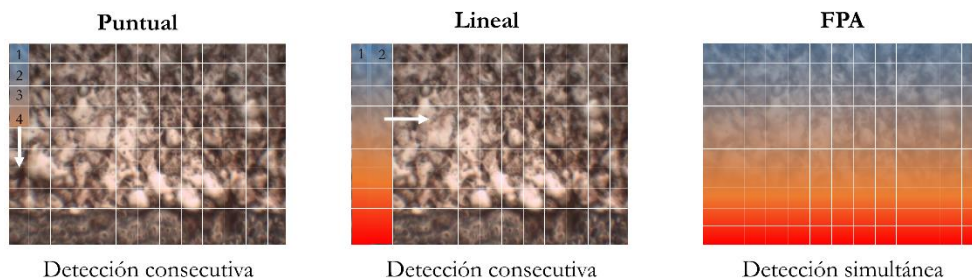
El balanceado equilibrio entre ellas es lo que destaca en un buen sistema óptico. La apertura numérica es, como se ha comentado anteriormente, una variable importante en los sistemas de imagen (confluyendo en que a mayor apertura numérica mayor poder de colección de luz por parte del objetivo). Una adecuada posición de los elementos ópticos que componen el objetivo es también vital para evitar errores cuando se trabaja con magnificaciones mayores.

- Para facilitar el **posicionamiento de la muestra** previo a la medida experimental, es importante visualizar y recolocar adecuadamente la zona deseada mediante un microscopio óptico. Actualmente, esto se realiza empleando cámaras digitales, las cuales proporcionan una buena calidad de imagen en vivo y cada vez se mejoran más en cuanto a facilidad de uso y productividad. Además, el software de imagen asociado permite la superposición gráfica y la interacción con la imagen en vivo usando las aplicaciones disponibles, lo cual es beneficioso y reduce el tiempo de consumo al poder seleccionar las zonas más aptas para el registro. Cuando el área deseada es demasiado grande para ser proyectada directamente en el detector con la resolución espacial dada, existe la posibilidad de emplear la plataforma de mapeo para formar un mosaico de la muestra compuesto por un conjunto de imágenes escalonadas.

- En el campo de los **detectores**, los de tipo matriz han supuesto una revolución en el estudio de microespectroscopía infrarroja de imagen, puesto que cuentan con más rapidez de generación de imágenes y un mayor ajuste espacial que los sistemas de detector único. Aunque el acoplamiento de este tipo de detectores a un espectrómetro por Transformada de Fourier se realizó por primera vez en la década de 1970<sup>170</sup>, numerosos progresos y avances tecnológicos han permitido la creación de nuevos y mejorados dispositivos que actualmente se utilizan en muchos laboratorios analíticos.

Suelen clasificarse como detectores de primera, segunda o tercera generación en función de si se refieren a detectores que realizan barridos puntuales, barridos lineales en dos dimensiones (como los de telururo de mercurio y cadmio, MCT), o barridos “inteligentes” que incluyen uno o

varios detectores en formato multicolor para cada píxel (ver Figura 11). Sobre éstos últimos, debe hacerse mención especial a los detectores en conjunto de plano focal (“*focal plane array*”, *FPA*). Están formados por un conjunto rectangular o cuadrado de detectores individuales de tipo MCT o fabricados de antimoniouro de indio (InSb) y un circuito de lectura integrado basado en silicio. De esta forma, su uso permite la adquisición de un elevadísimo número de espectros, puesto que se recoge la señal producida en cada píxel de forma simultánea. Además, la resolución espacial conseguida es inigualable a los detectores puntuales o de línea y permiten el análisis de áreas de muestra muy grandes, gracias a la combinación de las imágenes FPA registradas y su alto grado de automatización. Por lo tanto, los datos espectrales son registrados en una perfecta alineación con la imagen visual, lo que origina imágenes químicas mucho más definidas que con otro tipo de detectores y en el menor tiempo posible.



**Figura 11.** Gráfico de la metodología de adquisición de los detectores más empleados en espectroscopía FTIR de imagen: puntuales, lineales o FPA

Por último, cabe comentar los modos más habituales de medida cuando se adquieren imágenes hiperespectrales de espectroscopía infrarroja: transmisión y reflexión.

En las medidas de transmisión, la radiación incidente debe atravesar la muestra, e interactuar con ella, de modo que se puede cuantificar la radiación absorbida por la misma si se tiene en cuenta la relación entre la radiación inicial y la transmitida (no absorbida) según la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 2)

$$\text{Ecuación 2} \quad A = \mathcal{E} C l$$

Siendo  $A$  la absorbancia,  $\mathcal{E}$  el coeficiente de absorción de la sustancia,  $C$  su concentración y  $l$  el camino óptico o anchura de la cubeta de medida

En los métodos de imagen, se debe tener en cuenta una cuestión importante cuando se trabaja en modo transmisión: la variación en el enfoque. Éste puede verse afectado si la muestra se coloca en una ventana de transmisión o una celda de compresión debido a efectos de refracción, lo cual puede confluir en pequeñas variaciones en la detección de la señal. Por lo tanto, normalmente se necesitan ajustes o bien en la longitud focal o bien en la óptica del sistema.

Sin embargo, en los modos de reflexión, se mide la capacidad de la muestra para reflejar la radiación incidente tras su interacción con ella. Esta propiedad depende tanto de las características superficiales del material, como del tipo de sustancia y de la temperatura. Normalmente, esta metodología suele emplearse cuando la muestra exhibe alguna dificultad para ser examinada mediante la técnica tradicional de transmisión.

En los sistemas de imagen, las medidas de reflexión pueden realizarse fácilmente con la misma configuración con la que se adquieren las medidas en transmisión, pero, en cambio, la muestra debe iluminarse con el objetivo superior y se emplea un divisor de haz que dirija el 50% de la radiación entrante hacia el objetivo y el otro 50% hacia el detector (limitando, de esta forma, la eficiencia de la medida).

Además, en relación a los espectros adquiridos mediante reflexión, deben tenerse en cuenta la aparición de algunas distorsiones (efecto *Reststrahlen*) con respecto a la medida en transmisión. Si la superficie de la muestra no es completamente plana, toda la radiación reflejada (difusa y especular) se recoge en proporciones desconocidas, por lo que la interpretación mediante cálculos matemáticos queda impedida, desembocando en una dificultad añadida para la interpretación de los datos registrados.

En cuanto a la técnica de reflexión total atenuada (ATR), su empleo en los análisis de imagen macroscópicos ha crecido exponencialmente en los últimos años. Aunque es posible desarrollar estos estudios mediante la metodología tradicional de adquisición puntual y reposicionamiento de la muestra tras cada registro de píxel individual, esto conllevaría mucho tiempo y el riesgo de provocar contaminaciones y deformaciones en la muestra. Por lo tanto, actualmente existen varios dispositivos únicamente empleados para generar la imagen ATR empleando detectores de matriz (o de tipo FPA).

- **Instrumentación para el registro de imagen Raman**

En este caso, los avances en tecnología han sido paralelos a los producidos para la instrumentación requerida en espectroscopía Raman convencional. A modo de ejemplo, se ha podido beneficiar de los progresos en prácticamente todos los elementos del sistema espectrográfico como: tecnología láser para proveer de fuentes de radiación más direccionales y energéticas, filtros con aplicaciones mejoradas para eliminar la radiación Rayleigh y aislar las longitudes de ondas deseadas, en detectores con cámaras CCD (dispositivo de carga acoplada) con sensibilidad aumentada y en ordenadores con capacidad de almacenamiento de datos suficiente como para poder manejar y procesar la cantidad de información generada en este tipo de análisis<sup>171</sup>.

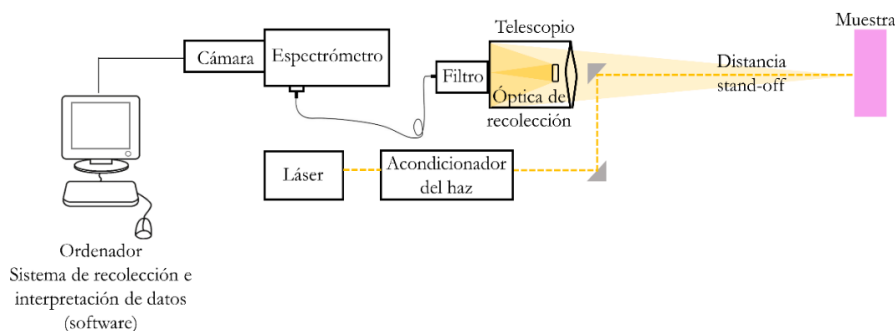
En este sentido, los microscopios, macroscopios y telescopios han demostrado ser dispositivos espectroscópicos adecuados para su uso en espectroscopía Raman de imagen:

- Los **microscopios** son, actualmente, los más empleados con este fin, puesto que proporcionan imágenes con una elevada resolución espacial, lo cual es una ventaja a la hora de realizar análisis de composición o estructurales de materiales a escala micrométrica. La radiación láser se utiliza a través de diseños de haz o de fibras ópticas y la mayoría de estos dispositivos utilizan objetivos para dirigirla hasta la muestra, aprovechando la misma óptica para recoger la radiación dispersada tras la interacción a  $180^\circ$ . A continuación, la radiación Rayleigh es descartada y las longitudes de onda deseadas son filtradas hasta llegar a la etapa de la detección, que puede estar formada por diferentes tipos de detectores en función del tipo de escaneo de imagen empleado en la adquisición.

- Hasta hace poco, los **macroscopios** eran poco útiles en este sentido, pero desde que se ha requerido el uso de imágenes a escala de centímetros, o incluso metros, su uso se ha expandido. Algunos de los sistemas disponibles en la actualidad proporcionan medidas hiperespectrales Raman de absorción/reflectancia y señales de fluorescencia/luminiscencia.

- Por último, los **telescopios** han demostrado su gran versatilidad y potencial en las medidas a distancia (*stand-off*), en las que existe una distancia física (en algunas ocasiones de hasta 500 m) entre el operador y la muestra a analizar. Cuando se emplea esta metodología, suele utilizarse excitación láser pulsada y de longitud de onda de excitación corta (como por ejemplo 532 nm), ya que esta elección influencia en gran medida la sección transversal de dispersión Raman, mediante una relación inversamente

proporcional. Además, añaden sistemas de detección cerrada que posibilitan la detección de señales Raman poco intensas en presencia de un elevado fondo ambiental y fluorescencia. En la Figura 12 se observan los elementos clave para la detección remota utilizando un telescopio.



**Figura 12.** Elementos básicos del montaje experimental para la adquisición de imágenes hiperespectrales Raman de camino abierto. Adaptado de (Gasser, 2019)<sup>172</sup>

Aunque en las últimas décadas se ha avanzado mucho en el diseño de dispositivos Raman de imagen y han aparecido en el mercado muchos modelos novedosos, normalmente se pueden definir dos tipos de configuraciones para estos análisis: las basadas en los métodos de escaneo espacial (*scanning*) y las basadas en los métodos de escaneo espectral o de campo amplio (*wide-field*)<sup>171</sup>.

a) Las configuraciones **de escaneo espacial** son las más empleadas para los análisis de adquisición de imágenes hiperespectrales mediante espectroscopía Raman. En ellas, los “mapeos” son realizados mediante la exposición de la muestra a la fuente de radiación y, consecuentemente, el registro de un espectro Raman en cada píxel de la zona de interés a través de un espectrómetro o interferómetro.

Si el escaneo se lleva a cabo mediante el método punto a punto, cada uno de los espectros es adquirido empleando un espectrómetro dispersivo equipado con un detector de matriz o con un interferómetro. En estas configuraciones, lo usual es operar en configuración confocal, en la cual la fuente de iluminación es especialmente enfocada en un área de muestra determinada y un plano concreto, disminuyendo así la contribución y fluorescencia que pudiera generar el entorno y posibilitando las mediciones en distintos niveles del eje Z (volumen de la muestra)<sup>173</sup>. Sin embargo, un elevado porcentaje de los fotones Raman dispersados se pierde, disminuyendo así la señal y complicando el proceso experimental. Esto, unido al hecho de que el método de escaneo puntual consume mayor tiempo de medida que otros métodos (una duración proporcional al número de píxeles analizados), termina confluyendo en tiempos de exposición relativamente largos. Antiguamente, era importante, por estas razones, el encontrar un equilibrio entre número de píxeles y tiempo de análisis total (lo cual limitaba su utilidad como método rutinario de análisis de imagen) pero, en la actualidad, existen dispositivos instrumentales que han conseguido reducir estos inconvenientes.

Por otro lado, si el escaneo se realiza mediante el método lineal, se requiere de un haz láser elongado en una dimensión para formar una línea, acompañado de componentes ópticos cilíndricos o espejos móviles. En este caso, dicha línea láser se orienta de forma paralela a la rendija de entrada del espectrómetro dispersivo, el cual está equipado con un detector de matriz con cámara CCD bidimensional. De esta forma, cada espectro es registrado por una línea del detector, lo que se corresponde con una determinada posición espacial de la línea láser. En estas configuraciones, el movimiento de la muestra sólo se realiza en la dirección perpendicular a la línea del haz de radiación.

b) En el caso de las configuraciones de imagen Raman basadas en los métodos **de escaneo espectral**, la globalidad de la zona de muestra deseada es iluminada por el láser y se analiza de forma simultánea. Por lo tanto y, al contrario que los métodos anteriores, el tiempo de medida total es proporcional al número de variables espectrales involucradas en el análisis, pues en cada señal se recogen las dos dimensiones espaciales (x, y) del campo de visión de muestra completo.

En este campo también ha habido innumerables avances tecnológicos, destacando los dispositivos de matriz de fibra óptica y los filtros de tipo dieléctrico, acústico y de cristal líquido.

- Mediante el empleo de los **dispositivos de matriz de fibra** puede conseguirse que toda la información espacial y espectral contenida en la muestra se registre simultáneamente. Para ello, se dirige la radiación Raman dispersada de todo el campo de visión hacia el extremo de una matriz de fibras ópticas en dos dimensiones. Seguidamente, se introduce el otro extremo en una matriz lineal y se inserta en paralelo en la rendija de entrada de un espectrómetro dispersivo equipado con un detector de imagen CCD. Los datos de las dos dimensiones espaciales se reducen a una única dimensión, lo que debe ser posteriormente descifrado por el software del sistema para reconstruir los datos hiperespectrales.

- El uso de los **filtros dieléctricos** fue descrito por primera vez en 1991<sup>174</sup>, cuando Batchelder y sus colaboradores colocaron filtros rotatorios de interferencia dieléctrica en la trayectoria corregida de un microscopio Raman. Las imágenes eran generadas mediante la captura de todo el campo de visión a través del filtro dieléctrico con un detector de imagen tipo CCD. El centro de banda de estos filtros cuenta con una razonable y estrecha banda de paso, que puede ser ajustada mediante la rotación de los mismos.

- Los **filtros acústicos ajustables** (*AOTFs*), también fueron empleados como espectrómetros de imagen en la década de los 1990<sup>175</sup>. Son filtros en estado sólido que no contienen partes móviles y que funcionan en base a la interacción de la radiación con una onda acústica que viaja en un medio cristalino anisotrópico.

- Los espectrómetros actuales que trabajan mediante **filtros ajustables de cristal líquido** (*LCTFs*) son considerados los más eficientes, rápidos y con mejores resultados a nivel de resolución espacial y espectral a la hora de registrar imágenes hiperespectrales. Son filtros ópticos sin partes móviles que emplean elementos de cristal líquido para permitir el paso de una determinada longitud de onda y excluir las demás.

Como suele suceder con cualquier tipo de tecnología, los componentes de los sistemas de adquisición de imágenes hiperespectrales se encuentran en un estado de continuo avance, mejorándose a la vez que se desarrollan nuevas técnicas de imagen y nuevos elementos instrumentales. Es por ello que es esperable que muchos de los componentes descritos progresen o puedan sufrir modificaciones en un futuro no muy lejano.

También es importante recalcar que, antes de proceder a la adquisición de una medida que involucre imágenes hiperespectrales, debe realizarse una correcta calibración instrumental, incluyendo factores espaciales y espectrales. El objetivo de la calibración espacial es poder determinar el rango y resolución de la información contenida en el hipercubo, siendo para ello útil el ajuste de las coordenadas espaciales  $x$  e  $y$ , del campo de visión y del límite de detección espacial. Pueden usarse distintos métodos en función de la tipología de escaneo que se vaya a emplear. En relación con la calibración espectral, su principal fin es la correcta definición de las variables (longitudes de onda) a lo largo del rango

espectral en el hipercubo. Para ello suelen utilizarse lámparas de calibración espectral (como las que usan argón, neón o xenón, entre otros) y que se encuentran fácilmente accesibles en el comercio.

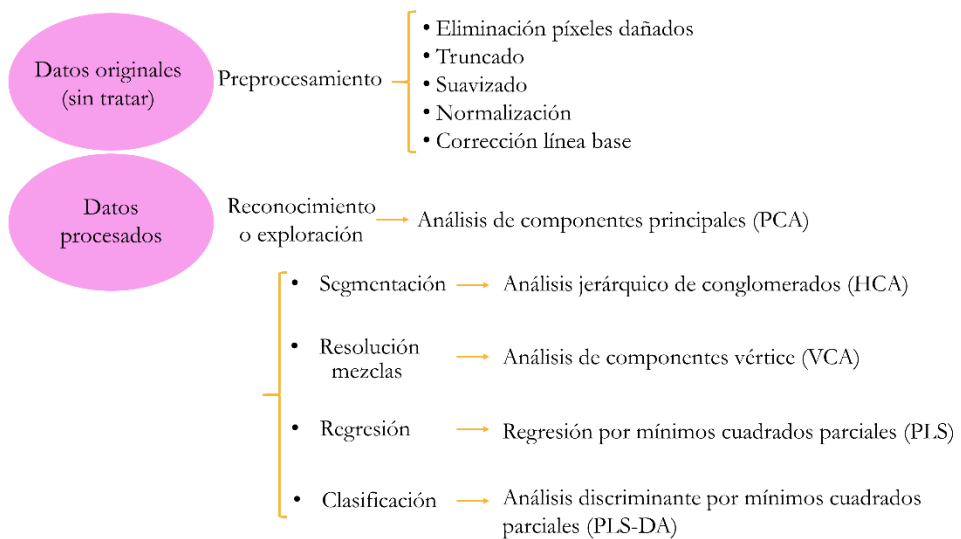
### **1.6 Tratamiento de datos y quimiometría**

Tal y como se ha comentado con anterioridad, el registro de imágenes hiperespectrales implica numerosas ventajas en cuanto a la información obtenida, pero también supone un volumen de datos mucho mayor en comparación con las medidas puntuales. Usualmente, en la adquisición de espectros Raman o de infrarrojo, el número de variables supera el millar. Si se multiplican estas variables por el total de píxeles contenidos en el área escogida de muestra, el resultado puede ser abrumador.

Es por ello que, el empleo de herramientas quimiométricas de reducción de variables para poder condensar al máximo la información relevante, extraer los datos más útiles y representar la distribución de los mismos, es esencial al utilizar esta metodología. De acuerdo con la “*International Chemometric Society*”, la quimiometría puede entenderse como la rama científica en la que se asocian las medidas llevadas a cabo en un sistema químico con el estado del mismo, a través de herramientas o metodologías tanto estadísticas como matemáticas<sup>176,177</sup>.

Todo método de quimiometría pretende hallar los patrones de coincidencia entre las muestras, lo cual conlleva una mejor comprensión de la información analítica y el agrupamiento en base a características (espectrales) comunes. Este objetivo aplicado al registro de imágenes hiperespectrales se traduce en proporcionar una imagen final en la que se ofrezca información en términos de concentración, distribución o intensidad para uno o varios componentes específicos. Por tanto, el primer problema que se presenta es discernir entre

todos los métodos disponibles y encontrar el más adecuado en cada caso. Normalmente, los propósitos con los que se usan estos métodos son de, inicialmente, procesamiento de datos para seguidamente emplear técnicas de reconocimiento o exploración de tendencias<sup>149</sup>. En la Figura 13 se muestra un esquema resumen incluyendo las técnicas y recursos más empleados.



**Figura 13.** Clasificación de las técnicas quimiométricas de análisis más usadas en el tratamiento de imágenes hiperespectrales. Adaptado de (Amigo, 2013)<sup>149</sup>

La etapa de preprocesado es esencial en estos tipos de análisis, pues proporciona datos adecuados y óptimos para ser posteriormente modelados mediante cualquiera de las metodologías previamente mencionadas. Este paso se realiza tanto para los espectros como para las imágenes. Las técnicas de procesamiento espectral consisten en una variedad de tratamientos de tipo matemático con los que se persigue eliminar la información indeseada o reducir el ruido de los datos, haciéndolos más accesibles para los siguientes modelados<sup>178</sup>. Así, algunas de las técnicas más comunes de preprocesado incluyen la eliminación de rayos

cósmicos o píxeles dañados, el truncado en secciones espectrales, el suavizado, la normalización, escalado o centrado de datos y correcciones en la línea base.

La necesidad de procesado o calibración de las imágenes surge del hecho de que los sistemas hiperespectrales están formados por una gran cantidad de componentes ópticos y electrónicos. Normalmente se requieren simples correcciones de defectos sistemáticos antes de realizar el análisis, aunque también se han detectado casos de errores aleatorios en el proceso experimental de adquisición de la imagen<sup>179</sup>.

A continuación, se describen brevemente las herramientas quimiométricas utilizadas en esta tesis. Para la exploración de datos, se ha empleado el análisis de componentes principales, uno de los métodos más usados con dicho propósito en la mayoría de disciplinas científicas.

- **PCA: Análisis de componentes principales**

Su objetivo es obtener una representación reducida de los numerosos datos experimentales manteniendo, en la medida de lo posible, la variabilidad existente entre ellos<sup>180,181</sup>. Para tal fin, se crean unas nuevas variables, denominadas componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales y que están formadas por puntuaciones (“*scores*”) y cargas (“*loadings*”).

Matemáticamente, se basa en la descomposición de valores propios. Para una matriz  $X$  de datos dada, con un número  $i$  de columnas (variables) y un número  $j$  de filas (muestras), el modelo quimiométrico descompone dicha matriz como el producto de los vectores  $S_i$  (*scores*) y  $L_i$  (*loadings*) como se muestra en la Ecuación 3.

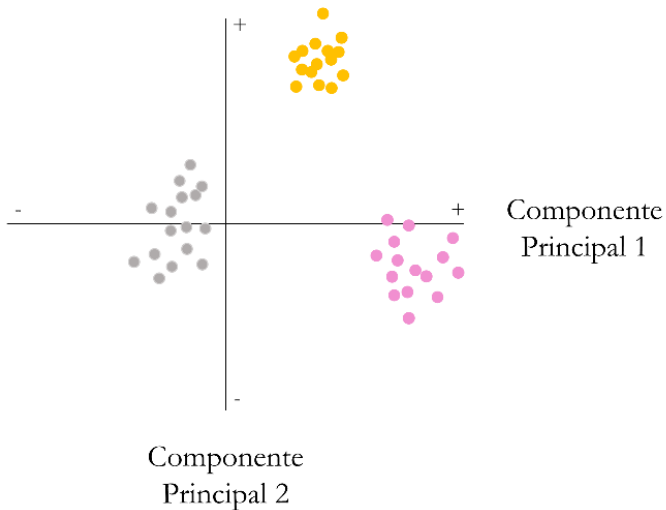
**Ecuación 3** 
$$X = S_1L_1^T + S_2L_2^T + \dots + S_kL_k^T \text{ siendo } k \leq \min \{i,j\}$$

Las cargas (*loadings*) son variables que recogen la máxima variación espectral existente entre las variables iniciales, de modo que cada una de las originales puede ser expresada como combinación lineal de varias de las nuevas cargas. Los coeficientes de dichas combinaciones lineales son las puntuaciones (*scores*), las cuales determinan el grado de cada nueva carga que habría que tomar para reconstruir la variable inicial<sup>182,183</sup>.

Algunas de las características más importantes de los componentes principales son las siguientes:

- Los componentes principales se ordenan en el modelo de forma que el primero de ellos es el que contiene la máxima variabilidad entre los datos analizados. El segundo contiene la máxima variabilidad entre la restante y, así sucesivamente, hasta llegar al último de los componentes, que es el que suele contener ruido experimental.
- Son ortogonales, lo que implica que la contribución de cada uno de los componentes principales a la matriz X inicial no está correlacionada.
- Los *loadings* pueden considerarse abstractamente como espectros, mientras que los *scores* podrían ser perfiles de concentración. Por lo tanto, los gráficos de cargas representan la contribución de las variables originales en los nuevos componentes principales mediante el empleo de vectores. En ellos, la orientación y ángulo entre vectores determina el grado de correlación (positivo, negativo o nulo) entre las variables. Sin embargo, los gráficos de puntuaciones muestran la agrupación o evolución de las muestras de la matriz X.

En la Figura 14 puede observarse un ejemplo sencillo de gráfico de puntuaciones en el que se observa el agrupamiento de muestras al enfrentar los componentes principales 1 y 2.



**Figura 14.** Ejemplo básico de gráfico de puntuaciones (componente 1 frente a componente 2) en un modelo de PCA

Seguidamente, podrían emplearse técnicas de segmentación, resolución de mezclas espectrales, regresión y clasificación. Para ello, en esta tesis se han empleado el análisis jerárquico de conglomerados (HCA), el análisis de componentes vértice (VCA) y el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

- **HCA: Análisis jerárquico de conglomerados**

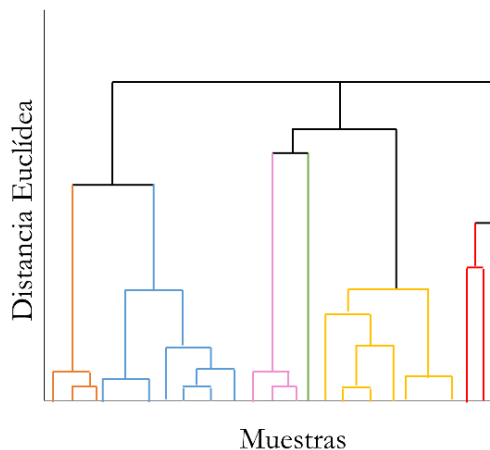
Este análisis consiste en determinar la asociación de las muestras en grupos (a partir de sus características similares) y estudiar la diferencia existente entre los distintos grupos, estableciendo distancias en base a jerarquías<sup>184</sup>. La distancia entre dos determinadas muestras ( $i, j$ ) se calcula matemáticamente mediante

diferentes métodos, siendo el de la distancia Euclídea el más habitual (ver Ecuación 4).

$$\text{Ecuación 4} \quad d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^T (x_i - x_j)} = \sqrt{\sum_{k=1}^n (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

Las muestras se agrupan en ramas sucesivas, empezando por dos muestras individuales y basándose en que su distancia  $d_{ij}$  sea la mínima. Para la agrupación de muestras en una misma rama se utilizan algoritmos como el método de Ward, el cual establece como muestras similares a aquellas en las que la suma de su heterogeneidad crezca en la menor medida posible. Independientemente del método usado, el resultado de estos modelos suele siempre representarse en un gráfico bidimensional de tipo dendograma (ver Figura 15), en el cual se observa la organización y relación de las muestras en ramas jerárquicas en forma de árbol<sup>185</sup>.

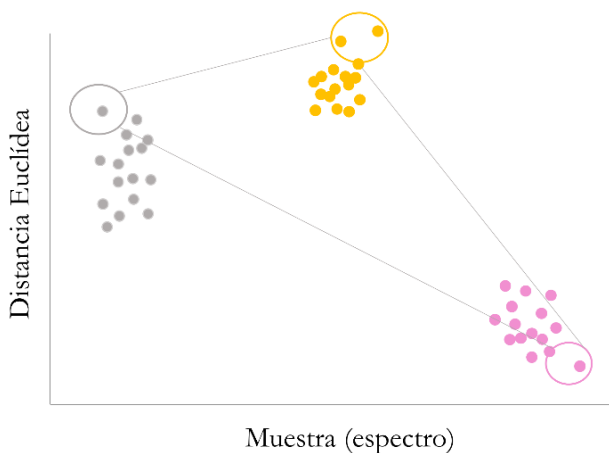
HCA: Dendograma bidimensional



**Figura 15.** Ejemplo simple de dendograma bidimensional en un modelo de HCA

- **VCA: Análisis de componentes vértice**

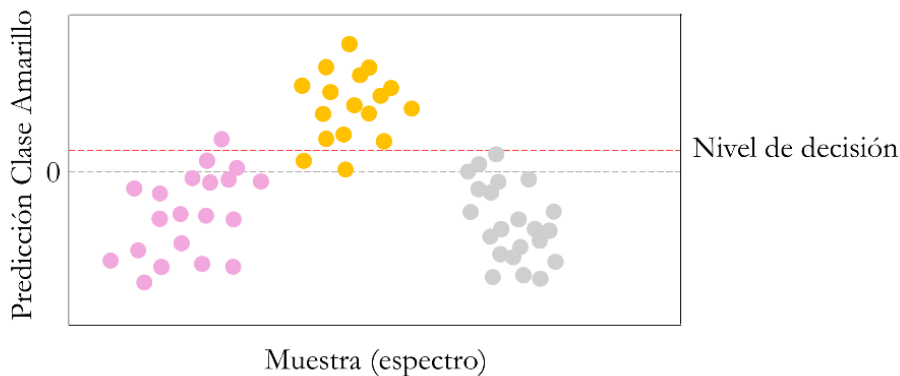
Esta técnica se basa en un algoritmo de desmezcla espectral<sup>186,187,188</sup>. Es decir, dado un conjunto de vectores espectrales mixtos, el objetivo es determinar el número de sustancias individuales de referencia, sus características espectrales y su proporción en dicha mezcla. Cuando se aplica esta metodología, se parte de la suposición de que cada espectro es un vector independiente que ocupa un lugar específico en el espacio euclídeo, en el cual cada longitud de onda (o variable espectral de medida) es asociada con unas coordenadas determinadas. Basándose en que cada grupo de espectros similares ocupa una zona geográfica en ese espacio, los “vértices” de esa área representan el espectro con el valor más extremo para ese conjunto de variables, pudiendo considerarse así como el espectro “puro” (ver Figura 16). En muchas ocasiones, dichos espectros vértice pueden asociarse a componentes, moléculas o sustancias químicas concretas.



**Figura 16.** Ejemplo simple de gráfico de componentes vértice en un modelo de VCA

- **PLS-DA: Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales**

Es un método de clasificación lineal, que combina las propiedades de la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) con la potencia del análisis discriminante lineal (LDA)<sup>189,190</sup>. En el análisis PLS se construyen las denominadas variables latentes (de forma muy parecida a los componentes principales en el PCA) pero, en este caso, la etapa de descomposición se basa en la mayor o menor variabilidad del valor (o valores) establecidos como etiquetas, intentando maximizar así la covarianza entre las mismas y las observaciones empíricas. En el método PLS, las variables latentes se utilizan como factores de predicción de concentración o pertenencia a distintas clases mediante una ecuación matemática predictiva<sup>191</sup>. Es decir, se calcula la probabilidad de pertenencia de una muestra a cada una de las clases descritas y el modelo selecciona aquella clase cuya probabilidad es mayor (cada muestra es siempre clasificada dentro de una categoría)<sup>192</sup>. A la hora de realizar un modelo de este tipo es muy importante el número de variables latentes a utilizar, pues éstas se ordenan por el contenido de variabilidad en la concentración de los datos. Por su parte, el análisis discriminante lineal (DLA) persigue encontrar combinaciones lineales que separen y agrupen dos o más grupos de muestras en base a determinadas características espectrales. Por lo tanto, mediante la combinación de estas dos metodologías se obtiene el análisis PLS-DA, que se usa cuando la variable a predecir es categórica y, comúnmente, se emplea para realizar estudios de clasificación. En la siguiente Figura (Figura 17) se muestra un ejemplo sencillo de gráfico de predicción obtenido mediante un modelo PLS-DA.



**Figura 17.** Ejemplo simple de gráfico de predicción en un modelo de PLS-DA en el que se predice la pertenencia de las muestras a la clase amarilla

Por último, se le debe conceder igual importancia a la selección apropiada de muestras, lo cual implica que sean lo suficientemente numerosas como para construir un modelo robusto y para garantizar la representatividad del conjunto total. Además, en las técnicas de análisis supervisado (que son aquellas en las que se relaciona a la muestra o espectro con un valor de tipo numérico o categórico) es necesario disponer de un conjunto de muestras para la calibración y evaluación o validación interna; es decir, las que se emplean para fabricar y, posteriormente, entrenar el modelo<sup>193</sup>. Mientras que las muestras de calibración deben contener toda la variabilidad del conjunto de espectros que formen el modelo, así como la esperada para muestras futuras<sup>194</sup>, las de validación deben ser completamente ajenas al modelo y no haber sido utilizadas para su creación<sup>195</sup>, para evitar que influyan en una sensación de mayor efectividad del mismo.

En muchas ocasiones, y como alternativa a lo anteriormente explicado para modelos con un conjunto pequeño o mediano de muestras/espectros, se utiliza el método de validación cruzada. Se emplea para validar la calibración durante la etapa de entrenamiento del modelo y para poder ajustarlo en base a diferentes métodos. Uno de los más comunes es el denominado “dejar uno fuera” (“*leave one out*”), en el cual se elimina una muestra de la calibración del modelo y se reserva para la validación posterior (este procedimiento se repite para cada una de las muestras del conjunto del mismo). Otros de los métodos más utilizados para este fin son: ventanas venecianas (“*venetian blinds*”) o el “*K-fold*”, los cuales utilizan subgrupos de muestras (escogidos según distintas instrucciones en cada caso) para la validación de los modelos, los cuales han sido previamente calibrados sin ellos<sup>196</sup>.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## 2. Hipótesis y Objetivos

En esta Tesis Doctoral se aborda el estudio de imágenes hiperespectrales de espectroscopía vibracional. La utilización de imágenes hiperespectrales frente a las medidas puntuales de espectroscopía convencional presenta una mayor versatilidad y ventajas y, por tanto, una gran aplicabilidad, lo que constituye la hipótesis de partida.

Se proponen los siguientes objetivos generales que se concretan en los diferentes casos de estudio:

- Profundizar en el preprocesado y tratamiento de la información hiperespectral y demostrar la capacidad de las técnicas de análisis multivariante para la reducción dimensional de datos y la obtención de tendencias, patrones, agrupamientos y clasificaciones en base a características espectrales.
- Estudiar el potencial del registro de imágenes hiperespectrales con microscopía infrarroja para el análisis de transformaciones químicas en procesos en evolución. En concreto, se propone:
  - Investigar los cambios químicos que tienen lugar en los tejidos vegetales durante el proceso natural de maduración de la aceituna
  - Evaluar los efectos del envejecimiento artificial acelerado en muestras modelo de pinturas

- Avanzar en la caracterización de muestras heterogéneas aprovechando el potencial de las imágenes hiperespectrales multimodales con dos estrategias:
  - Utilización de un único instrumento de análisis que proporcione información espectral de diferente naturaleza en el caso de la autenticación del pigmento azul ultramar y empleando un microespectrómetro Raman
  - Combinación de señales analíticas de diferentes técnicas en un único modelo hiperespectral para profundizar en la caracterización del azul ultramar e investigar el origen de las señales de luminiscencia
- Comparar distintos modos de escaneo de imágenes hiperespectrales en espectroscopía Raman a distancia (medidas en modo remoto) para el análisis de materiales de interés.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3. Materiales y métodos

En este apartado se detallan todos los aspectos relacionados con las muestras de análisis y sus características, el procedimiento experimental incluyendo la preparación de muestra en cada caso, la adquisición de imágenes hiperspectrales y la instrumentación analítica que ha sido necesaria para tal fin.

#### 3.1 Muestras analizadas

##### 3.1.1 Muestras de origen biológico. Aceitunas

Se han analizado aceitunas de la variedad Picual, la más común en nuestra provincia. Fueron recogidas durante una temporada completa de maduración (desde el mes de septiembre hasta enero). Se tomaron, aproximadamente, una docena de muestras de forma semanal de un olivo situado en el Campus de las Lagunillas de la Universidad de Jaén (Figura 18).



**Figura 18.** Olivo situado en la Universidad de Jaén del que se recogieron las muestras de aceitunas

Durante la maduración pudieron observarse cambios físicos en las aceitunas (mostrados en la Figura 19), que pasaron de un color verde intenso a principios del periodo (septiembre) a morado (octubre-noviembre), para acabar con una tonalidad ennegrecida hacia finales de la temporada (diciembre-enero). Además, el tamaño de las mismas va aumentando considerablemente conforme se van alcanzando estadios más avanzados del proceso de maduración. Esto se asocia al crecimiento de la proporción de agua y a la formación de aceite de oliva (biosíntesis de ácidos grasos) en el mesocarpio, tejido que llega a alcanzar el 90% del fruto una vez finalizado su desarrollo.



**Figura 19.** Esquema de los cambios en el aspecto de las aceitunas durante el proceso de maduración

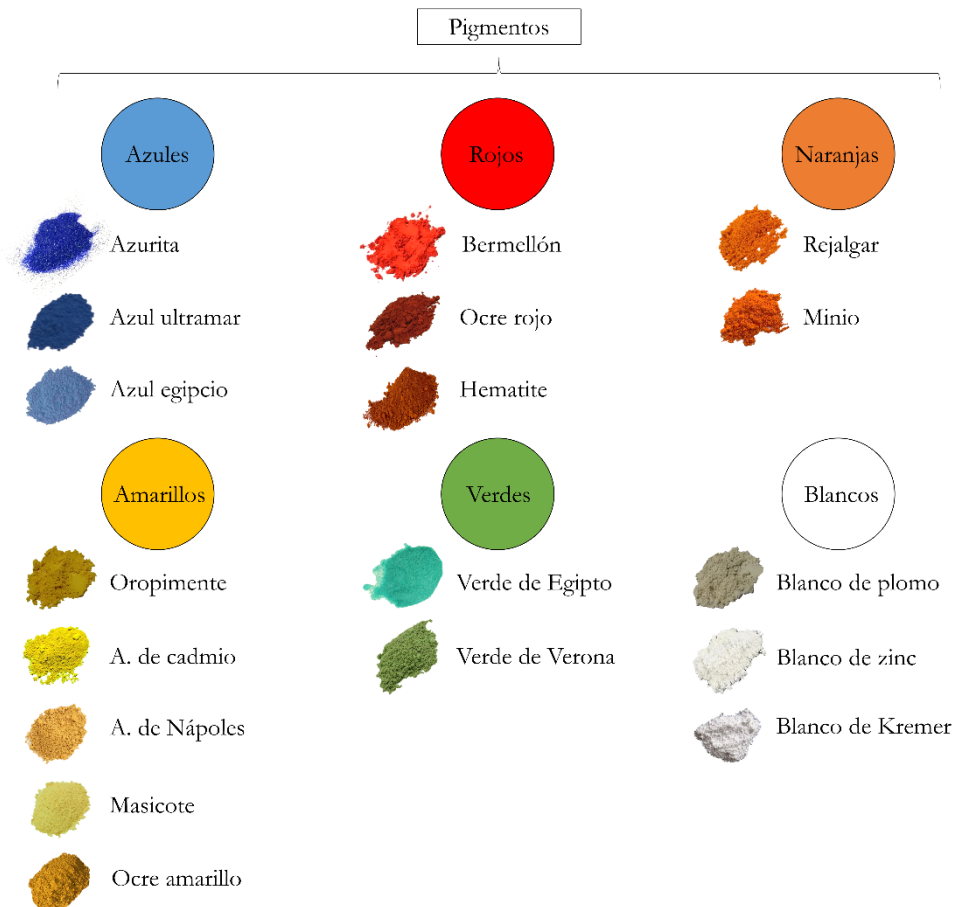
Una vez recogidas, las aceitunas se lavaron individualmente, utilizando la cantidad mínima e indispensable de agua destilada para eliminar la suciedad superficial que pudiesen contener. A continuación, se secaron con papel y se colocaron en pequeñas bolsas de plástico rotuladas con su fecha de recogida. Por último, se sometieron a congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento.

### **3.1.2 Muestras de interés pictórico**

En esta Tesis Doctoral se han analizado diferentes muestras de interés en el estudio del patrimonio histórico-artístico, desde las materias primas como pigmentos y aglutinantes, hasta muestras modelo de policromías y muestras históricas de la Alhambra (Granada). Este espacio se ha tomado como referencia para la elección y preparación de muestras dado que el estudio de sus revestimientos decorativos ha sido objeto de los proyectos de investigación del grupo en el que se enmarca esta Tesis.

#### **Pigmentos y aglutinantes**

Para los trabajos presentados en esta Tesis se ha hecho una selección de pigmentos minerales, la cual se recoge en la Figura 20. Todos ellos fueron adquiridos en Kremer Pigmente GmbH & Co.



**Figura 20.** Clasificación de los pigmentos analizados en base a su color

A continuación, se describen las principales características y el interés de aquellos pigmentos que se han estudiado en más profundidad:

- La **azurita**,  $(\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2)$ , fue uno de los pigmentos azules más ampliamente empleados en épocas como la Edad Media y el Renacimiento, especialmente por la cultura egipcia<sup>197</sup>. Procede de un mineral con elevado contenido en cobre y, según el procedimiento experimental de aplicación, su tonalidad puede variar hasta alcanzar tintes verdosos. También se ve influenciado por condiciones de

humedad y calor intenso, modificando su color a negro por la aparición de residuos de óxido de cobre II (CuO).

- El **bermellón**, (HgS), también conocido como cinabrio<sup>197</sup>, es un pigmento de color rojo vino intenso y en la actualidad es comúnmente preparado de manera artificial mediante la reacción química entre el mercurio y sulfuro fundido. Fue muy usado en la Antigua Roma y en lugares como la India o China, en los que se empleaba para decoraciones artísticas, pinturas, vasijas o incluso marcas faciales.
- El **oropimente**, o amarillo real (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>), posee una tonalidad amarilla brillante<sup>198,199</sup> muy deseada en el Oriente Medio y Egipto, donde fue empleado para decorar elementos fúnebres como ataúdes o insignias. De forma natural puede encontrarse en pequeños depósitos de Asia, Macedonia o centro Europa. Su versión artificial se sintetiza mediante un proceso químico que involucra etapas de fusión, sublimación y precipitación.
- El **blanco de plomo**, ((PbCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pb(OH)<sub>2</sub>), fue el único pigmento blanco utilizado en pinturas al óleo hasta principios del siglo XX<sup>197</sup>. Tiene buena estabilidad a la luz, pero no a condiciones de temperaturas elevadas. Destaca por su opacidad y brillo característico cuando es utilizado junto con algunos aglutinantes grasos.

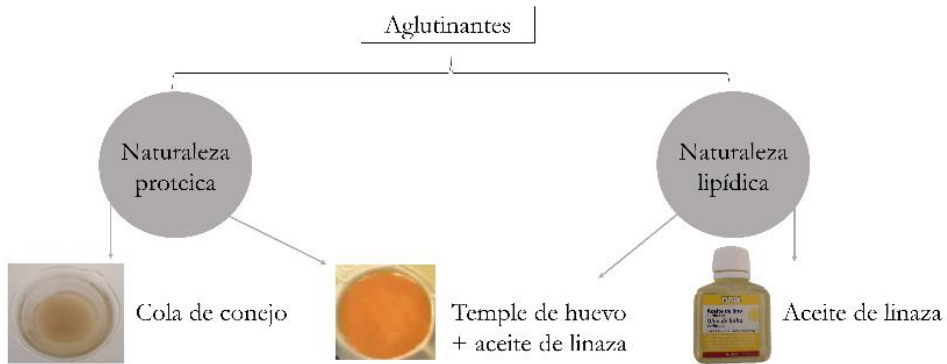
- El **azul ultramar** es un pigmento azul brillante que debe su fuerte tonalidad a la lazurita, ( $\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_n$ ), mineral presente en la composición de la piedra semipreciosa lapislázuli<sup>200</sup>. Fue un pigmento muy codiciado en Europa durante los siglos XIV y XV, alcanzando un valor incluso más alto que el del oro y empleándose en decoraciones de todo tipo de materiales (como piezas de joyería, elementos ornamentales o motivos religiosos). En esta Tesis, se han estudiado y comparado distintas calidades de pigmento azul ultramar natural y sintético (mostradas en la Figura 21).



**Figura 21.** Esquema resumen de las distintas muestras de azul ultramar naturales y sintéticas estudiadas

Las policromías están compuestas normalmente por una capa de soporte sobre la que se aplica la pintura, constituida generalmente por una mezcla de pigmento y aglutinante. Los aglutinantes sirven de adherentes al material artístico que se desee y, por tanto, mejoran el aspecto final de la policromía. Entre los aglutinantes más utilizados en arte pueden encontrarse los de naturaleza proteica (obtenidos a partir de materias primas naturales, y que deben ser disueltos en agua previa mezcla con los pigmentos) y los de naturaleza lipídica (normalmente sustancias secantes de origen vegetal que pueden mezclarse directamente con el pigmento). A continuación, se detallan

las principales características de los aglutinantes empleados en esta Tesis Doctoral (ver Figura 22):



**Figura 22.** Clasificación de los aglutinantes analizados en base a su naturaleza química

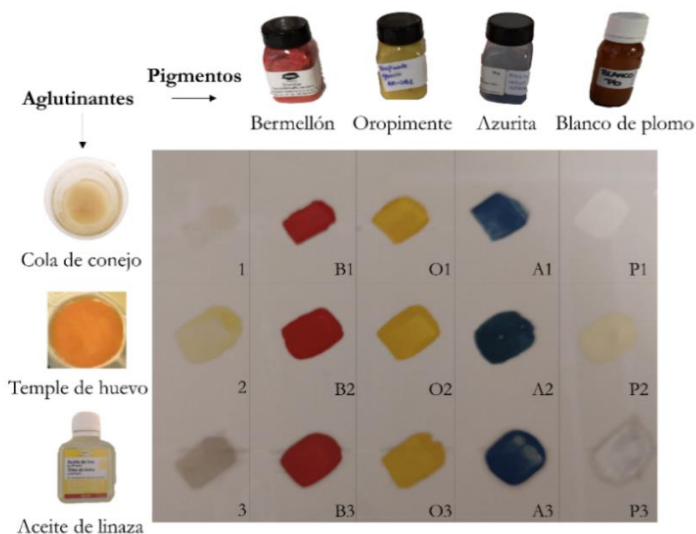
- La **cola de conejo** es un extracto de naturaleza proteica que se obtiene de pieles de conejo, previamente lavadas y sometidas a procedimientos de extracción de proteínas, filtrado, desecado, disolución y acondicionamiento para su uso como aglutinante. Suele exhibir un aspecto gelatinoso y translúcido y presenta una elevada fuerza adherente.
- El **temple de huevo** es un aglutinante cuyo componente principal es la yema del huevo, emulsión natural que permite una pintura de secado rápido y con aspecto cromático único. Hasta el siglo XV, su utilización en Europa estaba tan extendida, que constituía el método habitual de pintura en tabla. En algunas preparaciones, puede mezclarse con agua destilada, barnices o aceites.

- El **aceite de linaza** es el aglutinante de referencia para la pintura al óleo. Se obtiene a través del prensado en frío de la semilla del lino, seguido de una etapa de blanqueamiento y secado. Presenta una excelente combinación entre sus propiedades de adherencia, durabilidad, rápido secado y estabilidad cromática.

### Muestras modelo. Envejecimiento acelerado

Se prepararon muestras modelo de pinturas con diferentes mezclas de pigmento y aglutinante siguiendo los métodos tradicionales de preparación. Estas muestras se envejecieron de manera acelerada empleando radiación ultravioleta.

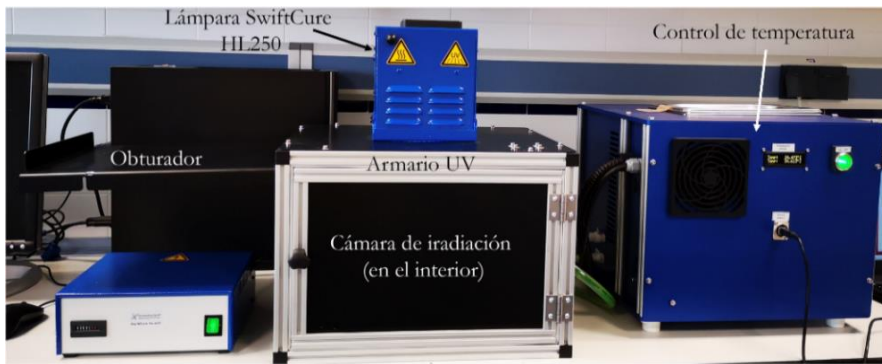
Siguiendo el patrón de mezclas que se observa en la Figura 23, se prepararon dos tablas idénticas (15 x 20 cm) que contenían un total de 15 preparaciones modelo sobre un soporte de yeso.



**Figura 23.** Tabla de trabajo preparada sobre yeso y formada por 15 combinaciones pigmento-aglutinante

Para la preparación de cada una de estas mezclas, se utilizaron contenedores de plástico, en los que se mezclaron 0,2500 g del pigmento en cuestión con la cantidad necesaria de aglutinante hasta conseguir la textura deseada (proporción 3:1 aproximadamente). El aceite de linaza se adicionó directamente pero, en el caso de la cola de conejo (adquirida en forma granular), se disolvieron 5g en 50 mL de agua destilada y se dejó reposar la mezcla durante 24 horas, hasta que todas las partículas absorbieron el líquido. El agua sobrante fue, posteriormente, hervida y usada para disolver dicho aglutinante. Para el temple, se mezcló la yema del huevo con dos gotas de agua destilada y dos de aceite de linaza, hasta conseguir la textura idónea para su utilización.

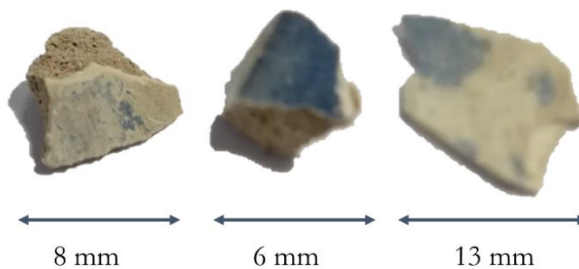
Las tablas, una vez pintadas, se mantuvieron durante un mes en sequedad a temperatura ambiente y en una zona oscura del laboratorio. El proceso de envejecimiento se llevó a cabo en tres etapas bajo condiciones térmicas controladas de  $35,0 \pm 0,6$  °C durante períodos sucesivos de 24h, 72h y 120h. Para ello, se utilizó una cámara de envejecimiento con una fuente de radiación ultravioleta (UV), mostrada en la Figura 24. Consta de una cámara climatizada (420 mm x 304 mm x 325 mm), un armario UV (492 mm x 311 mm x 345mm) para la lámpara SwiftCure HL250 con filtro azul y un sistema de control de temperatura con baño de agua. La radiación UV-A es de 315-400 nm: 30 W, y la radiación UV-B es de 280-315 nm: 3W. El sistema regulador de la temperatura se controla con el programa Tec Service Software.



**Figura 24.** Sistema de envejecimiento acelerado con radiación ultravioleta (Peschl Ultraviolet) de la Universidad de Jaén incluyendo todos sus accesorios

### Muestras históricas

Por último, se analizaron tres micromuestras históricas (ver Figura 25) procedentes de las yeserías de dos bóvedas de la Sala de los Reyes de la Alhambra (Granada), complejo en el que el grupo de investigación en el que se enmarca esta Tesis posee una amplia experiencia y cuenta con numerosos estudios previos. Las muestras se desprendieron durante una restauración anterior y contenían distintas tonalidades de azul ultramar, el cual ha sido muy empleado en diversas estancias y motivos policromáticos de dicho monumento.



**Figura 25.** Muestras de pequeños fragmentos desprendidos de las yeserías de la Sala de los Reyes de la Alhambra, Granada. En todas ellas se observa la decoración en azul.

### 3.1.3 Muestras de origen plástico

Se utilizaron cuatro tipos de polímeros: polipropileno ( $C_3H_6$ )<sub>n</sub>, polietileno ( $C_2H_4$ )<sub>n</sub>, politetrafluoroetileno ( $C_2F_4$ )<sub>n</sub> y nailon 6 ( $C_{12}H_{22}N_2O_2$ )<sub>n</sub>, escogidos por su gran potencial como dispersores Raman. Los dos primeros son polímeros muy similares y fácilmente confundibles por su apariencia. Mientras que el polipropileno posee propiedades termoplásticas y se obtiene por polimerización del propileno, el polietileno es el plástico más empleado en la industria (por su bajo coste y facilidad de fabricación) y puede obtenerse mediante la polimerización de etileno. El politetrafluoroetileno (o teflón) tiene una estructura química basada en el polietileno, en la cual se sustituyen los átomos de hidrógeno por flúor. Por último, el nailon es un polímero elástico y muy resistente que se sintetiza a través de sucesivas reacciones de policondensación de diamina. Todos ellos fueron adquiridos de la casa comercial RS Components con un espesor de placa polimérica era de 2, 4, 6 y 4 mm, respectivamente.

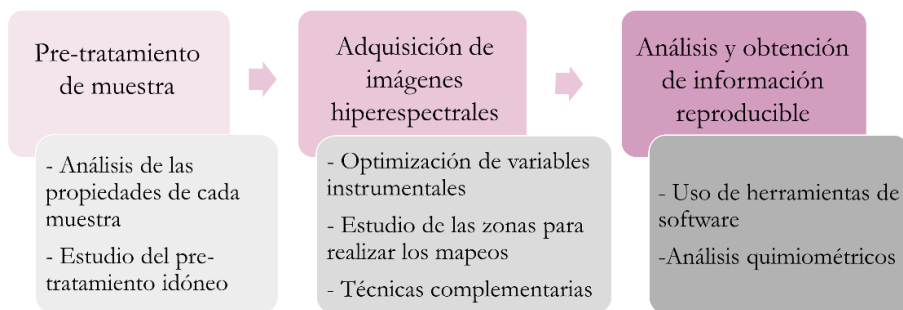
Tal y como se muestra en la Figura 26, mediante la unión de estas cuatro placas, usando para ello pequeñas cantidades de adhesivo de cianoacrilato, se obtuvo una única muestra polimérica que se tomó como muestra modelo.



**Figura 26.** Muestra modelo compuesta por cuatro tipos diferentes de polímeros

### 3.2 Procedimiento experimental e instrumentación

En este apartado se detallan las etapas llevadas a cabo en el procedimiento experimental (ver Figura 27), incluyendo las variables más representativas a tener en cuenta en cada una de ellas y la instrumentación necesaria



**Figura 27.** Etapas generales del procedimiento experimental llevado a cabo

#### 3.2.1 Preparación de muestra para la medida

Esta etapa depende fundamentalmente de las características de la muestra y de la técnica de adquisición de imagen empleada. Mientras que en algunos casos sólo se requirió la adaptación de la medida a la instrumentación escogida, en otros fueron necesarias varias etapas de pretratamiento específicas.

- El estudio de maduración de las aceitunas se llevó a cabo sobre cortes transversales y en modo transmisión en IR, por lo que fue de especial relevancia la preparación y obtención de láminas finas y homogéneas. Para ello se empleó un instrumento cuya utilización en muestras vegetales es de amplio recorrido dentro del sector biológico: un criostato (Leica CM 1950) mostrado en la Figura 28.



**Figura 28.** Criostato CM 1950 (Leica) del CICT de la Universidad de Jaén y detalle del cabezal, cuchilla y zona de trabajo durante el corte transversal de una lámina de grosor  $40\ \mu\text{m}$

Es un microtomo que dispone de una cámara refrigerada en la que la muestra se encuentra en estado de congelación. De esta forma, los tejidos se endurecen rápidamente, manteniendo así su estructura molecular y facilitando el corte con la cuchilla metalizada reutilizable.

La equipación del criostato consiste en el microtomo de alta gama encapsulado con su propio sistema de refrigeración totalmente integrado, un mecanismo de aspiración de los cortes realizados, un motor para el sistema de corte automático, un soporte para la cuchilla, y un compartimento para la regleta de congelación Peltier. El grosor de los cortes fue optimizado a  $40\ \mu\text{m}$  con una velocidad de corte variante según el grado de maduración de la muestra, pudiendo elegirse entre lenta (entre 0-50 carreras/min), rápida (entre 0-85 carreras/min) y velocidad máxima (entre 85-90 carreras/min).

- El estudio de caracterización del azul ultramar se llevó a cabo con diferentes técnicas, por lo que supuso varias preparaciones de muestra:
  - a) Muestras en formato polvo sin preparación

En este caso, las muestras del pigmento se aplanaron sobre un portaobjetos de vidrio con ayuda de una espátula metálica, para conseguir una superficie sin rugosidades (ver Figura 29)



**Figura 29.** Muestra de azul ultramar natural puro en polvo aplanada y colocada sobre un portamuestras de vidrio

- b) Pastillas con KBr

Se prepararon en forma de pastilla sólida, mezclando pigmento y KBr en proporción 1:1. Se utilizó un mortero y una prensa para asegurar la homogeneidad y compactibilidad de las pastillas resultantes (ver Figura 30).



**Figura 30.** Ejemplo de las pastillas obtenidas para los pigmentos azul ultramar sintético oscuro y azul ultramar natural calidad media. Detalle del tamaño de la pastilla sujeta con una pinza de laboratorio

- Las muestras modelo de policromías y las muestras históricas se analizaron sin preparación previa, posicionándolas directamente sobre la pletina motorizada del instrumento analítico en el que se realizó la adquisición de las imágenes hiperespectrales.
- Por último, en el estudio de polímeros, únicamente se requirió el correcto posicionamiento de la muestra con respecto al telescopio. Así, se empleó un elemento metálico con pinzas (que realizaba la función de soporte y mantenimiento) y se enfocó la muestra para llevar a cabo las mediciones manteniendo una distancia de 15 m (ver Figura 31).



**Figura 31.** Detalle de la distancia de separación entre el telescopio y la muestra durante una medida de espectroscopía Raman a distancia

### **3.2.2 Adquisición de imágenes hiperespectrales. Instrumentación**

En esta etapa fue siempre necesario un conocimiento previo sobre la naturaleza y características químicas de las muestras, pudiendo así seleccionar la técnica analítica más adecuada para su estudio.

En el caso de las medidas realizadas con espectroscopía infrarroja se empleó un espectrómetro FTIR 6300 acoplado a un microscopio IRT-7000 de Jasco (Figura 32).

Este equipo cuenta con un detector DLaTGS con sistema Peltier de termostatación y dos detectores MCT y MCT en línea con 16 líneas para el microscopio. Además, dispone de dos objetivos Cassergrain (16X y 32X) con distancias de trabajo de 20 mm y 10 mm, respectivamente.



**Figura 32.** Microespectrómetro Infrarrojo (Jasco) del CICT de la Universidad de Jaén

Las imágenes hiperespectrales fueron adquiridas optimizando las medidas a 200 acumulaciones y con condiciones de apertura de ventana de  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  en el análisis de muestras de aceitunas y de  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  en el estudio de envejecimiento de muestras pictóricas.

En el caso de la microespectroscopía Raman confocal y, atendiendo a criterios de disponibilidad y condiciones técnicas para cada análisis, se han utilizado tres instrumentos diferentes (mostrados en las Figuras 33, 34 y 35). Los dos primeros fueron utilizados en las propias instalaciones de la Universidad de Jaén (CICT), mientras que el tercero se empleó durante la estancia predoctoral realizada en la Universidad Técnica de Viena. Las especificaciones técnicas de cada uno de ellos pueden verse esquematizadas en la Tabla 4.



**Figura 33.** Microespectroscopio Raman confocal inVia™ (Renishaw) del CICT de la Universidad de Jaén



**Figura 34.** Microespectroscopio Raman confocal XploRA-Plus (HORIBA) temporalmente disponible en el CICT de la Universidad de Jaén

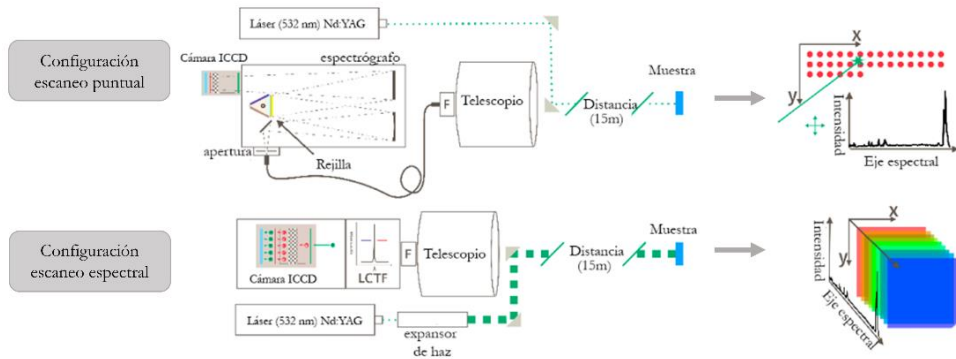


**Figura 35.** Microespectroscopio Raman confocal alpha300 RSA+ (WITec) de la Universidad técnica de Viena

**Tabla 4.** Comparación entre los distintos microespectroscopios Raman Confocal usados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral

	<b>inVia™</b>	<b>XploRA-Plus</b>	<b>Alpha300RSA+</b>
Casa comercial	Renishaw	HORIBA	WITec
Disponibilidad	CICT Universidad de Jaén	CICT Universidad de Jaén	Universidad Técnica de Viena
Longitud de onda del láser	514 nm 785 nm	532 nm 638 nm 785 nm	488 nm 532 nm 638 nm 785 nm
Resolución lateral	1 $\mu\text{m}$	0,5 $\mu\text{m}$	~200 nm
Resolución espectral	<1 $\text{cm}^{-1}$	<1 $\text{cm}^{-1}$	~0,1 $\text{cm}^{-1}$
Detector	Cámara CCD	EMCCD	Cámara CCD
Objetivos	5X, 20X, 50X, 100X	10X, 50X, 100X y larga distancia	5X, 10X, 50X, 100X y larga distancia
Autofocus	✘	✓	✓
Adaptador para mayor tamaño	✘	✘	✓
Acoplamiento de fibra	✘	✘	✓
Software tratamiento datos	WireInterface	LabSpec 6	Suite Five Control

Para los estudios Raman en modo remoto de camino abierto, se emplearon dos configuraciones (ver Figura 36) construidas y modeladas previamente por Christoph Gasser, miembro del equipo de investigación de la Universidad Técnica de Viena. Una de ellas operando mediante el método de escaneo punto a punto y la otra mediante escaneo espectral.



**Figura 36.** Esquema de las configuraciones de escaneo espacial puntual y escaneo espectral de la instrumentación *stand-off* y sus metodologías de generación de imágenes hiperespectrales. Adaptado de (Gasser, 2019)<sup>201</sup>

Ambas configuraciones cuentan con una fuente de excitación de 532 nm (láser Nd:YAG NL301HT), con la única diferencia de que se trabaja en forma colimada para la configuración puntual y expandida para la configuración directa de escaneo espectral. De esta forma, mientras que con la primera se consigue una zona de iluminación de diámetro 6 mm, con la segunda se puede llegar a iluminar un área con un diámetro de, aproximadamente, 100 mm. Las condiciones experimentales fueron optimizadas a 50 mJ, 4,4 ns y 10 Hz.

En ambos casos se trabajó en un laboratorio con dimensiones especialmente diseñadas para este fin y en el que únicamente se realizaba esta tarea.

La Tabla 5 resume el tipo de análisis empleado y la instrumentación necesaria para cada una de las aplicaciones estudiadas.

**Tabla 5.** Técnica analítica y principales parámetros instrumentales empleados en el análisis hiperespectral de cada una de las muestras

Muestras	Técnica analítica	Parámetros instrumentales
Aceitunas	Microespectroscopía infrarroja	Medida en transmisión Objetivo 16X 120 píxeles
Policromías modelo	Microespectroscopía infrarroja	Medida en reflexión Objetivo 16X 225 píxeles
Azul ultramar	Microespectroscopía Raman	Láser 532 nm y 785 nm Objetivo 10X 190 píxeles/60000 píxeles
Históricas	Microespectroscopía Raman	Láser 785 nm Objetivo 10X 90 píxeles
Poliméricas	Espectroscopía Raman a distancia	Láser 532 nm Dos configuraciones 20000 píxeles/escaneo área

### 3.2.3 Análisis complementarios

Aunque el empleo de imágenes hiperespectrales constituye la parte principal de todos los estudios de esta Tesis Doctoral, en la mayoría de ellos se han llevado a cabo otros análisis que complementan la información ya obtenida. De esta forma, se consigue una descripción más completa y detallada de las muestras, incluyendo análisis de tipo elemental, cristalográfico e incluso empleando técnicas para determinar el color.

### a) *Microscopía Óptica Digital*

Esta técnica se caracteriza por disponer de una cámara digital en lugar de oculares y el sistema óptico del microscopio optimizado para ello y conectado mediante conexión USB a un ordenador. De esta forma, con la cámara se puede observar la muestra y tomar y editar imágenes *in situ* de la superficie de la muestra analizada en tiempo real.

Se utilizó el microscopio óptico digital Dino Lite (ver Figura 37), que dispone de aumentos desde 5X hasta 200X e incluye un adaptador para luz polarizada.

Este instrumento fue utilizado para la monitorización superficial de las diferentes muestras pigmento-aglutinante durante todos los procesos de envejecimiento llevados a cabo.



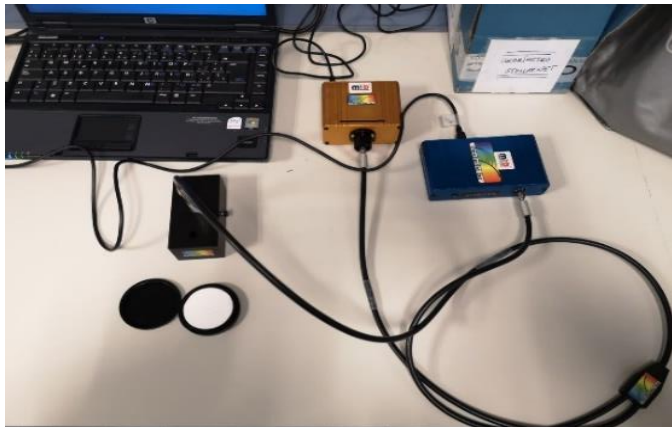
**Figura 37.** Microscopio óptico digital (Dino Lite) del grupo de investigación FQM-363 de la Universidad de Jaén

***b) Espectroscopía de Reflectancia con fibra óptica (FORS)***

En la actualidad, esta técnica constituye una de las metodologías no invasivas más comunes en las investigaciones llevadas a cabo en el campo del estudio del patrimonio, conservación y restauración artística.

La reflectancia es una magnitud que mide la capacidad de una muestra para reflejar la luz, y su medida experimental suele expresarse en forma porcentual, calculándose como el cociente entre la radiación reflejada por la muestra y la reflejada por un estándar.

Se empleó el espectrocolorímetro portátil StellarNet BLUE-Wave miniature (StellarNet Inc.), (ver Figura 38) compuesto por un mini-espectrómetro, una lámpara UV-Vis y una sonda de reflectancia con fibra óptica. Como referencia se utiliza un estándar de reflectancia de halón de 50 mm (STN-RS50). Las medidas se realizan con un ángulo de 45° para minimizar el efecto de la reflectancia difusa.



**Figura 38.** Espectrocolorímetro BlueWave-Vis (StellarNet) del grupo de investigación FQM-363 de la Universidad de Jaén

A partir del espectro de reflectancia adquirido (en el rango visible entre 370 nm y 1000 nm), se calculan los parámetros colorimétricos definidos por el espacio de color CIELAB<sup>202</sup>, siendo a\* (- para el verde y + para el rojo) y b\* (- para el azul y + para el amarillo) los medidores del color y L\* el parámetro indicador de la luminosidad.

### ***c) Difracción de Rayos X (XRD)***

Este fenómeno tiene lugar cuando la radiación dispersada, debida a la interacción de radiación de rayos X con la materia, se produce a la misma longitud de onda (es decir, misma energía) que la incidente. Para que ocurra este tipo de dispersión, se tiene que cumplir la denominada Ley de Bragg ( $n\lambda=2d \text{ sen}\theta$ ), con la cual se asegura que todos los haces dispersados estarán completamente en fase, siempre y cuando esa diferencia de fase sea igual a un número entero de n veces dicha longitud de onda.

Esta técnica se utilizó con el fin de poder determinar la naturaleza cristalográfica de las muestras analizadas (estructura, celdilla unidad, fases cristalinas, pureza, etc) gracias a la posición, intensidad y perfil de los picos obtenidos en el difractograma. En este caso, se utilizó el difractómetro de Rayos X Empyrean del CICT de la Universidad de Jaén (Figura 39). Para las medidas realizadas se empleó radiación de Cu-K $\alpha$  (45 KV, 40 mA) y un detector PIXcel 3D, operando en el rango angular entre 5°-80° (2 $\theta$ ). El procedimiento de cuantificación fue realizado mediante el método Rietveld.



**Figura 39.** Difractómetro de Rayos X Empyrean (Malvern PANalytical Ltd) del CICCT de la Universidad de Jaén

#### ***d) Fluorescencia de Rayos X (XRF)***

Esta técnica se fundamenta en la excitación de los átomos de una muestra por una fuente de rayos X y la detección de la radiación secundaria emitida que también es del rango de rayos X. Debido a que la energía de las transiciones electrónicas y, por tanto, la emisión de la radiación de rayos X de los átomos de cada elemento es única, esta técnica puede utilizarse para la caracterización elemental de las muestras sujetas a análisis.

Se empleó el analizador de fluorescencia de Rayos X portátil XL3t GOLDD+ (Niton), mostrado en la Figura 40. Aunque con él pueden llevarse a cabo análisis *in-situ*, las medidas que competen en esta Tesis Doctoral fueron realizadas en el laboratorio, por lo que se empleó un soporte con protección de plomo que cuenta con la pertinente homologación del Consejo de Seguridad Nuclear para evitar cualquier posible dispersión de la radiación. La muestra se coloca dentro de la cavidad y queda completamente cerrada y aislada durante el análisis.



**Figura 40.** Analizador portátil de fluorescencia de Rayos X de dispersión de energías XL3t GOLDD+ (Niton) del grupo de investigación FQM-363 de la Universidad de Jaén y su posición cuando se coloca en el stand de plomo.

El equipo dispone de un colimador de haz para reducir el área de estudio de 8 a 3 mm (*small spot*). Esta opción fue la elegida en las medidas realizadas para esta Tesis, que se registraron con el modo “*mining*”, el cual realiza cuatro barridos (*scans*) con filtros que emiten a distintas energías: 40 kV (*main*), 30 kV (*high*), 20 kV (*low*) y 10 kV (*light*). Esto permite detectar los siguientes elementos: Sn, Cd, Pd, Ag, Mo, Zr, Sr, Bi, As, Se, Au, Pb, W, Zn, Cu, Ni, Co, Fe, Mn, Cr, V, Ti, Ca, K, Al, P, Si, Cl, S y Mg.

***e) Microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de dispersión de energía (SEM-EDX)***

La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) proporciona imágenes de alta resolución en blanco y negro mediante el barrido e interacción de un haz de electrones enfocado sobre la superficie de la muestra. Al acoplarse a un analizador de dispersión de energías de rayos X (EDX), se consigue la

información elemental y de tipo cuantitativa de la distribución espacial de los componentes de la muestra.

Con esta técnica se realizaron mapeos sobre las muestras sólidas en forma de pastillas de distintas calidades del pigmento azul ultramar. Para ello se utilizó el microscopio electrónico FEI Quanta 200 (Figura 41) acoplado a un espectroscopio EDAX. Las medidas de mapeos realizadas cuentan con un área de análisis de  $597\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$  y se utilizó una magnificación de 500X.

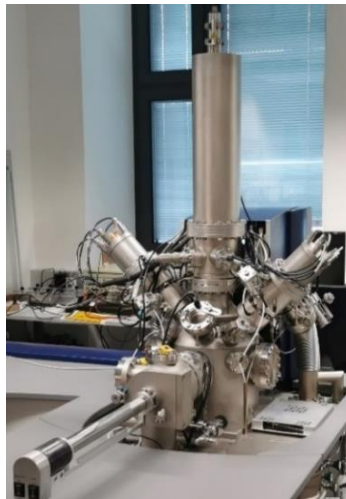


**Figura 41.** Instrumentación de microscopía electrónica de barrido FEI Quanta 200 (FELMI-ZFE) de la Universidad Técnica de Viena, Austria

### ***f) Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS)***

Está considerada una de las técnicas de análisis elemental con mayor rango de sensibilidad (pudiendo alcanzar los ppb para la mayoría de elementos). Además, también proporciona información isotópica y de carácter molecular de las capas más superficiales de la muestra. Consiste en el análisis, mediante un espectrómetro de masas, de la emisión de iones secundarios de la superficie de una sustancia sólida como consecuencia de su interacción con

una fuente de iones primarios poco energéticos. En este trabajo se utilizó para complementar la información elemental e isotópica, ya que permite el análisis de la distribución espacial de elementos traza en la superficie de la zona de muestra deseada. Se empleó un espectrómetro TOF.SIMS<sup>5</sup> (Figura 42) sobre un área de muestra de 500  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$ , empleando 32 acumulaciones por píxel.



**Figura 42.** Instrumentación de espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo TOF.SIMS<sup>5</sup> (ION-TOF GmbH) de la Universidad Técnica de Viena, Austria

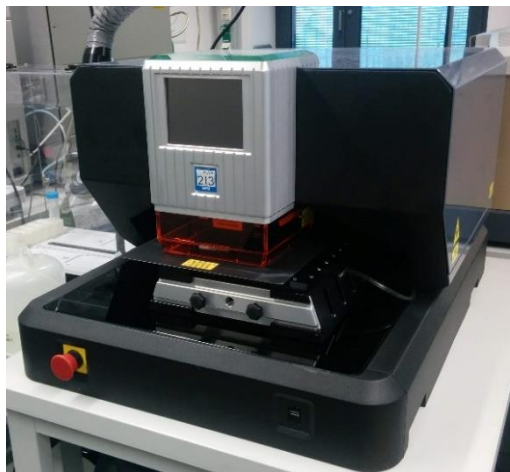
***g) Espectrometría de Masas con Plasma acoplado inductivamente y Ablación Láser (LA-ICP-MS)***

Con esta técnica se pueden conseguir análisis elementales e isotópicos rápidos y con una muy elevada sensibilidad (rangos de ppb) en muestras sólidas sin apenas tratamiento previo. Utiliza un haz láser que interacciona con la superficie de la muestra resultando en un proceso que involucra etapas de calentamiento, evaporación e ionización (ablación láser) de la materia. Las partículas e iones generados son transportados hasta un sistema de

espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) mediante una corriente de argón. En este sistema, los iones son separados en función de su relación masa/carga.

En esta Tesis se ha empleado el sistema de ablación láser NWR213 con un láser Nd:YAG de 213 nm acoplado a un Thermo iCAPQc como instrumentación ICP-MS (Figura 43). Se analizó un área de muestra de 1,5 mm x 0,96 mm, utilizando un diámetro del haz láser de 8 µm. Los elementos finalmente seleccionados para el análisis, tras varias pruebas en las que se descartaron aquellos con una intensidad demasiado baja, fueron  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{39}\text{K}$ ,  $^{141}\text{Pr}$ ,  $^{152}\text{Sm}$  y  $^{174}\text{Nd}$ .

Al producir la ablación y destrucción de la muestra, esta técnica fue usada en último lugar en los análisis de las pastillas sólidas de pigmentos azul ultramar.



**Figura 43.** Instrumentación de ablación láser NWR213 (ESI, Elemental Scientific Lasers) de la Universidad Técnica de Viena, Austria

### 3.2.4 Herramientas de software y quimiometría

En relación a las aplicaciones de software utilizadas, se ha requerido el uso de diversos programas informáticos y softwares especialmente diseñados para la adquisición, evaluación y procesamiento de resultados a partir de imágenes hiperespectrales. Éstos han consistido tanto en programas implementados por la propia casa comercial del equipo en cuestión, como en soportes informáticos compatibles con datos obtenidos a partir de cualquier técnica analítica.

Entre los primeros destacan: SpectraManager de Jasco (para el tratamiento de imágenes de infrarrojo), así como LabSpec6 (Horiba), WireInterface (Renishaw) y WITec Suite Control Five (WITec) para espectroscopía Raman.

En el caso de soportes especialmente planeados para la importación de cualquier resultado derivado de imágenes hiperespectrales (pudiendo alinear datos espectrales y espaciales desde archivos independientes) se ha hecho uso del programa Epina ImageLab (Epina GmbH<sup>203</sup>). Además, este software también posibilita la combinación en un único archivo editable de distintas medidas hiperespectrales realizadas mediante diferentes técnicas de análisis sobre la misma muestra (misma zona de análisis, misma imagen visible).

Por otro lado, para los análisis de tipo quimiométrico se ha utilizado, en mayor medida, el programa MATLAB versión 7.10.0 (R2010a) junto con la Toolbox de PLS, disponible virtualmente en la Universidad de Jaén. En otras ocasiones, se han podido realizar cálculos de este tipo en el mismo software del equipo en el que se registran las imágenes, como por ejemplo SpectraManager de Jasco. También se utilizó el software ImageLab para los análisis multivariantes procedentes de datos obtenidos con el sistema de medidas Raman en modo *stand-off* y para el alineamiento y combinación de datos procedentes de distintas técnicas analíticas.



## 4. BIBLIOGRAFÍA

---



## 4. Bibliografía

En este apartado se incluyen todas las referencias bibliográficas empleadas durante los capítulos 1-4.

1. Amigo JM. *Hyperspectral Imaging* . Vol 32. Elsevier. Amsterdam: Elsevier; 2019.
2. Grahn HF, Geladi P. *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*. Vol 22. Wiley, New York; 2007.
3. ElMasry GM, Nakauchi S. Image analysis operations applied to hyperspectral images for non-invasive sensing of food quality - A comprehensive review. *Biosyst Eng*. 2016;142:53-82.
4. Amigo JM. Hyperspectral and multispectral imaging: setting the scene. In: *Data Handling in Science and Technology*. Vol 32. Elsevier Ltd; 2020:3-16.
5. ElMasry G, Sun DW. Principles of Hyperspectral Imaging Technology. In: *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier Inc.; 2010:3-43.
6. Viera-González PM. Estudio del acoplamiento de un colector solar con fibras ópticas plásticas para la iluminación de interiores, Tesis Doctoral, 2014.
7. Grajido W, Pirc J, Selby N, Molina D. Signal-to-Noise Ratio. *Blackbatonomics*. 2013;36:45-55.
8. Qin J. Hyperspectral Imaging Instruments. In: *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*. Vol 5. Elsevier Inc.; 2010:129-172.
9. Adão T, Hruška J, Pádua L, et al. Hyperspectral imaging: A review on UAV-based sensors, data processing and applications for agriculture and forestry. *Remote Sens*. 2017;9:1110.
10. Garini Y, Young IT, McNamara G. Spectral imaging: Principles and applications. *Cytom Part A*. 2006;69(8):735-747.
11. Salzer R, Siesler HW. *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging: Second Edition*. Wiley Blackwell; 2014.
12. Fowler JE. Compressive pushbroom and whiskbroom sensing for hyperspectral remote-sensing imaging. In: *2014 IEEE International Conference on Image Processing, ICIP 2014*. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.; 2014:684-688.

13. Wu D, Sun D-W. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review — Part II: Applications. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2013;19:15-28.
14. Song Y, Djermoune EH, Chen J, Richard C, Brie D. Online deconvolution for pushbroom hyperspectral imaging systems. In: *2017 IEEE 7th International Workshop on Computational Advances in Multi-Sensor Adaptive Processing, CAMSAP 2017*. Vol 17. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.; 2018:1-5.
15. Liu Z, Yu H, MacGregor JF. Standardization of line-scan NIR imaging systems. *J Chemom*. 2007;21(3-4):88-95.
16. Hsu YJ, Chen C-C, Huang C-H, Yeh C-H, Liu L-Y, Chen S-Y. Line-scanning hyperspectral imaging based on structured illumination optical sectioning. *Biomed Opt Express*. 2017;8:3005-3016.
17. Amigo JM, Grassi S. Configuration of hyperspectral and multispectral imaging systems. In: *Data Handling in Science and Technology*. Vol 32. Elsevier Ltd; 2020:17-34.
18. Chen Y-R, Huffman RW, Park B, Nguyen M. Transportable Spectrophotometer System for On-Line Classification of Poultry Carcasses. *Appl Spectrosc*. 1996;50:910-916.
19. Mehl PM, Chen YR, Kim MS, Chan DE. Development of hyperspectral imaging technique for the detection of apple surface defects and contaminations. *J Food Eng*. 2004;61:67-81.
20. Manley M, Williams P, Nilsson D, Geladi P. Near infrared hyperspectral imaging for the evaluation of endosperm texture in whole yellow maize (*Zea mays* L.) Kernels. *J Agric Food Chem*. 2009;57:8761-8769.
21. Lu Y, Huang Y, Lu R. Innovative hyperspectral imaging-based techniques for quality evaluation of fruits and vegetables: A review. *Appl Sci*. 2017;7(2):189-198.
22. Grusche S. Basic slit spectroscope reveals three-dimensional scenes through diagonal slices of hyperspectral cubes. *Appl Opt*. 2014;53:4594-4601.
23. Chen YR, Chao K, Kim MS. Machine vision technology for agricultural applications. In: *Computers and Electronics in Agriculture*. Vol 36. Elsevier; 2002:173-191.
24. Hagen N, Kudenov MW. Review of snapshot spectral imaging technologies. *Opt Eng*. 2013;52:090901.

25. Al-Sarayreh M, Reis MM, Yan WQ, Klette R. Potential of deep learning and snapshot hyperspectral imaging for classification of species in meat. *Food Control*. 2020;117:107332.
26. Salzer R, Siesler HW. *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. Wiley-VCH. (Technische Universität Dresden, Inst. f. Physikalische Chemie, Department of Physical Chemistry U of D-E, ed.). Germany: Wiley-VCH; 2009.
27. ElMasry G, Sun DW. Principles of Hyperspectral Imaging Technology. In: *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*. Vol 2. Elsevier Inc.; 2010:3-43.
28. Xing J, Ngadi M, Wang N, De Baerdemaeker J. Wavelength Selection for Surface Defects Detection on Tomatoes by Means of a Hyperspectral Imaging System. In: American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2006:1-6.
29. Collins W, Sheng-Huei Chang, Raines G, Canney F, Ashley R. Airborne biogeophysical mapping of hidden mineral deposits. *Econ Geol*. 1983;78:737-749. d
30. Goetz AFH, Vane G, Solomon JE, Rock BN. Imaging spectrometry for earth remote sensing. *Science (80- )*. 1985;228:1147-1153.
31. Green RO, Eastwood ML, Sarture CM, et al. Imaging spectroscopy and the Airborne Visible/Infrared Imaging Spectrometer. *Remote Sens Environ*. 1998;65:227-248.
32. Treitz PM, Howarth PJ. Hyperspectral remote sensing for estimating biophysical parameters of forest ecosystems. *Prog Phys Geogr*. 1999;23:359-390.
33. Stuart MB, McGonigle AJS, Willmott JR. Hyperspectral imaging in environmental monitoring: A review of recent developments and technological advances in compact field deployable systems. *Sensors* . 2019;19:3071-3079.
34. Kunkel B, Blechinger F, Lutz R, Doerffer R, van der Piepen H, Schroder M. ROSIS (Reflective Optics System Imaging Spectrometer) - A Candidate Instrument For Polar Platform Missions. In: Bowyer CS, Seeley JS, eds. *Optoelectronic Technologies for Remote Sensing from Space*. SPIE; 1988:134-138.
35. Mazer AS, Martin M, Lee M, Solomon JE. Image processing software for imaging spectrometry data analysis. *Remote Sens Environ*. 1988;24:201-210.

36. Shimoni M, Haelterman R, Perneel C. Hyperspectral imaging for military and security applications: Combining Myriad processing and sensing techniques. *IEEE Geosci Remote Sens Mag.* 2019;7:101-117.
37. He L, Quan P, Wei D, Yuan-qing L. Research Advance on Target Detection for Hyperspectral Imagery. *Acta Electron Sin.* 2009;37:2016-2024.
38. Ivanco T, Achal S, McFee JE, Anger C, Young J. Real-time airborne hyperspectral imaging of land mines. In: *Detection and Remediation Technologies for Mines and Minelike Targets XII*. Vol 63. SPIE; 2007:655315.
39. McGregor RD, Nguyen MH, Robinson IS, et al. Target detection using HSI systems: an update of TRW results. In: Descour MR, Shen SS, eds. *Imaging Spectrometry IV*. Vol 34. SPIE; 1998:57.
40. Akbari Lakeh M, Tu A, Muddiman DC, Abdollahi H. Discriminating normal regions within cancerous hen ovarian tissue using multivariate hyperspectral image analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2019;33:381-391.
41. Nakaya D, Tsutsumiuchi A, Satori S, et al. Digital pathology with hyperspectral imaging for colon and ovarian cancer. In: *Digital Pathology*. SPIE-Intl Soc Optical Eng; 2019:31-36.
42. Eberlin LS, Norton I, Dill AL, et al. Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry. *Cancer Res.* 2012;72:645-654.
43. Gowen AA, Feng Y, Gaston E, Valdramidis V. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta.* 2015;137:43-54.
44. Piqueras S, Krafft C, Beleites C, et al. Combining multiset resolution and segmentation for hyperspectral image analysis of biological tissues. *Anal Chim Acta.* 2015;881:24-36.
45. Wang Y, Soetikno B, Furst J, Raicu D, Fawzi AA. Drusen diagnosis comparison between hyper-spectral and color retinal images. *Biomed Opt Express.* 2019;10:930.
46. Li H, Liu W, Dong B, Kaluzny J V., Fawzi AA, Zhang HF. Snapshot hyperspectral retinal imaging using compact spectral resolving detector array. *J Biophotonics.* 2017;10:830-839.
47. Lu B, Dao PD, Liu J, He Y, Shang J. Recent advances of hyperspectral imaging technology and applications in agriculture. *Remote Sens.* 2020;12:2659-2667.

48. Mahesh S, Jayas DS, Paliwal J, White NDG. Hyperspectral imaging to classify and monitor quality of agricultural materials. *J Stored Prod Res.* 2015;61:17-26.
49. Rady AM, Guyer DE, Kirk W, Donis-González IR. The potential use of visible/near infrared spectroscopy and hyperspectral imaging to predict processing-related constituents of potatoes. *J Food Eng.* 2014;135:11-25.
50. Mahesh S, Jayas DS, Paliwal J, White NDG. Identification of wheat classes at different moisture levels using near-infrared hyperspectral images of bulk samples. *Sens Instrum Food Qual Saf.* 2011;5:1-9.
51. Puschell JJ. Hyperspectral imagers for current and future missions. In: *Visual Information Processing IX.* Vol 4041. SPIE; 2000:121-132.
52. Román-González A, Vargas-Cuentas NI. Análisis de Imágenes Hiperespectrales. *Ing y Desarro.* 2013;35:14-17.
53. Cosentino A. Multispectral imaging and the art expert. *Spectrosc Eur.* 2015;27:6-9.
54. AECC - Asociación Española de Comunicación Científica - Comunicación y divulgación científica | AECC – Asociación Española de Comunicación Científica.
55. Rapuc W, Jacq K, Develle AL, et al. XRF and hyperspectral analyses as an automatic way to detect flood events in sediment cores. *Sediment Geol.* 2020;409:105776.
56. Gardner W, Cutts SM, Muir BW, Jones RT, Pigram PJ. Visualizing ToF-SIMS Hyperspectral Imaging Data Using Color-Tagged Toroidal Self-Organizing Maps. *Anal Chem.* 2019;91:13855-13865.
57. Gardner W, Cutts SM, Phillips DR, Pigram PJ. Understanding mass spectrometry images: complexity to clarity with machine learning. *Biopolymers.* 2020;Paper in p:1-17.
58. Nohl JF. Secondary electron hyperspectral imaging: nanostructure and chemical analysis for the LV-SEM. *Mater Sci Technol.* 2020;36:527-539.
59. Bellon-Maurel V, Gorretta N. NIR Hyperspectral Imaging for Food and Agricultural Products. In: *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging: Second Edition.* Vol 97. Wiley Blackwell; 2014:295-338.
60. Roggo Y, Edmond A, Chalus P, Ulmschneider M. Infrared hyperspectral imaging for qualitative analysis of pharmaceutical solid forms. *Anal Chim Acta.* 2005;535:79-87.

61. Ito G, Rogers AD, Young KE, et al. Incorporation of Portable Infrared Spectral Imaging Into Planetary Geological Field Work: Analog Studies at Kīlauea Volcano, Hawaii, and Potrillo Volcanic Field, New Mexico. *Earth Sp Sci*. 2018;5:676-696.
62. Zhao X, Wang W, Ni X, Chu X, Li YF, Sun C. Evaluation of near-infrared hyperspectral imaging for detection of peanut and walnut powders in whole wheat flour. *Appl Sci*. 2018;8:1076.
63. Esquerre CA, Achata EM, García-Vaquero M, Zhang Z, Tiwari BK, O'Donnell CP. Use of an NIR MEMS spectrophotometer and visible/NIR hyperspectral imaging systems to predict quality parameters of treated ground peppercorns. *LWT*. 2020;131:109761.
64. Bai SH, Tahmasbian I, Zhou J, et al. A non-destructive determination of peroxide values, total nitrogen and mineral nutrients in an edible tree nut using hyperspectral imaging. *Comput Electron Agric*. 2018;151:492-500.
65. Chen J, Chen H, Wang X, Yu C, Wang C, Zhu D. The characteristic of hyperspectral image of wheat seeds during sprouting. In: *IFIP Advances in Information and Communication Technology*. Vol 419. Springer New York LLC; 2014:408-421.
66. Malegori C, Grassi S, Marques EJM, Freitas ST de, Casiraghi E. Vitamin C distribution in acerola fruit by near infrared hyperspectral imaging. *J Spectr Imaging*. 2016;5:a6.
67. Mellors BOL, Spear AM, Howle CR, Curtis K, Macildowie S, Dehghani H. Machine learning utilising spectral derivative data improves cellular health classification through hyperspectral infra-red spectroscopy. *PLoS One*. 2020;15:e0238647.
68. Retzmann A, Blanz M, Zitek A, et al. A combined chemical imaging approach using (MC) LA-ICP-MS and NIR-HSI to evaluate the diagenetic status of bone material for Sr isotope analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411:565-580.
69. Palombo F, Masia F, Mattana S, et al. Hyperspectral analysis applied to micro-Brillouin maps of amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease brains. *Anahyst*. 2018;143:6095-6102.
70. Wander L, Vianello A, Vollertsen J, Westad F, Braun U, Paul A. Exploratory analysis of hyperspectral FTIR data obtained from environmental microplastics samples. *Anal Methods*. 2020;12:781-791.

71. Araya JA, Carneiro RL, Freer J, Neira JY, Castillo R del P. Fourier transform infrared imaging and quantitative analysis of pre-treated wood fibers: A comparison between partial least squares and multivariate curve resolution with alternating least squares methods in a case study. *Chemom Intell Lab Syst.* 2019;195:103980.
72. Pudelko A, Chodak M, Roemer J, Uhl T. Application of FT-NIR spectroscopy and NIR hyperspectral imaging to predict nitrogen and organic carbon contents in mine soils. *Meas J Int Meas Confed.* 2020;164:108117.
73. Picollo M, Cucci C, Casini A, Stefani L. Hyper-spectral imaging technique in the cultural heritage field: New possible scenarios. *Sensors.* 2020;20:2843.
74. Fischer C, Kakoulli I. Multispectral and hyperspectral imaging technologies in conservation: current research and potential applications. *Stud Conserv.* 2006;51:3-16.
75. Rosi F, Miliani C, Braun R, et al. Noninvasive analysis of paintings by mid-infrared hyperspectral imaging. *Angew Chemie - Int Ed.* 2013;52:5258-5261.
76. Cucci C, Delaney JK, Picollo M. Reflectance Hyperspectral Imaging for Investigation of Works of Art: Old Master Paintings and Illuminated Manuscripts. *Acc Chem Res.* 2016;49:2070-2079.
77. Biron C, Mounier A, Le Bourdon G, Servant L, Chapoulie R, Daniel F. A blue can conceal another! Noninvasive multispectroscopic analyses of mixtures of indigo and Prussian blue. *Color Res Appl.* 2020;45:262-274.
78. Miliani C, Rosi F, Daveri A, Brunetti BG. Reflection infrared spectroscopy for the non-invasive in situ study of artists' pigments. *Appl Phys A Mater Sci Process.* 2012;106:295-307.
79. Rosi F, Federici A, Brunetti BG, Sgamellotti A, Clementi S, Miliani C. Multivariate chemical mapping of pigments and binders in easel painting cross-sections by micro IR reflection spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399:3133-3145.
80. de Viguerie L, Pladevall NO, Lotz H, et al. Mapping pigments and binders in 15th century Gothic works of art using a combination of visible and near infrared hyperspectral imaging. *Microchem J.* 2020;155:104674.
81. Delaney JK, Zeibel JG, Thoury M, et al. Visible and infrared imaging spectroscopy of picasso's harlequin musician: Mapping and identification

- of artist materials in situ. *Appl Spectrosc.* 2010;64:584-594.
82. Nogales-Bueno J, Feliz L, Baca-Bocanegra B, et al. Comparative study on the use of three different near infrared spectroscopy recording methodologies for varietal discrimination of walnuts. *Talanta.* 2020;206:120189.
  83. Mitsutake H, Poppi RJ, Breitreitz MC. Raman imaging spectroscopy: History, fundamentals and current scenario of the technique. *J Braz Chem Soc.* 2019;30:2243-2258.
  84. Käppler A, Fischer D, Oberbeckmann S, et al. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Anal Bioanal Chem.* 2016;408:8377-8391.
  85. Deng S, Liu L, Liu Z, Shen Z, Li G, He Y. Line-scanning Raman imaging spectroscopy for detection of fingerprints. *Appl Opt.* 2012;51:3701-3706.
  86. Schulze HG, Turner RFB. A two-dimensionally coincident second difference cosmic ray spike removal method for the fully automated processing of Raman spectra. *Appl Spectrosc.* 2014;68:185-191.
  87. Netchacovitch L, De Bleye C, Chavez P, Sacré P, Hubert P, Ziemons E. Raman hyperspectral imaging: a single tool to characterise pharmaceutical products. *Eur Pharm Rev.* 2014;19:8-11.
  88. Rebiere H, Ghyselinck C, Lempereur L, Brenier C. Investigation of the composition of anabolic tablets using near infrared spectroscopy and Raman chemical imaging. *Drug Test Anal.* 2016;8:370-377.
  89. Song SW, Kim J, Eum C, et al. Hyperspectral Raman Line Mapping as an Effective Tool to Monitor the Coating Thickness of Pharmaceutical Tablets. *Anal Chem.* 2019;91:5810-5816.
  90. Farkas A, Nagy B, Marosi G. Quantitative evaluation of drug distribution in tablets of various structures via Raman mapping. *Period Polytech Chem Eng.* 2018;62:1-7. d
  91. Coic L, Sacré PY, Dispas A, et al. Comparison of hyperspectral imaging techniques for the elucidation of falsified medicines composition. *Talanta.* 2019;198:457-463.
  92. Jestel NL, Shaver JM, Morris MD. Hyperspectral Raman line imaging of an aluminosilicate glass. *Appl Spectrosc.* 1998;52:64-69.
  93. Débarre A, Jaffiol R, Richard A, Tchénio P. Raman hyperspectral imaging applied to chemical co-localization in diluted samples of perylene-doped

- nanotubes. *Chem Phys Lett.* 2002;366:274-278.
94. Tuschel D. Raman imaging of silicon structures. *Spectrosc (Santa Monica)*. 2013;28:9-12.
  95. Lee H, Kim MS, Qin J, et al. Raman hyperspectral imaging for detection of watermelon seeds infected with *Acidovorax citrulli*. *Sensors (Switzerland)*. 2017;17:2165.
  96. Wang X, Huang W, Wang Q, et al. Raman hyperspectral image analysis of benzoyl peroxide additive. *J Mol Struct.* 2017;1138:6-11.
  97. Qin J, Kim MS, Chao K, Chan DE, Delwiche SR, Cho BK. Line-scan hyperspectral imaging techniques for food safety and quality applications. *Appl Sci.* 2017;7:125-133.
  98. Sharikova A, Foraida ZI, Sfakis L, et al. Characterization of nanofibers for tissue engineering: Chemical mapping by Confocal Raman microscopy. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2020;227:117670.
  99. Imiela A, Surmacki J, Abramczyk H. Novel strategies of Raman imaging for monitoring the therapeutic benefit of temozolomide in glioblastoma. *J Mol Struct.* 2020;1217:128381.
  100. Wang P, Anderson EJD, Muller EA, Gao F, Zhong Y, Raschke MB. Hyper-spectral Raman imaging correlating chemical substitution and crystallinity in biogenic hydroxyapatite: Dentin and enamel in normal and hypoplastic human teeth. *J Raman Spectrosc.* 2018;49:1559-1567.
  101. Böhme N, Hauke K, Neuroth M, Geisler T. In situ hyperspectral raman imaging of ternesite formation and decomposition at high temperatures. *Minerals.* 2020;10:1-18.
  102. Wang X, Zhao C, Huang W, Wang Q, Liu C, Yang G. Effective detection of benzoyl peroxide in flour based on parameter selection of Raman hyperspectral system. *Spectrosc Lett.* 2017;50:364-369.
  103. Eksi-Kocak H, Menten-Yilmaz O, Boyaci IH. Detection of green pea adulteration in pistachio nut granules by using Raman hyperspectral imaging. *Eur Food Res Technol.* 2016;242:271-277.
  104. Madariaga JM. Raman spectroscopy in art and archaeology. *J Raman Spectrosc.* 2010;41:1389-1393.
  105. Bellot-Gurlet L, Pagès-Camagna S, Couprie C. Raman spectroscopy in art and archaeology. In: *Journal of Raman Spectroscopy*. Vol 37. ; 2006:962-965.

106. Howell G.M. Edwards. Raman Spectroscopy in Art and Archaeology: A New Light on Historical Mysteries. In: *Frontiers of Molecular Spectroscopy*. Elsevier; 2009:133-173.
107. Bersani D, Conti C, Matousek P, Pozzi F, Vandenabeele P. Methodological evolutions of Raman spectroscopy in art and archaeology. *Anal Methods*. 2016;8:8395-8409.
108. Arjonilla P, Domínguez-Vidal A, Correa-Gómez E, Domene-Ruiz MJ, Ayora-Cañada MJ. Raman and Fourier transform infrared microspectroscopies reveal medieval Hispano–Muslim wood painting techniques and provide new insights into red lead production technology. *J Raman Spectrosc*. 2019;50:1537-1545.
109. De La Torre-López MJ, Dominguez-Vidal A, Campos-Suñol MJ, Rubio-Domene R, Schade U, Ayora-Cañada MJ. Gold in the Alhambra: Study of materials, technologies, and decay processes on decorative gilded plasterwork. *J Raman Spectrosc*. 2014;45:1052-1058.
110. Floréal, Daniel, Mounier A, Pérez-Arantegui J, et al. Comparison between non-invasive methods used on paintings by Goya and his contemporaries: hyperspectral imaging vs. point-by-point spectroscopic analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409:4047-4056.
111. Janssens K, Van der Snickt G, Vanmeert F, et al. Non-Invasive and Non-Destructive Examination of Artistic Pigments, Paints, and Paintings by Means of X-Ray Methods. *Top Curr Chem*. 2016;374:81.
112. Maybury IJ, Howell D, Terras M, Viles H. Comparing the effectiveness of hyperspectral imaging and Raman spectroscopy: a case study on Armenian manuscripts. *Herit Sci*. 2018;6:42.
113. Lau D, Willis C, Furman S, Livett M. Multispectral and hyperspectral image analysis of elemental and micro-Raman maps of cross-sections from a 16th century painting. *Anal Chim Acta*. 2008;610(1):15-24.
114. Goyal AK, Wood D, Lee V, et al. Laser-based long-wave-infrared hyperspectral imaging system for the standoff detection of trace surface chemicals. *Opt Eng*. 2020;59:092003.
115. Breshike CJ, Kendziora CA, Furstenberg R, et al. Hyperspectral imaging using active infrared backscatter spectroscopy for detection of trace explosives. *Opt Eng*. 2020;59:1.
116. Guo K, Zhai T, Demory B, et al. Stand-off non-destructive determination of protein level in wheat flour with a super-continuum laser. In: *Progress*

- in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*. Intl Soc Optical Eng; 2020:30.
117. Sharma RC, Kumar S, Kumar S, Mann M, Mayank, Sharma M. Photoacoustic remote sensing of suspicious objects for defence and forensic applications. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2020;224:117445.
  118. Dell'Aglio M, López-Claros M, Laserna JJ, Longo S, De Giacomo A. Stand-off laser induced breakdown spectroscopy on meteorites: calibration-free approach. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc*. 2018;147:87-92.
  119. Cabalín LM, Delgado T, Ruiz J, Mier D, Laserna JJ. Stand-off laser-induced breakdown spectroscopy for steel-grade intermix detection in sequence casting operations. At-line monitoring of temporal evolution versus predicted mathematical model. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc*. 2018;146:93-100.
  120. Li WT, Zhu YN, Li X, et al. In situ classification of rocks using stand-off laser-induced breakdown spectroscopy with a compact spectrometer. *J Anal At Spectrom*. 2018;33:461-467.
  121. Delgado T, Ruiz J, Cabalín LM, Laserna JJ. Distinction strategies based on discriminant function analysis for particular steel grades at elevated temperature using stand-off LIBS. *J Anal At Spectrom*. 2016;31:2242-2252.
  122. Dwivedi Y. Concept and applications of standoff Raman spectroscopy techniques. In: *Molecular and Laser Spectroscopy*. Elsevier; 2020:483-520.
  123. Hobro AJ, Lendl B. Stand-off Raman spectroscopy. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2009;28:1235-1242.
  124. Cooney J. Remote sensing of the Earth. In: *Proceedings of the Symposium on Electromagnetic Sensing of the Earth from Satellites*. New York: Brooklyn Polytechnic Press; 1965:254-259.
  125. Angel SM, Kulp TJ, Vess TM. Remote-Raman Spectroscopy at Intermediate Ranges Using Low-Power cw Lasers. *Appl Spectrosc*. 1992;46:1085-1091.
  126. Zachhuber B, Ramer G, Hobro A, Chrysostom ETH, Lendl B. Stand-off Raman spectroscopy: A powerful technique for qualitative and quantitative analysis of inorganic and organic compounds including explosives. *Anal Bioanal Chem*. 2011;400:2439-2447.

127. Gasser C, Göschl M, Ofner J, Lendl B. Stand-off Hyperspectral Raman Imaging and Random Decision Forest Classification: A Potent Duo for the Fast, Remote Identification of Explosives. *Anal Chem.* 2019;91:7712-7718.
128. Misra AK, Sharma SK, Acosta TE, Porter JN, Bates DE. Single-pulse standoff Raman detection of chemicals from 120 m distance during daytime. *Appl Spectrosc.* 2012;66:1279-1285.
129. Van Neste CW, Senesac LR, Thundat T. Standoff spectroscopy of surface adsorbed chemicals. *Anal Chem.* 2009;81:1952-1956.
130. Chen T, Madey JMJ, Price FM, Sharma SK, Lienert B. Remote Raman spectra of benzene obtained from 217 meters using a single 532 nm laser pulse. *Appl Spectrosc.* 2007;61:624-629.
131. Acosta-Maeda TE, Misra AK, Muzangwa LG, et al. Remote Raman measurements of minerals, organics, and inorganics at 430 m range. *Appl Opt.* 2016;55:10283-10289.
132. Choi SK, Jeong YS, Koh YJ, Lee JH, Kim S. Detection of Toxic Chemicals on Ground by Stand-off Raman Spectroscopy. *Bull Korean Chem Soc.* 2019;40:483-484.
133. Chung JH, Cho SG. Standoff raman spectroscopic detection of explosive molecules. *Bull Korean Chem Soc.* 2013;34:1668-1672.
134. Moros J, Lorenzo JA, Novotný K, Laserna JJ. Fundamentals of stand-off Raman scattering spectroscopy for explosive fingerprinting. *J Raman Spectrosc.* 2013;44:121-130.
135. Moros J, Lorenzo JA, Lucena P, Miguel Tobaría L, Laserna JJ. Simultaneous Raman Spectroscopy–Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Instant Standoff Analysis of Explosives Using a Mobile Integrated Sensor Platform. *Anal Chem.* 2010;82:1389-1400.
136. Sharma RC, Kumar D, Bhardwaj N, Gupta S, Chandra H, Maini AK. Portable detection system for standoff sensing of explosives and hazardous materials. *Opt Commun.* 2013;309:44-49.
137. Ramirez ML, Ortiz W, Ruiz O, Pacheco-Londoño L, Hernández-Rivera SP. Detection of hazardous liquids concealed in glass, plastic, and aluminum containers. In: *Sensors, and Command, Control, Communications, and Intelligence (C3I) Technologies for Homeland Security and Homeland Defense VI.* Vol 6538. SPIE; 2007:653827.

138. Zachhuber B, Gasser C, Hobro AJ, Chrysostom E t. H, Lendl B. Stand off spatial offset Raman spectroscopy: a distant look behind the scenes. In: *Optics and Photonics for Counterterrorism and Crime Fighting VII; Optical Materials in Defence Systems Technology VIII; and Quantum-Physics-Based Information Security*. Vol 8189. SPIE; 2011:818904.
139. Zachhuber B, Gasser C, Chrysostom E t. H, Lendl B. Stand-Off Spatial Offset Raman Spectroscopy for the Detection of Concealed Content in Distant Objects. *Anal Chem*. 2011;83:9438-9442. d
140. Gautam R, Oh JY, Patel RP, Dluhy RA. Non-invasive analysis of stored red blood cells using diffuse resonance Raman spectroscopy. *Analyst*. 2018;143:5950-5958.
141. Haddadi B, Gasser C, Jordan C, Harasek M, Lendl B. Simultaneous Laser Doppler Velocimetry and stand-off Raman spectroscopy as a novel tool to assess flow characteristics of process streams. *Chem Eng J*. 2018;334:123-133.
142. Farley C, Kassu A, Bose N, et al. Short Distance Standoff Raman Detection of Extra Virgin Olive Oil Adulterated with Canola and Grapeseed Oils. *Appl Spectrosc*. 2017;71:1340-1347.
143. Li YU, Cheung CS, Kogou S, Liggins F, Liang H. Standoff Raman spectroscopy for architectural interiors from 3-15 m distances. *Opt Express*. 2019;27:31338.
144. Dominguez-Vidal A, Jose De La Torre-Lopez M, Rubio-Domene R, Ayora-Cañada MJ. In situ noninvasive Raman microspectroscopic investigation of polychrome plasterworks in the Alhambra. *Analyst*. 2012;137:5763-5769.
145. Arjonilla P, Domínguez-Vidal A, de la Torre López MJ, Rubio-Domene R, Ayora-Cañada MJ. In situ Raman spectroscopic study of marble capitals in the Alhambra monumental ensemble. *Appl Phys A*. 2016;122:1014.
146. Vandenabeele P, Castro K, Hargreaves M, Moens L, Madariaga JM, Edwards HGM. Comparative study of mobile Raman instrumentation for art analysis. *Anal Chim Acta*. 2007;588:108-116.
147. Dorrepaal R, Malegori C, Gowen A. Tutorial: Time series hyperspectral image analysis. *J Near Infrared Spectrosc*. 2016;24:89-107.
148. Richards JA. Remote Sensing Digital Image Analysis. In: *Remote Sensing Digital Image Analysis*. Springer. New York: Springer; 2013:439.

149. Amigo JM, Martí I, Gowen A. Hyperspectral Imaging and Chemometrics. A Perfect Combination for the Analysis of Food Structure, Composition and Quality. In: *Data Handling in Science and Technology*. Vol 28. Elsevier Ltd; 2013:343-370.
150. Yu H, Liu H, Wang N, et al. Rapid and visual measurement of fat content in peanuts by using the hyperspectral imaging technique with chemometrics. *Anal Methods*. 2016;8:7482-7492.
151. Cheng JH, Sun DW, Pu H, Zhu Z. Development of hyperspectral imaging coupled with chemometric analysis to monitor K value for evaluation of chemical spoilage in fish fillets. *Food Chem*. 2015;185:245-253.
152. Gasser C, Göschl M, Ofner J, Lendl B. Stand-off Hyperspectral Raman Imaging and Random Decision Forest Classification: A Potent Duo for the Fast, Remote Identification of Explosives. *Anal Chem*. 2019;91:7712-7718.
153. Marcelo MCA, Soares FLF, Ardila JA, et al. Fast inline tobacco classification by near-infrared hyperspectral imaging and support vector machine-discriminant analysis. *Anal Methods*. 2019;11:1966-1975.
154. Malegori C, Alladio E, Oliveri P, et al. Identification of invisible biological traces in forensic evidences by hyperspectral NIR imaging combined with chemometrics. *Talanta*. 2020;215:120911.
155. Rebiere H, Ghyselinck C, Lempereur L, Brenier C. Investigation of the composition of anabolic tablets using near infrared spectroscopy and Raman chemical imaging. *Drug Test Anal*. 2016;8:370-377.
156. Gut Y, Boiret M, Bultel L, et al. Application of chemometric algorithms to MALDI mass spectrometry imaging of pharmaceutical tablets. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;105:91-100.
157. Catelli E, Randeberg LL, Alsberg BK, Gebremariam KF, Bracci S. An explorative chemometric approach applied to hyperspectral images for the study of illuminated manuscripts. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2017;177:69-78.
158. Capobianco G, Bracciale MP, Sali D, et al. Chemometrics approach to FT-IR hyperspectral imaging analysis of degradation products in artwork cross-section. *Microchem J*. 2017;132:69-76.
159. Ghasemzadeh-Barvarz M, Ramezani-Kakroodi A, Rodrigue D, Duchesne C. Multivariate image regression for quality control of natural

- fiber composites. *Ind Eng Chem Res.* 2013;52:12426-12436.
160. Stuart BH. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.* Sidney, Australia: Wiley; 2004.
161. Bunaciu AA, Fleschin S, Aboul-Enein HY. Biomedical Investigations Using Fourier Transform-Infrared Microspectroscopy. *Crit Rev Anal Chem.* 2014;44:270-276.
162. Bellisola G, Sorio C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res.* 2012;2:1-21.
163. Ríos Castro A, Moreno Bondi MC, Simonet Suau BM. *Técnicas Espectroscópicas En Química Analítica. Aspectos Básicos y Espectrometría Molecular.* Vol 1. Síntesis. Madrid, España: Síntesis; 2012.
164. Vandenabeele P. *Practical Raman Spectroscopy: An Introduction.* (John Wiley & Sons L, ed.); 2013.
165. Hashimoto K, Badarla VR, Kawai A, Ideguchi T. Complementary vibrational spectroscopy. *Nat Commun.* 2019;10:1-6.
166. Miller LM, Dumas P. Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758:846-857.
167. Lasch P, Naumann D. Spatial resolution in infrared microspectroscopic imaging of tissues. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758:814-829.
168. Humecki HJ. *Practical Guide to Infrared Microspectroscopy.* (Dekker M, ed.). New York: CRC Press; 1995.
169. Michelson AA. Visibility of interference-fringes in the focus of a telescope. *Philos Mag.* 1891;31:256.
170. Potter AEJ. Multispectral imaging system. 1972:702-735.
171. Šašić S, Ozaki Y. *Raman, Infrared, and Near-Infrared Chemical Imaging.* (Šašić S, Ozaki Y, eds.). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
172. Gasser C. Tunable filters in Mid-Infrared and Raman Spectroscopy, PhD Dissertation, 2019.
173. Giridhar G, Manepalli RRKN, Apparao G. Confocal Raman Spectroscopy. In: *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization.* Vol 2. Elsevier; 2017:141-161.
174. Batchelder DN, Cheng C, Müller W, Smith BJE. A compact Raman microprobe/microscope: Analysis of polydiacetylene Langmuir and

- Langmuir-Blodgett films. *Makromol Chemie Macromol Symp.* 1991;46:171-179.
175. Treado PJ, Levin IW, Lewis EN. High-Fidelity Raman Imaging Spectrometry: A Rapid Method Using an Acousto-Optic Tunable Filter. *Appl Spectrosc.* 1992;46:1211-1216.
176. RÁCZ A, Bajusz D, Héberger K. Chemometrics in Analytical Chemistry. In: *Applied Chemoinformatics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2018:471-499.
177. Olivieri AC. *Introduction to Multivariate Calibration. A Practical Approach*. Switzerland: Springer International Publishing; 2018.
178. Luthria DL, Mukhopadhyay S, Lin LZ, Harnly JM. A comparison of analytical and data preprocessing methods for spectral fingerprinting. *Appl Spectrosc.* 2011;65:250-259.
179. Yao H, Lewis D. Spectral Preprocessing and Calibration Techniques. In: *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier Inc.; 2010:45-78.
180. Park B, Chen YR, Hruschka WR, Shackelford SD, Koohmaraie M. Principal component regression of near-infrared reflectance spectra for beef tenderness prediction. *Trans Am Soc Agric Eng.* 2001;44:609-615.
181. Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. *Chemom Intell Lab Syst.* 1987;2:37-52.
182. Ríos Castro A, Moreno Bondi MC, Simonet Suau MC. *Técnicas Espectroscópicas En Química Analítica. Vol. I: Aspectos Básicos y Espectrometría Molecular*. Síntesis, Madrid, España; 2018.
183. Santos MC, Nascimento PAM, Guedes WN, Pereira-Filho ER, Filletti ÉR, Pereira FMV. Chemometrics in analytical chemistry - An overview of applications from 2014 to 2018. *Eclét Quím J.* 2019;44:11-25.
184. Lee I, Yang J. Common Clustering Algorithms. In: *Comprehensive Chemometrics*. Vol 2. Elsevier; 2009:577-618.
185. Granato D, Santos JS, Escher GB, Ferreira BL, Maggio RM. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends Food Sci Technol.* 2018;72:83-90.

186. Chylińska M, Szymańska-Chargot M, Zdunek A. Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy. *Plant Methods*. 2014;10:14.
187. Nascimento JMP, Dias JMB. Vertex component analysis: A fast algorithm to unmix hyperspectral data. *IEEE Trans Geosci Remote Sens*. 2005;43:898-910.
188. Maggiori E, Plaza A, Tarabalka Y. Models for hyperspectral image analysis: From unmixing to object-based classification. In: *Signals and Communication Technology*. Springer; 2018:37-80.
189. Ballabio D, Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. PLS-DA. *Anal Methods*. 2013;5:3790-3798.
190. Lee LC, Liong CY, Jemain AA. Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) for classification of high-dimensional (HD) data: A review of contemporary practice strategies and knowledge gaps. *Analyst*. 2018;143:3526-3539.
191. Szabó É, Gergely S, Salgó A. Linear discriminant analysis, partial least squares discriminant analysis, and soft independent modeling of class analogy of experimental and simulated near-infrared spectra of a cultivation medium for mammalian cells. *J Chemom*. 2018;32:e3005.
192. Ballabio D, Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. PLS-DA. *Anal Methods*. 2013;5:3790-3798.
193. Dardenne P, Sinnaeve G, Baeten V. Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy: Which method? *J Near Infrared Spectrosc*. 2000;8:229-237.
194. Forina M, Lanteri S, Casale M. Multivariate calibration. *J Chromatogr A*. 2007;1158:61-93.
195. Oliveri P, Simonetti R. Chemometrics for Food Authenticity Applications. In: *Advances in Food Authenticity Testing*. Elsevier Inc.; 2016:702-728.
196. Westad F, Marini F. Validation of chemometric models - A tutorial. *Anal Chim Acta*. 2015;893:14-24.
197. Feller RL. *Artists' Pigments: A Handbook of Their History and Characteristics*. Vol 2. Washington D.C.: National Gallery of Art; 1993.
198. Feller RL. *Artists' Pigments: A Handbook of Their History and Characteristics*. Vol 3. Washington D.C.: National Gallery of Art; 1997.

## Bibliografía

199. Eastaugh N, Walsh V, Chaplin T, Siddall R. *The Pigment Compendium: A Dictionary of Historical Pigments - Nicholas Eastaugh, Valentine Walsh, Tracey Chaplin, Ruth Siddall - Google Libros*. Vol I. Routledge; 1974.
200. Frison G, Brun G. Lapis lazuli, lazurite, ultramarine “blue”, and the colour term “azure” up to the 13 th century. *J Int Colour Assoc*. 2016;16:41-55.
201. Gasser C, González-Cabrera M, Ayora-Cañada MJ, Domínguez-Vidal A, Lendl B. Comparing mapping and direct hyperspectral imaging in stand-off Raman spectroscopy for remote material identification. *J Raman Spectrosc*. 2019;50:1034-1043.
202. Hunter Lab. CIE L\*a\*b\* Color Scale. Insight on color. *Apl Note*. 1996;8
203. Epina Softwareentwicklungs- und Vertriebs-GmbH. Epina Software Labs. [www.epina.at](http://www.epina.at).

## 5. DISCUSIÓN CONJUNTA DE RESULTADOS

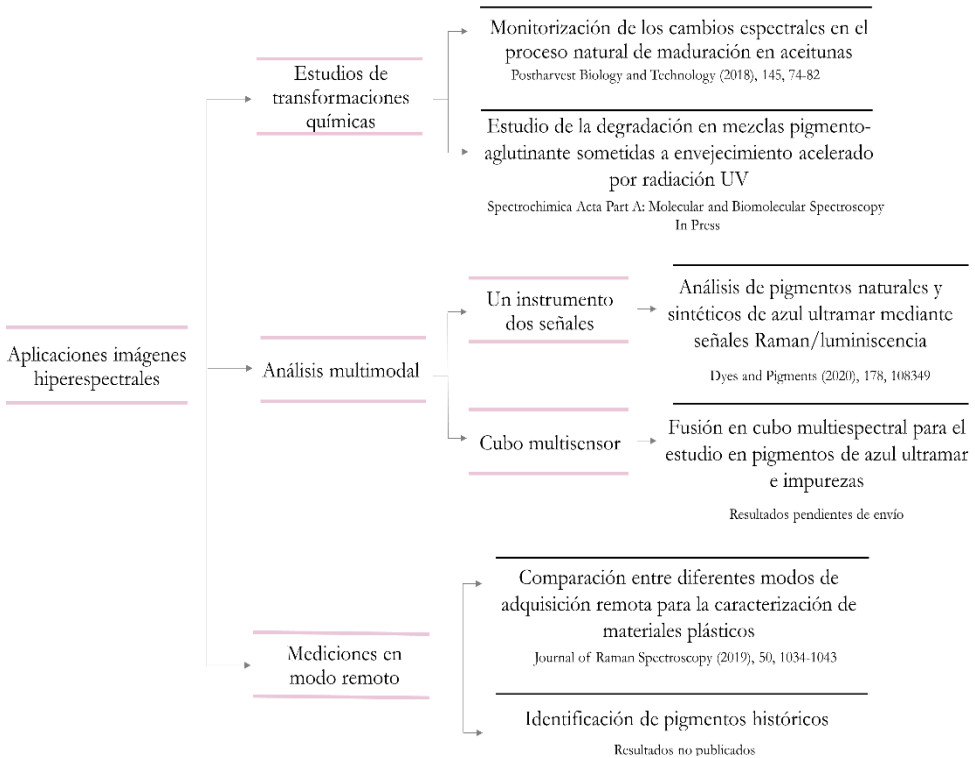
---



## 5. Discusión conjunta de resultados

En este apartado se recogen los resultados obtenidos como fruto de las investigaciones realizadas en el transcurso de la Tesis Doctoral, que se presenta por la modalidad compendio de artículos, según establece la normativa para la defensa de tesis doctorales de la Universidad de Jaén.

Todos los trabajos incluidos, así como las investigaciones en curso, han sido organizados en función de los objetivos de esta Tesis Doctoral (ver Figura 44). Cada trabajo se presenta acompañado de una breve introducción que refleja su interés y los beneficios que aporta a su análisis la adquisición de imágenes hiperespectrales, así como los principales resultados obtenidos. Además, cada uno de ellos cuenta con su propio apartado de referencias bibliográficas.



**Figura 44.** Esquema de los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral

## 5.1 Estudios de transformaciones químicas

Este apartado recoge dos trabajos dedicados al potencial de las imágenes hiperespectrales para el estudio de transformaciones químicas en procesos en evolución. Se presentan dos casos de estudio, la maduración natural de la aceituna y el envejecimiento artificial de materiales pictóricos mediante el empleo de muestras modelo. En ambos trabajos se utilizan imágenes hiperespectrales de microscopía infrarroja y se pone especial énfasis en la profundización en el conocimiento de los cambios espectrales que ocurren durante dichos procesos.

### • *Imágenes hiperespectrales de espectroscopía FTIR para el estudio del proceso de maduración de la aceituna*

El olivo (*Olea Europaea L.*) es un árbol cuya presencia es muy notable en Andalucía y, concretamente en Jaén, siendo la provincia con la mayor extensión de su cultivo en el mundo. Su fruto, la aceituna, es una drupa y consta de una semilla y tres tejidos: epicarpio (piel), mesocarpio (pulpa) y endocarpio (hueso). Al conjunto de estos tres tejidos se le conoce como pericarpio. De este fruto se obtiene el aceite de oliva, producto básico en la alimentación Mediterránea que posee innumerables beneficios para la salud, y es comúnmente recomendado por expertos en nutrición para su consumo diario.

El interés de este estudio radica en la posibilidad de determinar el momento óptimo de maduración de la aceituna, así como profundizar en los cambios químicos que se producen durante el proceso. Así, se emplearon imágenes hiperespectrales de microscopía infrarroja (FTIR) adquiridas sobre cortes transversales de aceituna conteniendo todos los tejidos de dicho fruto. Se estudia la diferenciación espectral de los mismos y se monitorizan los cambios

producidos en su composición durante el proceso de maduración. Con esta premisa, la adquisición de imágenes hiperespectrales proporciona una información más detallada sobre la distribución espacial de determinados compuestos químicos en dicho proceso. Así, se presenta una alternativa rápida y más precisa a los numerosos trabajos ya existentes en este campo, en los que únicamente se podía determinar el índice de madurez del fruto mediante la medición de propiedades colorimétricas o factores bioquímicos, tales como el grado de acidez de la aceituna o su contenido en aceite.

Aplicando herramientas quimiométricas como el análisis de componentes principales (PCA), se pudo determinar la diferenciación espacial entre dos tejidos, exocarpio y mesocarpio, pudiéndose incluso observar una zona intermedia entre ellos, la hipodermis. Cabe destacar que las características espectrales en el mesocarpio son muy semejantes a las del aceite de oliva virgen extra, y su contribución espacial aparecía heterogéneamente distribuida en dicho tejido. De hecho, podían detectarse pequeñas zonas de acumulación muy parecidas a las vacuolas, donde normalmente se forma y almacena este producto.

En el exocarpio, y principalmente en la cutícula, se observó la presencia de bandas propias de lípidos, anillos aromáticos fenólicos y ácidos carboxílicos. Por otra parte, la hipodermis se caracteriza por una composición más grasa y con mayor concentración de polisacáridos.

Se pudo establecer la diferenciación espacial de las contribuciones espectrales observadas en el fruto, lo cual hace posible discernir cada uno de los tejidos de la aceituna a nivel microscópico.

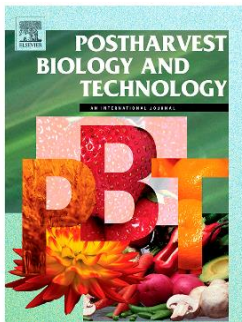
En base a la diferenciación espacial de estos tres tejidos, se construyeron modelos espectrales individuales y se sometieron a análisis quimiométricos más

## Discusión conjunta de resultados

complejos. Los resultados mostraron un gran potencial para determinar el estado de maduración en el tejido del mesocarpio, debido a la disminución en etapas finales (muestras maduras) de la concentración de polisacáridos y hemicelulosa, especialmente en el caso de la pectina. También se observó un aumento de las bandas propias de grupos carboxilatos (-COOH), atribuido a los procesos de depolimerización y des-esterificación de los polímeros presentes en las paredes celulares.

Por último, en la hipodermis se pudo discernir claramente entre las aceitunas propias de los primeros estadios del proceso y las de las etapas finales de maduración. Esto fue posible gracias a la caracterización del proceso de depolimerización de polisacáridos con la pérdida asociada de enlaces glucosídicos, observándose una disminución de las bandas espectrales de fenoles, ácidos carboxílicos y polisacáridos en frutos maduros.

### Artículo publicado



#### “Hyperspectral FTIR imaging of olive fruit for understanding ripening processes”

González-Cabrera, M., Domínguez-Vidal, A. y Ayora-Cañada, M.J.

Referencia: Postharvest Biology and Technology, 2018, 145, 74-82

### Abstract

A combination of micro-FTIR hyperspectral imaging and chemometrics is proposed to better understand biochemical changes in olive fruit during the ripening process without the need for fractionation and related analytical methods. Principal component analysis was used for the study of the spatial

distribution of vibrational spectroscopic signatures in flesh, hypodermis and epidermis tissues. Partial least squares discriminant analysis was then employed to highlight the main spectral changes related to ripening. Modifications in cell wall polysaccharides were identified as the major processes taking place during ripening in both the flesh and the hypodermis whereas olive oil accumulation was characteristic in the flesh of the fruit. Evidence of solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides as well as demethylation with the subsequent formation of carboxylate groups were found. Spectral features attributed to polyphenols and sugars also change during the ripening process. No clear temporal trends were observed in the epidermal tissues.

## **1. Introduction**

Olive fruit provides the basis for olive oil extraction and table olives pickling production in the Mediterranean countries namely. The ripening stage of the fruit influences the quality and yields in both types of production <sup>[1]</sup>. Thus, the texture of table olives is strongly affected by the firmness and ripening stage of the fruit. Oil quality progressively deteriorates with increased oxidative degradation and decreasing sensory quality, during fruit ripening <sup>[2]</sup>. Firmness of the fruit also decreases and consequently the resistance to postharvest handling. There is increasing interest for the development of methods for optimal picking date determination of olives, but most methods for evaluating maturity in olives rely almost exclusively on color changes <sup>[3]</sup>. Recently, a machine vision system has been proposed to predict in a faster, automated and more objective manner the maturity index of fruit providing results in close agreement with a visually estimated maturity index <sup>[4]</sup>. However, the optimal harvest time can be affected by many different aspects, including fruit retention force, fruit firmness, oil content, chemical composition, and sensory attributes. It is desirable therefore to rely on methods able to provide more information about the biochemical

changes the fruit undergoes during the ripening process. In this context, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is an interesting alternative because, on the one hand, it provides information at the molecular level and, on the other hand, is rapid and does not need intensive sample preparation in contrast with analytical techniques involving the extraction, fractionation and isolation of the different compounds. The technique has proven very useful for the study of many vegetable materials, including wood <sup>[5]</sup>, leaves <sup>[6]</sup> and fruit cuticles <sup>[7]</sup> as well as for the determination of antioxidants in diverse plant samples, such as grains, fruits and herbs <sup>[8,9]</sup>. FTIR spectroscopy has been effectively employed to predict quality parameters of both olives and virgin olive oils (VOO) <sup>[10]</sup>, to classify them according to geographical origin <sup>[11,12]</sup>, to detect VOO adulteration <sup>[13,14]</sup>, to evaluate VOO freshness <sup>[15]</sup>, to investigate processes of oxidation <sup>[16]</sup>, as well as to discriminate between olive cultivars <sup>[17]</sup>. With the advances in instrumentation and the coupling with microscopy, the technique has gained particular relevance in analyzing biological materials, because of the possibility of retrieving chemical and structural information at the tissue level <sup>[18]</sup>. Hyperspectral imaging is now considered as an efficient combination between spectroscopy and conventional image processing to provide spatially discriminated chemical information about complex materials <sup>[19,20]</sup>. Each pixel of the acquired image corresponds to a spectrum, allowing analysis of the structure and details of samples <sup>[21]</sup>. In plant research, hyperspectral images in both the middle and near infrared region have gained interest for the comprehensive analysis of the spatial distribution patterns of plant constituents <sup>[22]</sup>. Seeds, leaves, kernels or whole fruit have been analyzed this way <sup>[23–26]</sup>. For fruit, the detection of symptoms of disease caused by fungi <sup>[27]</sup> and insects <sup>[28]</sup>, the classification of microbial agents <sup>[29]</sup>, or the evaluation of fruit quality parameters <sup>[30,31]</sup>, are interesting applications.

In this work, we propose the use of FTIR microscopy to monitor the changes during the maturation of the olive fruit in order to get a better understanding of the processes taking place and how they are reflected in the FTIR spectral characteristics of the different parts of the fruit. The use of an accessory of attenuated total reflection (ATR) to evaluate the changes at the macro level was previously tested in our laboratory <sup>[32]</sup>. Oil accumulation in the fruit could be followed during the earlier stages of ripening, however, the changes in fruit texture with ripening lead to an anomalous behavior of the sample in contact with the ATR crystal and the strong interference of water hindered the observation of further spectral changes in the olive flesh. In this work, the combination of micro-FTIR hyperspectral imaging with appropriate chemometric tools were explored to investigate the main changes taking place during the ripening process of the olive fruit at the microscopic level. The identification of relevant spectroscopic signatures of such changes would facilitate the establishment of an alternative method much more precise than that based on color for optimizing harvest dates for olives.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Fruit samples**

‘Picual’ olive fruit (*Olea europaea* L.) without any sort of infection or physical damage were collected every week in the period from September 2015 to January 2016 (12 samples per week reaching a total of 204 olive fruits were collected and 34 hyperspectral images were recorded). This period corresponds to 19-36 weeks after full bloom (WAFB), which usually takes place around middle May. The beginning of the sampling period corresponded to fully developed olives that are still unripe. The olives were initially green but were black at the end of the

sampling period. The samples were washed with distilled water to remove dust from the surface and cryopreserved at  $-18^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2. Sample preparation**

Longitudinal slices showing both flesh (mesocarp) and skin (exocarp) were cut using a cryostat CM 1950 Leica equipped with an encapsulated microtome and its own integrated cooling system. Slices of less than  $40\ \mu\text{m}$  were cut with a metal blade at low speed (50 strokes/min), deposited on calcium fluoride ( $\text{CaF}_2$ ) slides and left dry at ambient temperature.

## **2.3. FTIR- Hyperspectral imaging acquisition**

Infrared spectra in the region  $4000\text{-}750\ \text{cm}^{-1}$  were recorded in transmission mode with a FTIR 6300 spectrometer coupled to an FTIR IRT-7000 microscopy with a mercury cadmium telluride (MCT) detector from JASCO (Tokyo, Japan). The objective used was a 16X Cassegrain with 20 mm distance work. The background was acquired in a clean area of the calcium fluoride slide. Hyperspectral point scanning imaging measurement, in which a spectrum of each small pixel of the sample is acquired, has been used <sup>[33]</sup>. Scan number and aperture of the measurements were optimized to 200 scans and  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ , respectively, with a good signal-to-noise ratio. In each mapping, a specific area of the sample containing both exocarp and flesh tissues was chosen (reaching, on average, between 100-120 spectra and a time consumption of 70 min per map).

## **2.4. Chemometrics analysis**

Before analysis, the spectra were pre-processed by area-normalization and truncated (3rd order spline truncation) to reduce the spectral range to  $2000\text{-}820\ \text{cm}^{-1}$ . Hyperspectral images were analyzed by using PCA Model Editor 2.12.00

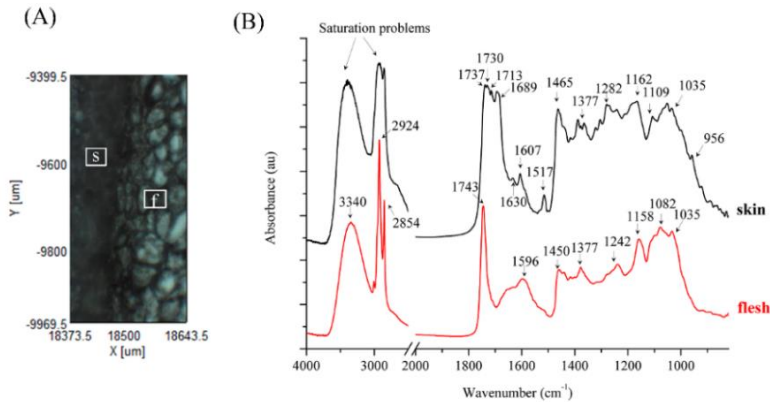
from Spectra Manager version 2 from JASCO. PLS-DA models were built in MATLAB 7.10.0 (R2010a The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) employing the PLS-toolbox (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA). To evaluate the performance of the PLS-DA models, a cross-validation approach based on Venetian blind method with ten data splits was used. In this method, ten sub-validation experiments are performed with one-tenth of the total number of spectra as a test dataset (that is 27, 11 and 18 for the flesh, hypodermis, and exocarp PLS-DA models respectively). Sensitivity values were calculated as the number of samples predicted in a certain class divided by the real number of samples in this class. Specificity values represent the number of samples predicted as “not in the class” divided by the actual number of samples not belonging to this class.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Infrared spectra of the olive fruit**

The olive is a drupe in three parts, the endocarp (pit), the mesocarp (flesh) and the exocarp (skin). During the early stages of development, the pit that surrounds the seed of the fruit, gets a hard structure of lignified cells. Oil accumulation then occurs. Once fully developed, the flesh forms 90 % of the fruit weight, made up primarily of water, oil, reducing sugars such as glucose, fructose and sucrose, phenolic compounds, proteins and pectic substances. Lipids predominate in the exocarp composition <sup>[34]</sup>. Typical infrared spectra of olive fruit exocarp and flesh are shown in Figure 1.

## Discusión conjunta de resultados



**Figure 1.** Microscope image of an olive fruit slice (19 WAFB) (A) and the corresponding infrared spectra registered in the flesh and the exocarp tissues (B). Spectra were stacked for a better visualization.

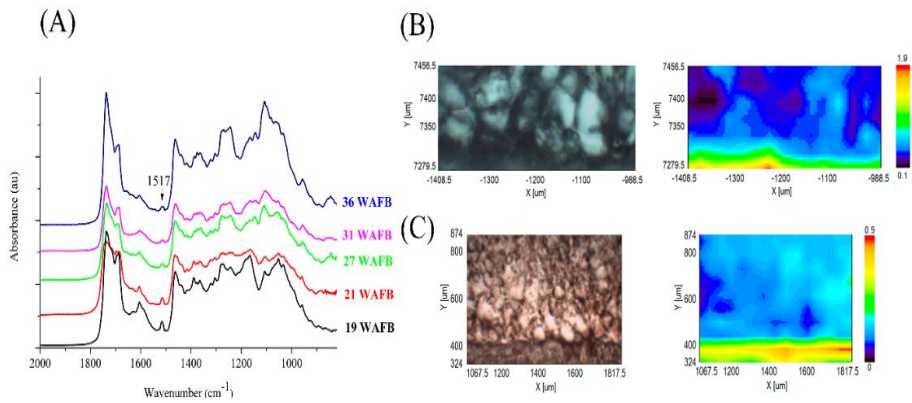
A tentative assignment of the different bands observed based on literature is presented in Table 1. The FTIR spectra of the flesh are dominated by bands attributable to lipids, namely the C-H stretching bands in the region 2900-3010 cm<sup>-1</sup> and the C=O stretching band of ester bonds at 1743 cm<sup>-1</sup>, typical of triglycerides [32]. The strong bands at 2854 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub> symmetric stretch) and 2924 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub> antisymmetric stretch) are typical of the long aliphatic chains of fatty acids [13]. Furthermore, the broadband centered at about 3300 cm<sup>-1</sup> is due to the OH stretching of polysaccharides and phenolic compounds [35]. In addition, a complex pattern is observed in the fingerprint region due to the overlapping of absorption bands from both lipids and polysaccharides [36]. Cellulosic, hemicellulosic and pectic polysaccharides of the cell walls contribute to the complex pattern observed in the 900-1200 cm<sup>-1</sup> region [37]. The most distinct features of the FTIR spectrum of the exocarp in comparison with the flesh appear at 1737, 1730, 1713 and 1689 cm<sup>-1</sup> and can be related to the components of the plant cuticle, the external membrane covering the epidermal cells of different parts of vegetables, as leaves, petals, and fruit [35]. The bands observed at 1737 and 1730

$\text{cm}^{-1}$  correspond to the C=O stretching of ester moieties in cutin, a polyester formed by polyhydroxy fatty acids, which is the main constituent of the plant cuticle; and cutan, a more hydrophobic polymer that can partially substitute cutin in the cuticle matrix, respectively <sup>[35]</sup>. The shoulder observed at  $1713 \text{ cm}^{-1}$  is associated with hydrogen-bonded ester groups <sup>[38]</sup>. Bands around  $1689 \text{ cm}^{-1}$  have been assigned to carboxylic acid groups interacting by H-bonds <sup>[7]</sup>. They could be attributed to pentacyclic triterpenoids like maslinic and oleanolic acids that represent a high percentage of the cuticle lipids <sup>[39]</sup>. These compounds have been reported to be exclusively located in the epidermis, and not detectable in olive fruit flesh <sup>[40]</sup>. Furthermore, bands at  $1630$ ,  $1607$  and  $1517 \text{ cm}^{-1}$  have also been described as characteristic in both cutin and cutan biopolymers. They can be assigned to C=C stretching in conjugated systems like aromatic rings <sup>[35,38]</sup>. The relevance of the bands attributed to the cuticle in the olive exocarp spectra is probably due to the fact that the cuticle in olives is more developed and represents a higher percentage of the epidermis in comparison with other drupe fruit <sup>[41]</sup>. Carboxylate groups present in the cuticle and other cell wall constituents like pectin also give characteristic absorption bands at  $1630$  and  $1400 \text{ cm}^{-1}$  <sup>[42]</sup>.

### 3.2. FTIR imaging of olive fruit tissues

The classical approach for FTIR chemical imaging uses a single band of the infrared spectra for the construction of false-color maps showing the distribution of the different components of the sample, assuming that the selected wavenumber has selective information of a single component. This simple approach can be applied in the case of the band located at  $1517 \text{ cm}^{-1}$ , attributed to C-C stretching in aromatic rings conjugated with C=C. This made it possible to observe a differentiated spatial distribution between flesh and exocarp as can be seen in Figure 2.

## Discusión conjunta de resultados



**Figure 2.** Typical infrared spectra registered in the exocarp of the olive fruit at different stages of ripening (A). Visible images (left) and distribution maps of the 1517 cm<sup>-1</sup> band (right) for two stages of ripening, (B) 19 WAFB and (C) 36 WAFB. Spectra were stacked for a better visualization. A, B, C in figures themselves.

From the distribution maps, it is clear that the band at 1517 cm<sup>-1</sup> is only present in the olive fruit exocarp. It can be related to the phenolic fraction of cutin, which has been recently reported to be exclusively consisting of p-coumaric acid and derivatives in the olive fruit<sup>[43]</sup>. No apparent changes in the distribution pattern of this band were observed with ripening although a subtle decrease of the intensity of almost 35% in overripe olives can be detected.

It was not possible to use single band intensities to further investigate the spatial distribution of chemical components because of the strong overlapping of spectral contributions. Therefore, multivariate analytic tools were employed to extract useful information enclosed in the whole spectrum.

**Table 1**

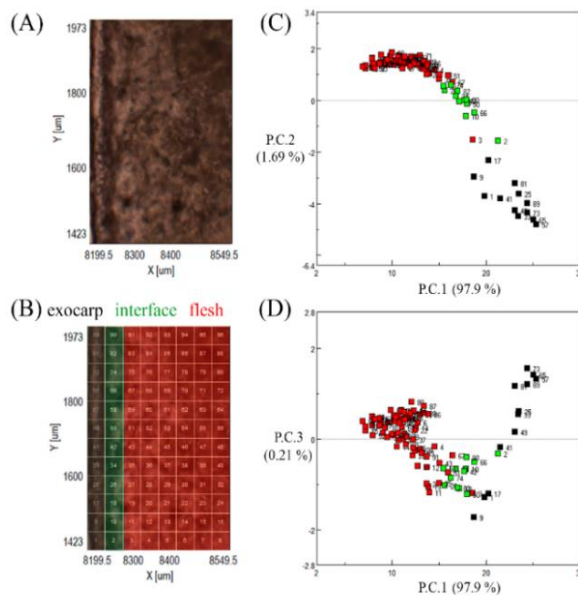
Tentative assignment of present bands in absorbance infrared spectra of olive fruit.

Location	Band (cm <sup>-1</sup> )	Assignment	Compound	Reference
<b>Exocarp and flesh</b>	3340	OH stretching	Polysaccharides and phenolics	(Heredia-Guerrero et al., 2014)
<b>Exocarp and flesh</b>	2924	CH <sub>2</sub> antisymmetric stretching	Lipids	(de la Mata et al., 2012)
<b>Exocarp and flesh</b>	2854	CH <sub>2</sub> symmetric stretching	Lipids	(de la Mata et al., 2012)
<b>Exocarp and flesh*</b>	1743	C=O stretching of esters bonds	Triglycerides	(López-Sánchez et al., 2010)
<b>Exocarp</b>	1737	C=O stretching of ester moieties	Cutin	(Heredia-Guerrero et al., 2014)
<b>Exocarp</b>	1730	C=O stretching of ester moieties	Cutin	(Heredia-Guerrero et al., 2014)
<b>Exocarp</b>	1713	C=O...H hydrogen-bonded esters	Cutin	(Shechter and Chefetz, 2008)
<b>Exocarp</b>	1689	C=O...H stretching of carboxylic acids	Cutin	(Johnson et al., 2007)
<b>Exocarp* and flesh</b>	1630	C=C ring stretching/ COO- antisymmetric stretching	Aromatic and conjugated systems/ Carboxylate ions	(Shechter and Chefetz, 2008) (Manrique and Lajolo, 2002)
<b>Exocarp* and flesh</b>	1607	C=C ring stretching	Phenolics	(Shechter and Chefetz, 2008)
<b>Flesh</b>	1582	COO- antisymmetric stretching	Carboxylate ions	(Manrique and Lajolo, 2002)
<b>Exocarp</b>	1517	C=C stretching	Aromatic and conjugated systems	(Heredia-Guerrero et al., 2014)
<b>Exocarp and flesh</b>	1465	CH <sub>2</sub> scissoring	Lipids	(de la Mata et al., 2012)
<b>Flesh</b>	1395	COO- symmetric stretching	Carboxylate ions	(Manrique and Lajolo, 2002)
<b>Exocarp and flesh</b>	1377	CHC bending	Lipids	(Schulz and Baranska, 2007)
<b>Exocarp and flesh</b>	1158	COC stretching of ring	Cellulose	(Kacuráková et al., 2000)
<b>Exocarp and flesh</b>	1109	CC stretching of ring	Cellulose	(Kacuráková et al., 2000)
<b>Exocarp and flesh</b>	1035	CO stretching	Cellulose	(Kacuráková et al., 2000)

\* More relevant presence

## Discusión conjunta de resultados

Owing to the high dimensionality of the data set, PCA was used for data reduction in order to carry out an exploratory analysis of the spectral characteristics of the samples and their spatial distribution in the olive fruit tissues. The spectra were first pre-processed. The spectral range was restricted to the region between 2000 and 820  $\text{cm}^{-1}$  to avoid the saturation problems observed in many pixels in the high wavenumber region due to the strong absorption of the samples. Furthermore, spectra were normalized to the unit area to account for any variation in thickness across the section. The scores plots revealed clear differences in the FTIR spectra related to their location in the olive fruit, as can be seen in Figure 3 for a sample in an intermediate stage of the ripening process (24 WAFB).

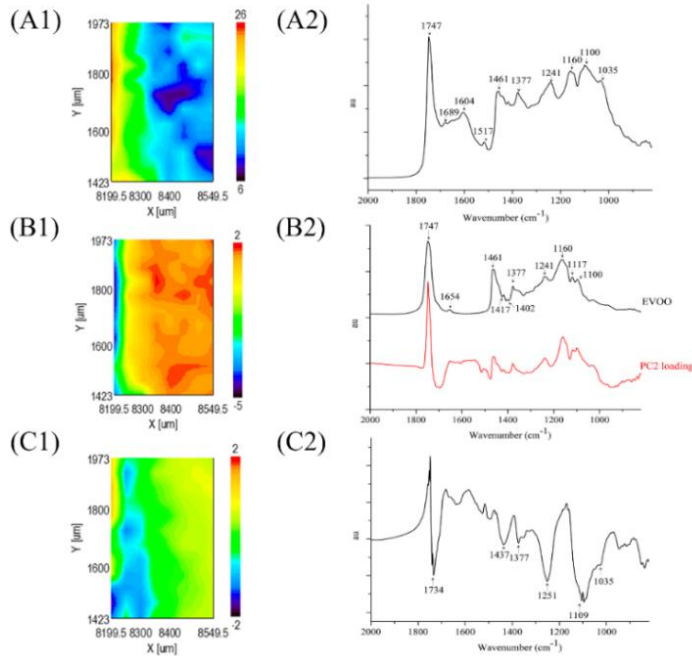


**Figure 3.** Microscope images, raw (A) and showing colored pixel grid (B) of a 24 WAFB olive sample and corresponding PCA score plots (C) PC1 vs PC2 and (D) PC1 vs PC3. Color legend: exocarp (black), interface (green) and flesh (red).

Three principal components explained 99.8 % of the variance. The measurement points have been labeled in a different color according to their location in the visible image to facilitate visualization. In the scores plot for PC1 and PC2, exocarp and flesh show an almost complete separation whereas measurement points at the interface are located in between. A linear evolution of the PC scores was observed in the transverse direction across the section, showing that the spectroscopic heterogeneity was due to a compositional gradient. Positive high values of PC1 and negative PC2 score values are characteristic of pixels located in the exocarp. The pixels of the flesh form a homogeneous cluster, whereas those belonging to the exocarp are more spread. When considering PC3 score values, a clearer separation between pixels located in the flesh and the interfacial area can be observed.

The loading vectors of the three principal components and the images of the distribution map of each one in false colors are shown in Figure 4. PC1 is more concentrated in the exocarp according to its distribution map and, particularly, in the cuticle. The loading vector shows bands characteristic of lipids at 1747, 1461, 1377, 1241, 1160 and 1100  $\text{cm}^{-1}$ , carboxylic acids with strong H-bonds typical of triterpenoids (like oleanolic acid) at 1689  $\text{cm}^{-1}$ , and aromatic rings of phenolics (1604, 1517  $\text{cm}^{-1}$ ). On the other hand, the loading vector of PC2 strongly resembles the FTIR spectrum of extra virgin olive oil (which is also shown in this figure for comparison) with bands at 1743, 1461, 1377, 1241 and 1160  $\text{cm}^{-1}$ . PC2 is mostly distributed in the fruit flesh, where the oil is stored. A non-homogeneous distribution of oil in the flesh is observed, with local accumulations of oil in certain regions of the mesocarp. This is consistent with findings that over 95 % of the final oil synthesized is accumulated in the cytoplasm of the mesocarp cells, with the formation and coalescence of small oil bodies to form large oil droplets<sup>[44]</sup>. Finally, the distribution of the scores of PC3

reveals the singularity of the interfacial region with negative values. Considering that the loading vector mainly shows negative features, this can be interpreted as a higher presence of these spectral features in the interfacial region. The main bands in the loading vector of PC3 are located at 1109 and 1035  $\text{cm}^{-1}$  and can be attributed to polysaccharides like cellulose and hemicellulose. Other contributions (1734, 1437, 1377, 1250  $\text{cm}^{-1}$ ) can be related to lipids but in this case, the typical bands of phenolic and aromatics observed in cutin do not appear. In olive fruit, the existence of a transitory zone between the exocarp and the flesh, which differs in some properties such as cell size, shape or even metabolism has been described <sup>[41]</sup>. According to that study, the exocarp of the fruit is formed by the hypodermis (considered as the deep fatty layer in the exocarp consisting of adipose connective tissue) and the epidermis (the outer layer composed of epithelial tissue and the cuticle of the cells). The hypodermis would be the immediately adjacent layer to the mesocarp and could correspond to the characteristic interfacial zone highlighted in the PC3 distribution map. This region is then characterized by the presence of more lipids and polysaccharides and less amount of phenolic and aromatic compounds in comparison with the epidermis.



**Figure 4.** Distribution maps (left) and loading vectors (right) of (A) PC1, (B) PC2 and (C) PC3 of a 24 WAFB olive sample. Extra virgin olive oil (EVOO) infrared spectrum is presented together with PC2 loading vector for comparison.

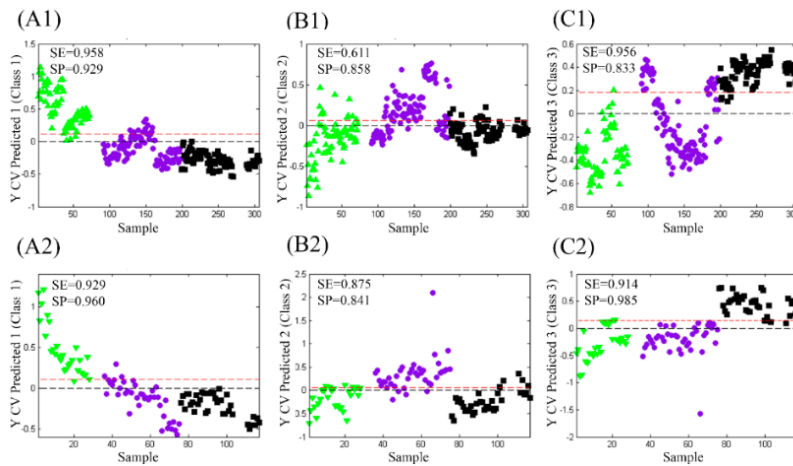
### 3.3. Characterization of spectral changes during ripening

To identify the main spectral features changing during the ripening process, the information obtained from the PCA analysis regarding the tissues structural differences was used for the appropriate selection of regions of interest (ROI) in the images. In this way, changes occurring with the ripening processes in the flesh, the hypodermis, and the epidermis can be characterized separately. To do this, we propose a strategy based on the use of PLS-DA to emphasize the spectral changes due to ripening. The idea behind is to exploit the benefits of using a supervised classification strategy to extract those spectral features that can better discriminate between FTIR spectra of olives at different stages of maturation. The samples were divided into three different categories according

## Discusión conjunta de resultados

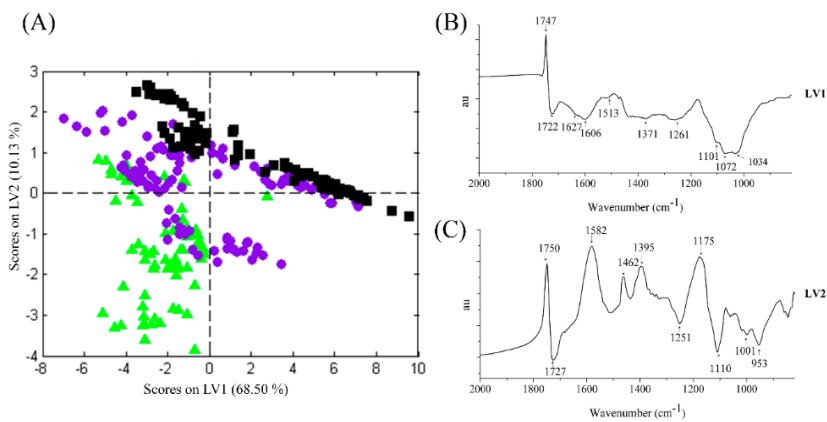
to the color of the fruit, namely green (class 1), turning color (with areas both green and purple, class 2), and black (class 3). Although this classification is rather arbitrary and subjective it provides a temporal sequence of the ripening process. If the PLS-DA model can classify the samples with reasonable accuracy in such categories, one can assume that the corresponding PLS loading vectors would carry the spectral information related to the temporal changes during ripening.

The predictive ability of the models was evaluated in terms of sensitivity and specificity using cross-validation. In the case of the epidermis, classification results were not satisfactory (results not shown). Furthermore, no clear pattern related to the ripening stages were identified in this region of the fruit, probably due to the higher spatial heterogeneity in this tissue, as already mentioned before. The results for flesh and hypodermis models are summarized in Figure 5.



**Figure 5.** PLS-DA prediction results (cross-validation) for flesh (1, top) and hypodermis (2, down) models for (A) green olives (class 1), (B) turning color olives (class 2) and (C) black olives (class 3). SE: Sensitivity, SP: Specificity. Legend: Green olives ( $\blacktriangle$ ), turning olives ( $\bullet$ ) and black olives ( $\blacksquare$ ). Dashed red lines correspond to decision level for classification.

In the flesh, the best prediction results were obtained for green olives with sensitivity and specificity higher than 90 %, revealing that less mature olives show more distinct spectral features. In contrast, olives with turning color showed the poorest prediction results, which is logical due to the higher heterogeneity of olives in this intermediate ripening stage. Better prediction results were obtained for turning olives when considering the hypodermis model.

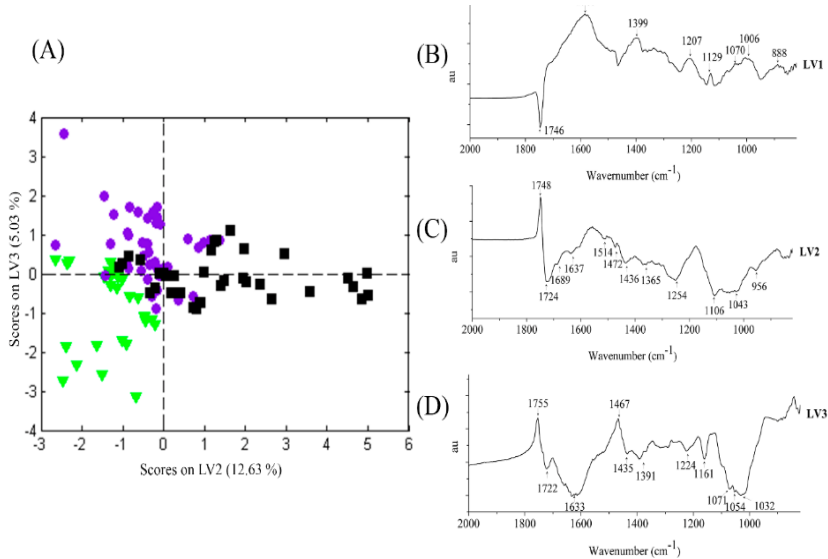


**Figure 6.** PLS-DA results for the flesh model: (A) scores plot and corresponding loadings vectors, (B) LV1 and (C) LV2. LV: latent variable. Legend: Green olives (▲), turning olives (●) and black olives (■).

The main spectral features involved in the ripening process can be identified by inspection of the loadings and scores plots. Figure 6 shows these plots for latent variables (LV) 1 and 2 for the flesh model. Despite the overlapping of the samples of different classes when considering only these two LVs, green olives are characterized by negative score values for both LV1 and LV2, turning olives mainly show negative values for LV1 and positive for LV2, while black olives tend to have higher positive values of LV1 with a decrease of LV2 ones. The

strong negative features of the LV1 loading vector in the region  $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to the typical fingerprint of polysaccharides. This region is dominated by ring vibrations overlapped with stretching vibrations of (C-OH) side groups and the (C-O-C) glycosidic bond vibration <sup>[37]</sup>. They can be attributed to pectic polysaccharides and hemicelluloses. Bands at  $1072$  and  $1034\text{ cm}^{-1}$ , typical of galactose and glucose units, respectively, can be identified in this region. The band at  $1101\text{ cm}^{-1}$  is very characteristic of pectin, a complex heteropolysaccharide predominantly containing galacturonic acid residues. Furthermore, the band at  $1722\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to  $\text{-COOH}$  groups and the broad band at  $1606$  and the shoulder at  $1626\text{ cm}^{-1}$  to the overlapping of phenol rings and carboxylate ions ( $\text{COO}^-$ ) contributions. An additional weak band located at  $1513\text{ cm}^{-1}$  due to phenols is also detected. Thus, green and turning olives contain a higher amount of these compounds. With ripening, a decrease is observed, which is more pronounced at the end of the ripening process, with black olives showing positive values for LV1. The positive band at  $1747\text{ cm}^{-1}$ , which increases with ripening, is due to the strong contribution of the ester bonds of the olive oil triglycerides. The strong positive bands at  $1582$  and  $1395\text{ cm}^{-1}$  in the loading of LV2 can be attributed to the anti-symmetrical and symmetrical stretching vibrations of the carboxylate group <sup>[45]</sup>. The increase in these contributions observed with ripening (green olives show negative score values whereas black olives show positive ones) would be attributed to depolymerization and de-esterification of cell wall polymers that lead to fruit softening with ripening. This is in agreement with previous studies that have described how solubilization of pectic polysaccharides weakened the cell wall structures of the olive fruit when comparing green to purple ripening stages <sup>[46]</sup>. Furthermore, a decrease in the methyl esterification degree of pectin has been

shown to occur in other fruit during ripening <sup>[42]</sup>. On the other hand, bands at 1750, 1462 and 1175  $\text{cm}^{-1}$  could be attributed to olive oil triglycerides.



**Figure 7.** PLS-DA results for the hypodermis model: (A) scores in the space defined by LV2 and LV3; and loadings vectors of (B) LV1, (C) LV2 and (D) LV3. LV: latent variable. Legend: Green olives ( $\blacktriangle$ ), turning olives ( $\bullet$ ) and black olives ( $\blacksquare$ ).

When considering the hypodermis model, the LV1 shows features similar to those observed in the flesh model (LV2) with the increase of carboxylate bands at 1585 and 1399  $\text{cm}^{-1}$  during the ripening process. In this case, the concomitant decrease of the ester band at 1746  $\text{cm}^{-1}$  as a consequence of the decrease in the degree of methyl-esterification of pectic polysaccharides is more clearly revealed since olive oil is not accumulated in this tissue. Furthermore, two processes with different kinetics were identified when plotting the score values in the space defined by LV2 and LV3 (see Figure 7). LV3 differentiated mainly green olives from the rest, indicating that these changes take place at the beginning of the maturation process whereas LV2 differentiated black olives. The presence of a

strong negative contribution at  $1161\text{ cm}^{-1}$  in the loading vector of LV3 indicates depolymerization of polysaccharides with the loss of glycosidic linkages<sup>[37]</sup>. This is in agreement with other studies<sup>[47]</sup> that described a sharp decrease in olive fruit pectin content in the first stages of maturation, (from ripe-green to small reddish spots) due to the activity of polygalacturonase, which hydrolyzes of the  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds of the galacturonic acid units forming the pectins. Additionally, there is a decrease in the contributions at  $1633$  and  $1391\text{ cm}^{-1}$  that can be attributed to carboxylate groups of pectin<sup>[42]</sup>. Due to pectin hydrolysis at the earlier stages of maturation in the hypodermis, these bands shift to lower wavenumber contributing to the bands observed in LV1 at  $1585$  and  $1435\text{ cm}^{-1}$ . This is consistent with the increase in soluble polysaccharides reported to occur during olive maturation<sup>[48]</sup>. A decrease in bands at  $1071$ ,  $1054$  and  $1034\text{ cm}^{-1}$  associated to galactose, arabinose and glucose units<sup>[37]</sup> is also observed. On the contrary, in the later stages of the maturation, there is a decrease on spectral features associated to phenols ( $1637$  and  $1514\text{ cm}^{-1}$ ), carboxylic acids both free ( $1722\text{ cm}^{-1}$ ) and hydrogen bonded ( $1689\text{ cm}^{-1}$ ), and polysaccharides ( $1100$ - $1040\text{ cm}^{-1}$ ), in agreement with the trends in the concentrations of sugars and phenolics reported during maturation of olive fruit<sup>[49]</sup>.

## 4. Conclusions

The combination of micro FTIR-hyperspectral imaging technique and chemometrics has been successfully applied to obtain information about the olive fruit tissues during ripening. PCA models show that different spectral contributions are associated with different spatial distributions in the visible image of samples making it possible to distinguish between tissues at the micro-level and to assign specific bands to each one. Olive oil accumulation in the flesh of the fruit has been successfully modeled with the recovery of a PC with a loading vector very similar to the FTIR spectrum of extra virgin olive. The use

of PLS-DA in the three ROIs identified by PCA revealed the main spectral features involved in the ripening process. Apart from olive oil accumulation in the flesh, features related to polysaccharides, and to a minor extent to phenols, were detected, especially in the hypodermis. Many of the changes were related to modification of the cell wall polysaccharides with processes of depolymerization and demethylation that strongly influence the texture of the fruit. Certainly, the methodology has some limitations, particularly regarding the need for destructive sample preparation and the time necessary to map large fruit areas. However, these shortcomings are compensated by the comprehensive information on the ongoing biochemical changes provided by FTIR spectra. Future developments would allow the use of this method for maturity stage determination and quality inspection to minimize postharvest deterioration of olive fruit. Early detection of cell wall polysaccharide modifications can help, for example, to reduce damage to fruit during harvest, especially if harvesting is mechanical. This would decrease the risk of spoilage after harvest and processing because this deterioration is accelerated by the presence of mechanically damaged fruit, which are especially sensitive to fungi infection. Overall, these findings suggest that FTIR-hyperspectral imaging is a powerful tool for the analysis of biochemical changes in olive fruit samples and that it can provide valuable information that would help to define the best harvest time depending on the intended purpose, namely, olive oil extraction or pickled olives production.

## Acknowledgments

Authors acknowledge the FQM-363 Research group of the Universidad de Jaén and CICT of the Universidad de Jaén for technical and financial support. M. González-Cabrera acknowledges a FPU15/03119 fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Spain.

## References

- [1] A. Borzillo, N. Iannotta, N. Uccella, Oinotria table olives: Quality evaluation during ripening and processing by biomolecular components, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2000) 113–121.
- [2] J.M. García, S. Sella, M.C. Pérez-Camino, Influence of Fruit Ripening on Olive Oil Quality, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3516–3520.
- [3] A. Lazzez, S. Vichi, N.G. Kammoun, M.N. Arous, M. Khelif, A. Romero, M. Cossentini, A four year study to determine the optimal harvesting period for Tunisian Chemlali olives, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113 (2011) 796–807.
- [4] E. Guzmán, V. Baeten, J.A.F. Pierna, J.A. García-Mesa, Determination of the olive maturity index of intact fruits using image analysis, *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015) 1462–1470.
- [5] A.K. Moore, N.L. Owen, INFRARED SPECTROSCOPIC STUDIES OF SOLID WOOD, *Appl. Spectrosc. Rev.* 36 (2001) 65–86.
- [6] B. Ribeiro da Luz, Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: a tool for ecological and botanical studies, *New Phytol.* 172 (2006) 305–318.

- [7] E.J. Johnson, O. Dorot, J. Liu, B. Chefetz, B. Xing, Spectroscopic Characterization of Aliphatic Moieties in Four Plant Cuticles, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38 (2007) 2461–2478.
- [8] D. Cozzolino, Infrared Spectroscopy as a Versatile Analytical Tool for the Quantitative Determination of Antioxidants in Agricultural Products, Foods and Plants, *Antioxidants*. 4 (2015) 482–497.
- [9] X. Lu, B.A. Rasco, Determination of Antioxidant Content and Antioxidant Activity in Foods using Infrared Spectroscopy and Chemometrics: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52 (2012) 853–875.
- [10] M. Machado, N. Machado, I. Gouvinhas, M. Cunha, J.M.M.M. de Almeida, A.I.R.N.A. Barros, Quantification of Chemical Characteristics of Olive Fruit and Oil of cv Cobrançosa in Two Ripening Stages Using MIR Spectroscopy and Chemometrics, *Food Anal. Methods*. 8 (2015) 1490–1498.
- [11] H.S. Tapp, M. Defernez, E.K. Kemsley, FTIR spectroscopy and multivariate analysis can distinguish the geographic origin of extra virgin olive oils, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6110–6115.
- [12] A. Bendini, L. Cerretani, F. Di Virgilio, P. Belloni, M. Bonoli-Carbognin, G. Lercker, Preliminary evaluation of the application of ftir spectroscopy to control geographic origin and quality of virgin olive oils, *J. Food Qual.* 30 (2007) 424–437.
- [13] P. de la Mata, A. Dominguez-Vidal, J.M. Bosque-Sendra, A. Ruiz-Medina, L. Cuadros-Rodríguez, M.J. Ayora-Cañada, Olive oil assessment in oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics, *Food Control*. 23 (2012) 449–455.

- [14] A. Rohman, The use of infrared spectroscopy in combination with chemometrics for quality control and authentication of edible fats and oils: A review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 52 (2017) 589–604.
- [15] N. Sinelli, M.S. Cosio, C. Gigliotti, E. Casiraghi, Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin olive oil “freshness,” *Anal. Chim. Acta.* 598 (2007) 128–134.
- [16] B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Díaz, M. Valcarcel, M.J. Ayora-Cañada, Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy, *Anal. Chim. Acta.* 593 (2007) 54–67.
- [17] M. Vergara-Barberán, M.J. Lerma-García, J.M. Herrero-Martínez, E.F. Sim, Cultivar discrimination of Spanish olives by using direct FTIR data combined with linear discriminant analysis, *Eur. J. Lipid Sci. Tec.* 117 (2015) 1473–1479.
- [18] R. Salzer, H.W. Siesler, *Infrared and Raman spectroscopic imaging*, Wiley-VCH, Wiley-VCH, Germany, 2009.
- [19] A.A. Gowen, Y. Feng, E. Gaston, V. Valdramidis, Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology, *Talanta.* 137 (2015).
- [20] J. Lim, G. Kim, C. Mo, M.S. Kim, K. Chao, J. Qin, X. Fu, I. Baek, B.-K. Cho, Detection of melamine in milk powders using near-infrared hyperspectral imaging combined with regression coefficient of partial least square regression model, *Talanta.* 151 (2016) 183–191.
- [21] J. Amigo, H. Babamoradi, S. Elcoroaristizabal, Hyperspectral image analysis. A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 896 (2015) 34–51.

- [22] S. Türker-Kaya, C. Huck, A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis, *Molecules*. 22 (2017) 168.
- [23] D. Lorente, N. Aleixos, J. Gómez-Sanchis, S. Cubero, O.L. García-Navarrete, J. Blasco, Recent Advances and Applications of Hyperspectral Imaging for Fruit and Vegetable Quality Assessment, *Food Bio Tech*. 5 (2012) 1121–1142.
- [24] M.A. Cantarelli, I.G. Funes, E.J. Marchevsky, J.M. Camiña, Determination of oleic acid in sunflower seeds by infrared spectroscopy and multivariate calibration method, *Talanta*. 80 (2009) 489–492.
- [25] B. André Weinstock, J. Janni, L. Hagen, S. Wright, Prediction of oil and oleic acid concentrations in individual corn (*Zea mays* L.) kernels using near-infrared reflectance hyperspectral imaging and multivariate analysis, *Appl. Spectrosc*. 60 (2006) 9–16.
- [26] S. Serranti, D. Cesare, F. Marini, G. Bonifazi, Classification of oat and groat kernels using NIR hyperspectral imaging, *Talanta*. 103 (2013).
- [27] A. Folch-Fortuny, J.M. Prats-Montalbán, S. Cubero, J. Blasco, A. Ferrer, VIS/NIR hyperspectral imaging and N-way PLS-DA models for detection of decay lesions in citrus fruits, *Chemom. Intell. Lab. Syst*. 156 (2016) 241–248.
- [28] A. Rady, N. Ekramirad, A.A. Adedeji, M. Li, R. Alimardani, Hyperspectral imaging for detection of codling moth infestation in GoldRush apples, *Postharvest Biol. Technol*. 129 (2017) 37–44.
- [29] M.A. Teena, A. Manickavasagan, L. Ravikanth, D.S. Jayas, Near infrared (NIR) hyperspectral imaging to classify fungal infected date fruits, *J. Stored Prod. Res*. 59 (2014) 306–313.

- [30] N.T. Vetrekar, R.S. Gad, I. Fernandes, J.S. Parab, A.R. Desai, J.D. Pawar, G.M. Naik, S. Umapathy, Non-invasive hyperspectral imaging approach for fruit quality control application and classification: case study of apple, chikoo, guava fruits, *J. Food Sci. Technol.* 52 (2015).
- [31] B. Li, M. Cobo-Medina, J. Lecourt, N.B. Harrison, R.J. Harrison, J. V. Cross, Application of hyperspectral imaging for nondestructive measurement of plum quality attributes, *Postharvest Biol. Technol.* 141 (2018).
- [32] M. López-Sánchez, M.J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz, Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy, *J. Agric. F. Chem.* 58 (2010) 82–87.
- [33] H.F. Grahn, P. Geladi, *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*, J. Wiley, 2007.
- [34] L. Fernández-Escobar, L. Ricardo, Barranco, D., Rallo, *El cultivo del olivo*, Mundi-Pren, Madrid, España, 2001.
- [35] J.A. Heredia-Guerrero, J.J. Benítez, E. Domínguez, I.S. Bayer, R. Cingolani, A. Athanassiou, A. Heredia, Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review, *Front. Plant Sci.* 5 (2014) 1–14.
- [36] H. Schulz, M. Baranska, Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 43 (2007) 13–25.
- [37] M. Kačuráková, P. Capek, V. Sasinková, N. Wellner, A. Ebringerová, FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses, *Carbohydr. Polym.* 43 (2000) 195–203.
- [38] M. Shechter, B. Chefetz, Insights into the sorption properties of cutin and cutan biopolymers, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1165–1171.

- [39] G. Bianchi, N. Pozzi, G. Vlahov, Pentacyclic triterpene acids in olives, *Phytochemistry*. 37 (1994) 205–207.
- [40] A. Guinda, M. Rada, T. Delgado, P. Gutiérrez, J.M. Castell, Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 9685–9691.
- [41] S. Hammami, H.F. Rapoport, Quantitative Analysis of Cell Organization in the External Region of the Olive Fruit, *Int. J. Plant Sci.* 173 (2012) 993–1004.
- [42] G.D. Manrique, F.M. Lajolo, FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit, *Postharvest Biol. Technol.* 25 (2002) 99–107.
- [43] H. Huang, M. Burghardt, A.-C. Schuster, J. Leide, I. Lara, M. Riederer, Chemical Composition and Water Permeability of Fruit and Leaf Cuticles of *Olea europaea* L., *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 8790–8797.
- [44] B. Rangel, K.A. Platt, Ultrastructural aspects of the cytoplasmic origin and accumulation of oil in olive fruit (*Olea europaea*), *Phy. Plant.* 101 (1997) 109–114.
- [45] M.J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina, B. Lendl, Determination of free fatty acids in edible oils by continuous-flow analysis with FT-IR spectroscopic detection, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 356–360.
- [46] I. Mafra, B. Lanza, A. Reis, V. Marsilio, C. Campestre, M. Angelis, M.A. Coimbra, Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit, *Phys. Plant.* 111 (2001) 439–447.
- [47] I. Mínguez-Mosquera, L. Gallardo-Guerrero, M. Roca, Pectinesterase and polygalacturonase in changes of pectic matter in olives (cv. Hojiblanca) intended for milling, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2002) 93.

[48] A. Jiménez, R. Rodríguez, I. Fernández-Caro, R. Guillén, J. Fernández-Bolaños, A. Heredia, Olive fruit cell wall: degradation of pectic polysaccharides during ripening, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 409–15.

[49] L. Cecchi, M. Migliorini, C. Cherubini, M. Giusti, B. Zanoni, M. Innocenti, N. Mulinacci, Phenolic profiles, oil amount and sugar content during olive ripening of three typical Tuscan cultivars to detect the best harvesting time for oil production, *Food Res. Int.* 54 (2013) 1876–1884.

- ***Monitorización de procesos de degradación de muestras pictóricas acelerados por radiación UV, empleando microimágenes hiperespectrales FTIR y quimiometría***

El estudio de los materiales empleados en patrimonio artístico es de gran interés dentro del ámbito cultural, pues proporciona información muy valiosa no sólo sobre las obras, sino también sobre la historia, cultura y sociedad de la época. Asimismo, el conocimiento sobre el estado actual de las obras y los procesos de degradación que pueden haber sufrido, son indispensables para establecer adecuados protocolos de conservación y restauración. Así, tanto los análisis químicos de los pigmentos utilizados, como los aglutinantes y la interacción entre ellos, pueden ayudar a descubrir su cronología, la relación existente entre rutas comerciales, su naturaleza natural o sintética, reconocer procesos de envejecimiento, alteraciones, restauraciones e incluso detectar falsificaciones.

En este contexto se plantea este trabajo, el cual trata de elucidar las transformaciones químicas debidas al envejecimiento mediante radiación ultravioleta en una serie de mezclas de pigmento-aglutinante. Para ello, se prepararon 15 muestras modelo, combinando cuatro pigmentos inorgánicos: bermellón (HgS), oropimente ( $As_2S_3$ ) azurita ( $Cu_3(CO_3)_2(OH)_2$ ) y blanco de plomo ( $(PbCO_3)_2.Pb(OH)_2$ ), con tres aglutinantes de diferente naturaleza orgánica: cola de conejo (proteica), aceite de linaza (lipídica) y temple de huevo (una mezcla entre yema de huevo y aceite de linaza). Estas mezclas se utilizaron para pintar sobre una placa de yeso que se utilizó como soporte. Se seleccionó este material por su importancia en las pinturas históricas. De hecho, no sólo ha sido empleado como soporte en multitud de obras y revestimientos decorativos, sino que también suele formar parte de la capa de preparación en soportes de madera, lienzo o pintura mural. Es por eso que, aunque en principio pudiera

## Discusión conjunta de resultados

suponer una fuente de interacción química en el proceso de envejecimiento, especialmente con los aglutinantes orgánicos, se decidió emplear yeso para emular con la mayor fidelidad posible las condiciones reales de las pinturas históricas.

Para la monitorización de los cambios químicos durante el envejecimiento de las muestras modelo se adquirieron imágenes hiperespectrales de microscopía de infrarrojo (FTIR) tras cada uno de los tres ciclos de irradiación ultravioleta. Además, se realizaron estudios complementarios de seguimiento de los cambios en el color mediante microscopía óptica y espectroscopía de reflectancia con fibra óptica.

Se construyeron modelos quimiométricos de PCA individuales para las muestras de aglutinante puro y para las muestras combinación pigmento-aglutinante. A pesar de las dificultades encontradas, especialmente relacionadas con la superposición de bandas espectrales entre los distintos componentes de las zonas analizadas, fue posible establecer pautas temporales robustas incluso desde las primeras etapas del proceso.

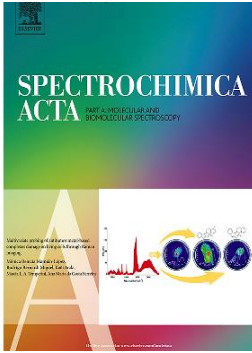
Debe destacarse que la interacción pigmento-aglutinante constituyó un factor clave; tal es el caso de la degradación acelerada producida por el pigmento blanco de plomo en el temple de huevo, algo que queda reflejado en la temprana pérdida de tonalidad amarilla en el mismo y en la oxidación de los fosfolípidos presentes en la parte proteica del aglutinante, la yema.

En el caso del aceite de linaza, la evaporación del aglutinante es notable desde las primeras horas de tratamiento, mientras que este fenómeno no es observable en las muestras con aplicación de pigmentos. Sin embargo, en estas últimas, procesos como el ensanchamiento de la banda principal del grupo carbonato, la aparición de ácidos carboxílicos o la formación de carboxilatos metálicos (en el

caso de azurita y blanco de plomo) sí que fueron identificados espectralmente en sus correspondientes modelos quimiométricos.

Por último, la oxidación de proteínas en las muestras pintadas con cola de conejo fue monitorizada en todos los ciclos de envejecimiento, así como los desplazamientos espectrales en la banda asociada con la Amida I. Los pigmentos bermellón y oropimente fueron los más afectados en este caso, presentando asimismo grandes variaciones en su color, textura y apariencia superficial.

### Artículo publicado



#### **“Monitoring UV-accelerated alteration processes of paintings by means of hyperspectral micro-FTIR imaging and chemometrics”**

González-Cabrera, M., Domínguez-Vidal, A. y Ayora-Cañada, M.J.

Referencia: Journal Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy (In Press, Journal Pre-proof, Available online 9 February 2021) doi: 10.1016/j.saa.2021.119568

### Abstract

We explored the potential of infrared hyperspectral microimages to investigate the alteration of organic binders in pictorial layers after artificial UV light ageing. A set of paint mockups was prepared considering three different binders, namely, rabbit glue (a collagen-based proteinaceous binder), linseed oil (representative of drying oils) and egg tempera (a mixture of egg yolk and linseed oil). Four pigments (vermilion, orpiment, azurite and lead white) were considered in order to investigate the influence of pigment-binder interaction, following color changes by means of fiber optic reflectance spectroscopy (FORS). FTIR micro-images provided a representative picture of the complex

and heterogeneous structure of paintings since each pixel contained the whole spectrum of the sample area from which it was recorded. Principal component analysis (PCA) was used to analyze the FTIR images data in order to extract useful information about spectral changes taking place during UV induced ageing.

Significant trends were observed, mainly depending on the binders and their degradation as a consequence of UV exposition in this pilot study on model samples. Several processes, such as the oxidation of proteins with the formation of carbonyl moieties and changes in amide band positions have been detected in the case of rabbit skin glue. The evaporation of linseed oil, probably due to the breakdown of the triacylglycerols, has been noticed for the binder alone but not when it was mixed with the pigments. In these cases, other spectral features depending on the pigment have been observed in the loading plots upon oxidation, namely the broadening of the carbonyl band, the appearance of carboxylic and dicarboxylic acids and the formation of metal carboxylates. For egg tempera, the main changes detected were related to the oxidation of lipidic components present in egg yolk fraction. Furthermore, in this case, the trend observed in the score graphs suggested that the presence of lead white accelerates its oxidation. It is interesting to note the major stability of the colored pigments when using this binder.

### **1.- Introduction**

Heritage science is, nowadays, a well-established multidisciplinary field as the scientific study of cultural heritage artefacts can provide a deeper knowledge of the origin, age, sort of fabrics or even social status of the time <sup>[1]</sup>. The field is in continuous expansion due to the development of new instrumentation and methods for investigation of artworks, stimulated by the rapid progress in

physics, chemistry and computer technology. Solving problems through scientific inquiry is one of the basis of cultural heritage conservation <sup>[2][3]</sup>. Thus, the analysis of alteration mechanisms in artworks is notably relevant for conservation and restoration procedures, because its understanding can aid to make strategic decisions on their long-term preservation <sup>[4][5][6]</sup>.

Several factors can influence the wear of the layers of the paintings, such as the support, the preparation layers, and the mixture of binder and pigment, among others. Either natural or anthropogenic agents, like extreme temperature or humidity conditions <sup>[7][8]</sup>, chemical reactions between binders and pigments <sup>[9]</sup>, the presence of small bugs, micro-organisms <sup>[10]</sup>, dust or a not careful treatment, can damage the physical state and chemical composition of the artwork <sup>[11]</sup>. Prolonged exposure to an ultraviolet (UV) radiation source is also one of the main causes of the degradation process. It acts as a catalyst, enhancing the speed of some chemical reactions and breaking chemical bonds (mainly C-H and C-O) of the materials. Moreover, it accelerates the oxidation, darkening and yellowing of binders, catalyzing radical oxidation reactions in proteinaceous binders or affecting the amide bonds <sup>[12]</sup> and favoring the cleavage of fatty acid chains in lipidic ones <sup>[13][14]</sup>. Numerous studies have been already carried out by subjecting synthetic painted samples to UV radiation in order to simulate accelerated ageing procedures in closed environments <sup>[15][16][17]</sup>. Some of them have even applied UV-B light (280-315 nm) as radiation source, instead of the most common one for these treatments, UV-A (315-400 nm) to study the ageing effect in the stability of different acrylic binding media <sup>[18]</sup>.

For the characterization of color and chemical properties of artwork, several analytical techniques can be employed <sup>[3][19]</sup>. Among them, Fiber Optics Reflectance Spectroscopy (FORS), Raman spectroscopy, X-Ray Fluorescence (XRF) or gas chromatography (GC) are commonly used for this purpose, either

alone or in combination in the form of multi-analytical approaches <sup>[20][21][22]</sup>. Infrared spectroscopy has also a great potential in this field, being suitable for the identification of both organic and inorganic pigments and binders <sup>[23][24]</sup>. The technique is particularly useful for the characterization of organic materials in artworks <sup>[25]</sup>, including studies on changes induced by UV radiation exposure. Thus, the interaction of binders and pigments of different nature <sup>[26]</sup> and the kinetic of the photodegradation of natural resins acting as varnishes <sup>[27]</sup> have been previously studied by means of IR spectroscopy.

Hyperspectral imaging (HSI) is an active area of research that has grown quickly during the last decade. It collects information from three dimensions – two spatial ( $x, y$ ) and one spectral ( $\lambda$ ), resulting in a  $(x, y, \lambda)$  dataset which is typically referred to as a datacube. The term hyperspectral refers to the collection of a large number of spectral channels, usually more than 100, in comparison with multi-spectral [28]. Thereby, HSI exhibits more sensitivity to subtle spectral variations. In the last years, there has been an increasing interest in the use of non-invasive macroscopic HSI for the study of artworks <sup>[29][30][31]</sup>. Most studies have focused on the use of reflectance spectroscopy in the visible range for pigment identification with improved results by extending into the NIR range <sup>[32][33][34]</sup>. Although it is experimentally much more complex, remote-sensing HSI in the mid-IR has also been reported <sup>[35]</sup>.

On the other hand, by integrating HSI with microscopy into one system, hyperspectral microscope imaging (HMI) techniques can collect spectral information with spatial resolution at the microscopic level. This is also an interesting tool for artworks examination since factors affecting the macroscopic appearance of an artwork, like color, texture or sheen, are typically controlled by phenomena occurring at the microscale (such as changes in oxidation state or

grain size/shape) that may be studied using micro-imaging techniques. The study of features at the microscale usually involved sampling and preparation of cross-sections to provide information about the underlying structure, chemistry, and stratigraphy of objects <sup>[22][36]</sup>. In this work, we propose the use of this methodology for the characterization of the molecular changes taking place in binders and pigments of varied hues and nature during consecutive steps of an UV ageing procedure. Instead of using cross-sections, we propose the investigation of intact model samples in the reflection mode. In this way, the technique would be suitable for the investigation of intact artefacts or fragments of a suitable size to fit into the microscope measurement plate. Using hyperspectral micro-F<sup>T</sup>IR imaging and chemometrics we will achieve information about how UV radiation induces changes in pigments and binders, taking also into account the sample heterogeneities typical of paintings (like layer thickness, pigment particle size, local differences in binder/pigment ratio, surface texture, etc.). Complementary measurements by means of colorimetry (FORS) and optical microscopy help to describe the macroscopic changes in color.

## **2.- Materials and methods**

### **2.1. Samples preparation**

Two identical plaster plates (20 x 15 cm) were prepared to be used as a reference and main mock-up for the ageing experiments. Four different pigments: vermilion (HgS), orpiment (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>), azurite (Cu<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>) and lead white ((PbCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Pb(OH)<sub>2</sub>); and three binders: rabbit glue, egg tempera and linseed oil, were considered.

Pigments were purchased from Kremer Pigmente GmbH & Co. KG (Germany) in the form of powder. Binders were acquired from local stores and prepared as

follows. Linseed oil was used in its raw form. Granular rabbit glue (5 g) was immersed in 50 mL of distilled water for 24 h, for the particles to swell up. Then, the remaining water was boiled and re-used to dissolve the rabbit glue. For the egg tempera binder, a yolk was mixed with two drops of linseed oil and two drops of distilled water and stirred into a homogenous mixture.

The painting mixtures (pigment-binder) were all prepared in individual plastic containers, by mixing 0,2500 g of pigment and the necessary amount of binder (3:1 proportion). Fifteen model samples were prepared by painting the plaster plates. The platters were dried for a month at room temperature and in a dark environment before starting the artificial ageing with UV light.

### **2.2. Instrumentation**

#### 2.2.1. Ageing approach

A SwiftCure HL250 UV radiation ageing chamber was used for the simulation of the accelerated ageing procedure of the samples. The platters are located in a sealed cell inside an irradiation chamber (UV-A 315-400 nm: 30W and UV-B 280-315 nm: 3W). Three cycles of time were considered (24h, 72h and 120h) maintaining them at  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,6^{\circ}\text{C}$  by means of a water bath temperature control system. Samples without any sort of ageing treatment were used for the reference measurements (0h).

#### 2.2.2. Sample characterization

For the visual inspection, a Dino Lite optical microscope equipped with a polarized light regulator was employed. Visible images of the surface of the samples were taken by using 15X, 100X and 200X magnification. Reflectance measurements in the range between 400-700 nm were carried out by means of a compact and portable Bluewave-Vis spectrometer (StellarNet) equipped with a

charge-coupled detector and employing a tungsten-krypton lamp and an optical fiber probe (600  $\mu\text{m}$  internal diameter). The measurement was performed by keeping the probe at  $90^\circ$  with respect to the sample, which is illuminated over a surface area of ca. 4  $\text{mm}^2$  at a distance of 15 mm. A 50 mm Halon reflectance standard (STN-RS50) was used as a reference, registering its spectrum in the same conditions. Colorimetric parameters were calculated using the CIELAB system, namely  $L^*$  for the lightness,  $a^*$ , from green (-) to red (+), and  $b^*$ , from blue (-) to yellow (+) <sup>[37]</sup>. Total color parameter  $\Delta E^*_{ab}$  (eq. 1, <sup>[38]</sup>) was used to show the overall color variation of samples during the ageing procedure:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (b_2 - b_1)^2 + (a_2 - a_1)^2}$$

[eq 1]

It has been calculated for each step of the ageing process, being  $L_1$ ,  $b_1$  and  $a_1$  those parameters corresponding to 0h of UV exposure.

FT-IR hyperspectral images were obtained with a Jasco Fourier transform infrared (FTIR) 6300 spectrometer coupled to an FTIR IRT-7000 microscope equipped with a single element mercury cadmium telluride (MCT) detector and a XYZ automated stage for mapping. A 16X Cassegrain objective (20 mm distance work) working in reflection mode was used to focus the infrared beam on the sample and to collect the radiation reflected. An adjustable aperture allowed data collection from a localized spatial position within the sample with desired spatial dimensions. We used the point to point scanning method, in which the sample is scanned by moving the sample stage and recording a spectrum corresponding to a small area at a time <sup>[39]</sup>. In this way, each spectrum recorded corresponds to a pixel of the image. The aperture size was optimized to 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  in order to achieve a good signal-to-noise ratio. We recorded maps of 1,5 mm x 1,5 mm total size consisting of 225 spectra registered in the

range between 3100-800  $\text{cm}^{-1}$  and a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . Each spectrum was average of 200 scans and, therefore, each map recording lasted around 100 min. The same area of each sample was considered for the successive maps acquisition after UV treatment. To be sure, they were marked for simple visual identification. The background was always acquired in a clean area of the plaster plate.

### 2.2.3. Data analysis

Infrared spectra were pre-processed by an area-normalization. Selected spectral ranges were employed for each binder depending on characteristic spectral changes, being 2000-1400  $\text{cm}^{-1}$ , 3100-1000  $\text{cm}^{-1}$  and 2000-1000  $\text{cm}^{-1}$  for rabbit glue, linseed oil and egg tempera, respectively. PCA Model Editor 2.12.00 from Spectra Manager version 2 (JASCO) was used to build the principal component analysis models. A cross-validation procedure based on leave one out method was used in order to evaluate the performance of the models. Micro Spectra Analysis software (JASCO) was used to obtain different ratios of both peak intensities or areas to construct false color images.

## 3.- Results

In this work, the evolution of binders and pigments during ageing in model plaster samples has been studied in order to get information about the chemical changes occurring through degradation under UV exposition. The set of mock-up samples with different combinations of pigments and binders was prepared using a plaster plate as support, taking into account the importance of gypsum in historical paintings. Gypsum has not only been utilized as the support element itself, like in the case of Muslim or Islamic plasterwork coatings <sup>[19][21]</sup>, but it is also commonly employed as a preparation layer for priming purposes on wooden, wall painting or canvas supports <sup>[40]</sup>.

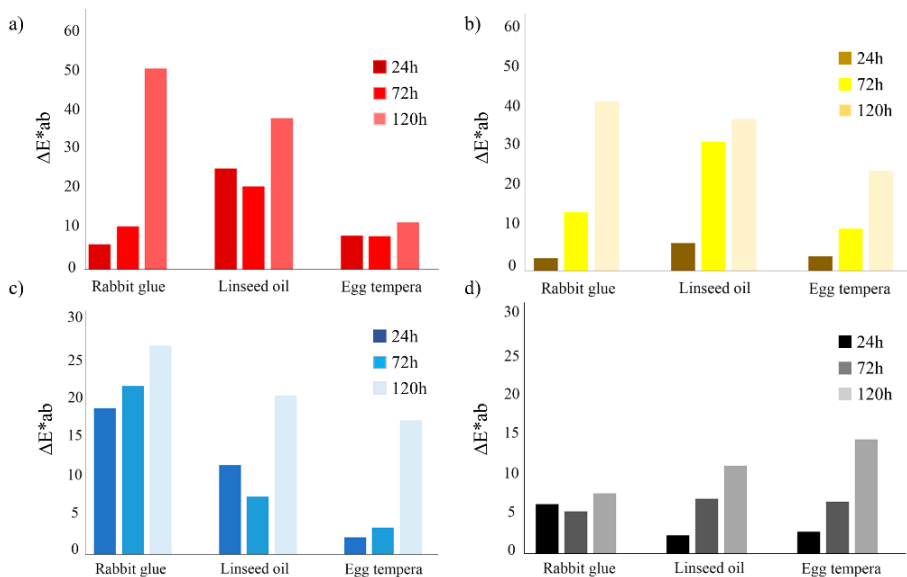
Samples were exposed to four-time cycles of UV radiation under temperature-controlled conditions ( $35^{\circ}\text{C} \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ), employing a continuous cooling current, as already reported by Tocháček et al. <sup>[41]</sup>. A detailed characterization of the aged samples was carried out by means of several optical and spectroscopic techniques exploiting the use of hyperspectral images after each of those time cycles.

### 3.1. Visual and colorimetric impact of ageing

The progressive loss of color is one of the early indications of the deterioration process in paintings and polychromies. Exposition to UV radiation can accelerate that effect. This can be observed in the microscopic images, being particularly evident in the case of orpiment (not shown). The total color parameter ( $\Delta E^*_{ab}$ ) reflects the global changes in the color of the samples during the ageing process as shown in Figure 1. The changes were analyzed considering also the corresponding CIELab\* spaces containing a\* and b\* color parameters (Figure S1, Supplementary information) and reflectance spectra depicted in Figure 2.

Color changes related to ageing appear to be very dependent on both the pigment and the binder. In general, the color was more stable when using egg tempera, especially for vermilion, whereas all the pigments, except white lead, showed the highest color changes when using rabbit glue as binder. The pigments vermilion and orpiment suffered the highest variations, with  $\Delta E^*_{ab}$  values up to 52 and 41, respectively, while color changes for azurite and lead white were less pronounced (maximum  $\Delta E^*_{ab}$  of 26 and 15, respectively). This is in agreement with previous knowledge about photostability of these pigments <sup>[42]</sup>. The visual inspection of the microscopic images showed that orpiment is coarser-grained than vermilion, which can favour certain detachment, besides

decoloration. For orpiment, parameter  $b^*$  (yellow factor) drastically decreases upon ageing, being especially noticeable in the case of rabbit skin glue and linseed oil.



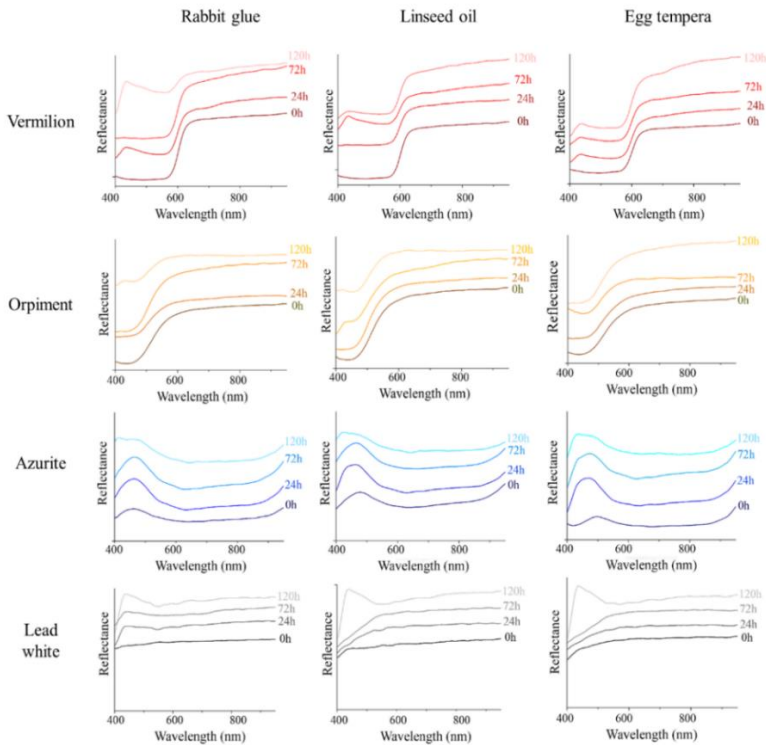
**Figure 1.** Graphs representing changes of  $\Delta E^*_{ab}$  (total color parameter) of (a) vermilion, (b) orpiment, (c) azurite and (d) lead white samples painted with rabbit glue, linseed oil and egg tempera binders through UV accelerated ageing procedure.

This can also be seen in the reflectance spectra, in which the band around 435 nm shows a much smaller curvature at 120 h of UV treatment. In previous studies <sup>[42]</sup>, orpiment has been reported to become paler and colourless on exposure to light as it converts to arsenic oxide (arsenolite,  $As_2O_3$ ). The minimum in the reflectance spectra of vermilion samples appears close to 600 nm, showing a much less broad absorbance band with increasing irradiation time with rabbit glue and linseed oil. This is reflected in the decreasing of both  $a^*$  and  $b^*$  color parameters. Azurite owes its blue color to a combination of d-d and charge transfer absorptions <sup>[43]</sup>. In its reflectance spectra, a prominent maximum

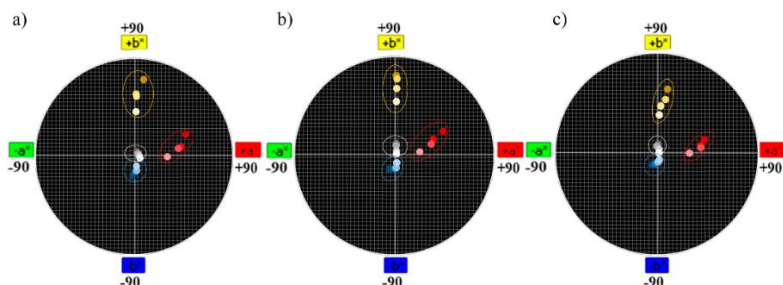
located at 475 nm appears and, as it can be observed, it is less pronounced in those samples of advanced ageing state. This is particularly accused when linseed oil acts as the binder. This change is reflected in a progressive decrease of CIELab\* parameter  $-b^*$  (blue indicator) with UV exposure and it could be considered the initiation of the typical yellowing observed in many oil-based paintings due to binder oxidation <sup>[27]</sup>. In the case of lead white samples, there are no significant changes in neither reflectance spectra nor colorimetric parameters throughout the process. It is observed a certain decrease of the parameter  $a^*$ , particularly noticeable for egg tempera, and probably related to the loss of the yellow color of the binders (especially egg yolk), more perceptible when mixed with this white pigment.

Regarding CIELab\* parameter  $L^*$ , an increase during the exposition treatment has been observed in most cases, as can be expected from the loss of color. Vermilion samples (especially when painted with rabbit glue and egg tempera) experienced a growth of more than 20% from 0h to 120h states. A similar situation can be detected for azurite samples, which increases up to 75%. For orpiment, the initial  $L^*$  values were already very high (close to 70%) and ended up to 90%, being particularly remarkable the mixture with rabbit glue, reaching values up to 93%.

## Discusión conjunta de resultados



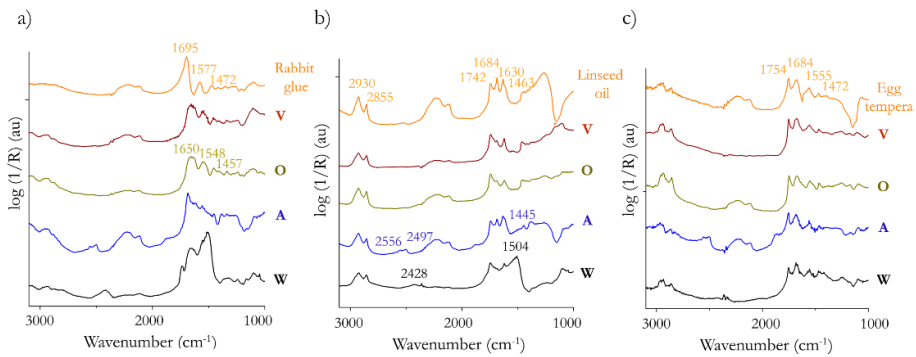
**Figure 2.** Reflectance spectra of pigments when rabbit glue, linseed oil and egg tempera are employed as binders. Color code for the figure: **O**=Orpiment, **V**= Vermilion, **A**=Azurite and **W**=lead white. Spectra were stacked for better visualization



**Figure S1.** Color characterization of samples regarding CIELab\* space graphs ( $a^*$  and  $b^*$  color parameters) when (a) rabbit glue, (b) linseed oil and (c) egg tempera are employed as binders. **O**=Orpiment, **V**= Vermilion, **A**=Azurite and **W**=lead white.

### 3.2. IR microspectroscopic characterization

In order to investigate spectral changes taking place during the consecutive steps of the ageing process, FTIR hyperspectral images of all the samples were recorded after each of the UV exposition cycles. First, the main spectral features of the pure binders and binder-pigments mixtures will be discussed before considering UV-induced changes. In Figure 3, single spectra of the binders and the mixtures are displayed, showing the initial state of the process (0h of ageing treatment). To interpret these FTIR spectra obtained in reflection mode, it is necessary to take into account the appearance of distortions with respect to the spectra acquired in the transmission mode. Furthermore, since the sample surface is not optically flat, both diffuse and specular reflected light are collected in unknown proportions, impeding any mathematical correction. Thus, some distortions appear as derivative-like spectral features and inverted bands, following the Reststrahlen effect. In addition, sometimes overtones and combination bands increase their signals because many reflections occur.



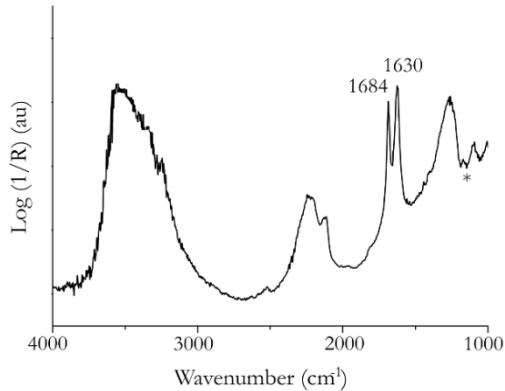
**Figure 3.** Infrared spectra of (a) rabbit glue, (b) linseed oil and (c) egg tempera samples at the initial state (0h) of the ageing process. Color code for the figure: **O**=Orpiment, **V**= Vermilion, **A**=Azurite and **W**=lead white. Spectra were stacked for better visualization

For the rabbit skin glue samples, the most intense bands of the binder are in agreement with those reported by Manfredi et al. <sup>[40]</sup> and can be attributed to strong absorptions of C=O stretching in amide I (1695  $\text{cm}^{-1}$ ) and amide II (around 1577  $\text{cm}^{-1}$ ) involving CN stretching and NH bending. An additional feature is observed at 1472  $\text{cm}^{-1}$ , which can be assigned to CH<sub>2</sub> scissoring modes. When the binder is mixed with the pigments, these spectral features are sometimes hidden under bands of azurite and lead white. In the case of vermilion and orpiment, the binder absorptions dominate the spectrum since As<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and HgS do not present spectral features in the mid-infrared region. Here, the typical bands of rabbit skin glue appear broadened and clearly shifted to lower wavenumbers (1650, 1548 and 1457  $\text{cm}^{-1}$ ). The observed shift can reflect changes in protein secondary structure and/or hydrogen bonding on hydration sites such as C=O and N-H upon interaction with the pigments. Additionally, other optical effects can be considered for the explanation of these shifts. The mixing with the pigments probably enhances diffuse reflected radiation and dismisses the proportion of specularly reflected components.

In the un-treated linseed oil spectra, bands located at 2930  $\text{cm}^{-1}$  and 2855  $\text{cm}^{-1}$  are assigned to asymmetric and symmetric (C-H) CH<sub>2</sub> stretching <sup>[44]</sup>, as well as the small shoulder at 1463  $\text{cm}^{-1}$ , related to sp<sup>3</sup> C-H bending vibration <sup>[45]</sup>. The most intense band appearing at 1742  $\text{cm}^{-1}$  is attributed to the C=O ester vibration. The typical band of the olefinic C-H stretching at 3010  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic of unconjugated cis double bonds is not observed. This reflects the complete drying of oil film during the month after applying it, which involves several processes as cis-trans isomerization, conjugation, oxidation and polymerization, all of them responsible for the depletion of this band <sup>[46][47]</sup>.

Furthermore, the sharp features observed at 1684  $\text{cm}^{-1}$  and 1630  $\text{cm}^{-1}$ , as well as the inverted band observed at about 1152  $\text{cm}^{-1}$ , do not correspond to the

characteristic bands of the binder. In fact, they can be attributed to gypsum bands of the plaster plate. The first two can be assigned to the deformation vibrations of the O–H bond of the water molecules of the gypsum (see Figure S2, Supplementary information).



**Figure S2.** Infrared spectra of gypsum support. \*=Inverted band at 1152 cm<sup>-1</sup>

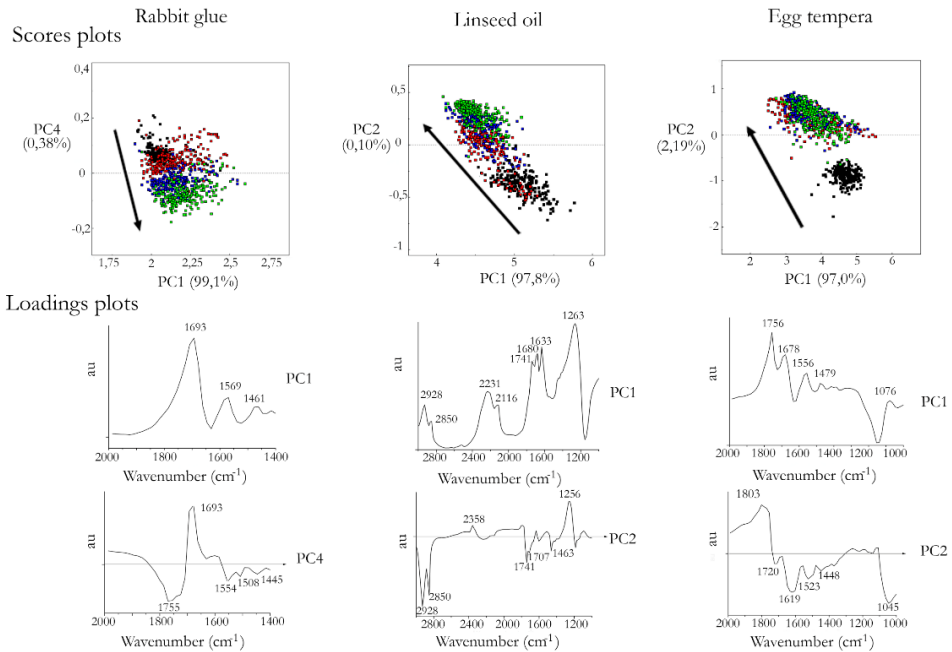
Moreover, due to the high adsorption index  $k$ , the asymmetric  $\text{SO}_4^{2-}$  stretching band of gypsum is affected by the Reststrahlen effect and consequently appears as an inverted band. These bands were not observable in the spectra of the binders containing proteins (rabbit skin glue and egg tempera), due to the strong absorption of the amide I bands. Bands characteristic of the binder are slightly shifted in the mixtures with pigments with respect to the pure binder but in less extension as for rabbit skin glue. This shifts are indicative of pigment-binder interaction as pointed out in other studies [48].

Regarding egg tempera, the two bands situated at 1754 cm<sup>-1</sup> and 1684 cm<sup>-1</sup> correspond to C=O stretching of the lipidic part of the binder and C=O stretching of amide I (protein), respectively. The band related to the absorption of amide II can be found at 1555 cm<sup>-1</sup> and the band appearing around 1470 cm<sup>-1</sup> can be attributed to bending asymmetric vibrations of  $\text{CH}_3$  [49].

When considering the spectra of the pigments, only azurite and white lead show characteristic bands in the spectral region under investigation. Their spectral features are more easily identified in the mixture with linseed oil. Thus, for lead white, the distorted Reststrahlen band of antisymmetric  $\text{CO}_3^{2-}$  stretching ( $\nu_3$ ) can be observed between  $1392\text{ cm}^{-1}$  and  $1504\text{ cm}^{-1}$  and the combination band of  $\nu_1+\nu_3$  at about  $2428\text{ cm}^{-1}$ , due to the  $((\text{PbCO}_3)_2\cdot\text{Pb}(\text{OH})_2)$  structure of hydrocerussite<sup>[40][42]</sup>. In the case of azurite, spectral features coincide with those previously reported for its reflection infrared spectra, which shows strong absorptions in the region between  $1450\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$ , related to the  $\nu_3$  of  $\text{CO}_3^{2-}$ . There are also two bands located at  $2497\text{ cm}^{-1}$  and  $2556\text{ cm}^{-1}$  due to  $\nu_1 + \nu_3$  combination.

In order to study the changes induced by the accelerated UV ageing, we have used FTIR hyperspectral images, as they contain large amounts of information since each pixel corresponds to an infrared spectrum. Painting layers are intrinsically heterogeneous, for example on thickness or pigment-binder distribution, and this may influence the behaviour upon UV irradiation. The use of hyperspectral micro-images enables to take into consideration these sample heterogeneities. Thus, using hyperspectral micro-images each pixel of the image can be considered as a “sample replicate” under the same irradiation conditions, providing a statistically more robust approach for the evaluation of the changes induced by irradiation in comparison with the conventional approach (an average FT-IR spectrum acquired on each sample). To deal with this large amount of information the use of chemometric tools is mandatory. Here, we used principal component analysis (PCA) to extract the information embodied in the hyperspectral data. In this way, we identified maximum variance within the multivariate data space. The PCA results have been interpreted by investigating simultaneously the scores and loading plots. For each binder, we

have compared the results considering the binder alone (single-binder models, all summarized in Figure 4) and mixed with the different pigments (pigment-binder models). Furthermore, models combining different pigments with the same binder (two pigment-binder models) were investigated to study the influence of the pigment identity in the changes. The following discussion will be organized according to the binder employed.

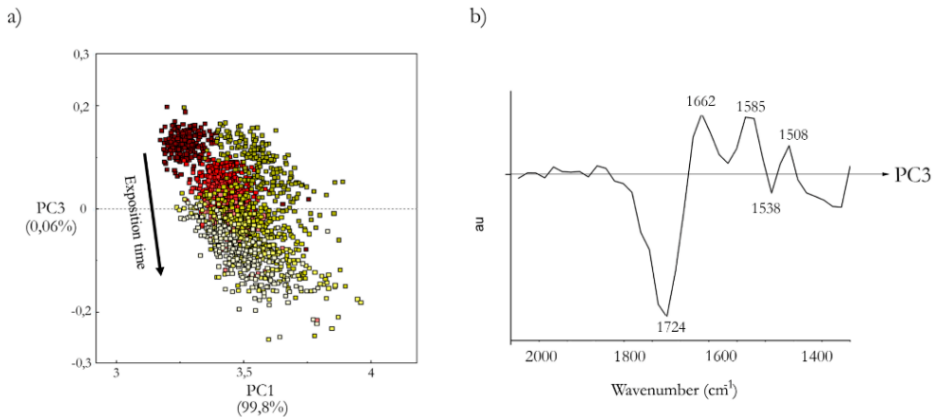


**Figure 4.** Single-binder PCA models for rabbit glue, linseed oil and egg tempera including score graphs and more relevant loadings plots. Color code for the score plots: 0h (black), 24h (red), 72h (blue) and 120h (green)

### Rabbit skin glue

Figure 4a shows the results of PC analysis for the samples considering the rabbit glue alone. Taking into account that no pre-treatment of the spectra was considered, PC1 (99,1%) reflects the average values of all spectra, and it is

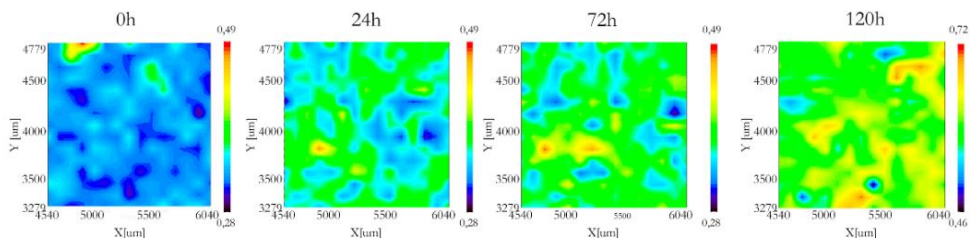
necessary to consider the PC4 (0,38%) to find the changes related to the irradiation. The variability collected by PC2 and PC3, not related to UV-irradiation time, is possibly explained by differences in the proportion of specular reflected radiation, since this binder showed the brightest surface. The inspection of the loading of PC4 revealed a shift in the band of the Amide I, with a decrease of the component at higher wavenumber ( $1755\text{ cm}^{-1}$ ) and the increase of the lower wavenumber side of the band ( $1693\text{ cm}^{-1}$ ). This is in agreement with former studies that reported the shifting of amide bands of collagen upon UV irradiation due to the induced disorder of the secondary structure <sup>[49]</sup>. When studying the pigment-binder models, the tendency is similar, being particularly clear in the case of orpiment and vermilion, thus no effects due to the identity of the pigment were observed. Interestingly, additional features at  $1770$  and  $1724\text{ cm}^{-1}$  increase with ageing. This is also observed in models combining data from two different pigments with the same binder, as it is the case for vermilion and orpiment. Since these two pigments do not present spectral features in the mid-IR region, the data have been treated together building a two pigments-binder PCA model (see Figure 5). As can be seen, there is a clear grouping of the spectra according to the irradiation time along the axis defined by PC3. It exhibits a progression from untreated samples (dark red and yellow for vermilion and orpiment, respectively) owing positive score values, to samples at 120h of the ageing procedure, showing negative values in this case and labelled with light colors.



**Figure 5.** Two pigments-binder PCA model for vermilion (red) and orpiment (yellow) samples with rabbit skin glue including (a) score graph and (b) more relevant loadings plot. Color code for the score plot: from dark to bright color (0h to 120h). Arrow to indicate the direction from initial to final step of ageing treatment

The band at  $1724\text{ cm}^{-1}$ , which increases with irradiation time, can be attributed to carbonyl moieties formed by oxidation of the proteins. This seems to indicate that the presence of pigments favored the degradation of proteins. This is most remarkable in the case of orpiment, with larger changes in PC3 score values. The oxidation of the polypeptidic chains leading to the generation of carbonyl compounds with characteristic vibrations in the region  $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$  has been previously described for degraded historical parchments <sup>[52]</sup>. In fact, the increase of the intensity of this region with respect to the Amide I band has been proposed as a marker for oxidative damage of parchments. In Figure 6, the ratio of the intensities of  $1724\text{ cm}^{-1}$  and  $1649\text{ cm}^{-1}$  bands for the vermilion sample is shown. As can be observed, the band related to carbonyl moieties starts increasing its intensity in relation to the Amide I band at the very first stages of the ageing treatment, reaching high values at the end of the treatment. This means it can be described as a gradual process, happening along with the UV exposure time.

## Discusión conjunta de resultados

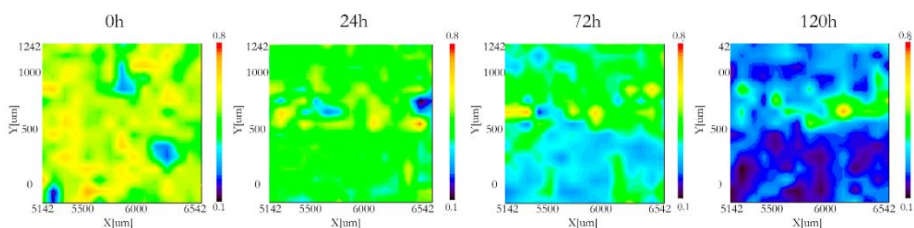


**Figure 6.** False-color distribution maps of the spatial distribution of the ratio of the intensities at  $1724\text{ cm}^{-1}/1649\text{ cm}^{-1}$  of vermilion pigment with rabbit skin glue binder obtained at the progressive stages of the ageing process

### Linseed oil

In the case of linseed oil, the changes observed for the binder alone revealed a general decrease in its characteristic bands ( $2928, 2850, 1742, 1710, 1463$  and  $1182\text{ cm}^{-1}$ ) upon UV irradiation, as can be seen in the loading plot of PC2 (0,10%) in Figure 4. This can be attributed to certain evaporation of the organic medium due to the breakdown of the triacylglycerols and the formation of volatile compounds.

This can be further illustrated (see Figure 7) by constructing distribution maps showing the ratio between the area of the main band of linseed oil ( $1742\text{ cm}^{-1}$ ) and the most intense band of the gypsum support ( $1684\text{ cm}^{-1}$ ) during the ageing process. The proportion of linseed oil clearly decreases with irradiation time.



**Figure 7.** False-color distribution maps of the spatial distribution of the ratio of the areas of  $1742\text{ cm}^{-1}/1684\text{ cm}^{-1}$  of linseed oil sample of the plaster plate obtained at the progressive stages of the ageing process

This effect is not observed when the pigments are added to the binder, which is in agreement with previous studies based on thermogravimetric analysis (TG) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) <sup>[53]</sup>. These authors observed that when fatty acids were saponified by the  $\text{Pb}^{2+}$  present in the lead white pigment, the evaporation of the binder did not take place, in contrast with the surprisingly fast rate of depletion of glycerol and fatty acids for the binder alone upon ageing. In our case, when the binder was mixed with pigments, the inspection of loading and score plots for each pigment revealed certain distinctive features (see Table 1).

Changes upon irradiation were more easily observed for vermilion and orpiment, as explained before. Azurite showed the most complex pattern of changes and the tendencies with irradiation were more difficult to interpret. In general, the broadening of the carbonyl band with ageing, which had been observed in previous studies <sup>[46][47][49]</sup>, was revealed to be due to the increase of bands in the region  $1790\text{-}1770\text{ cm}^{-1}$  and  $1710\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ . The exact positions of the bands were dependent on the pigment identity. The band at  $\sim 1780\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to lactones or anhydrides. This absorption is thought to be specific for drying oils <sup>[45]</sup>. The absorption at  $1710\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to the carboxylic and dicarboxylic acids (like azelaic acid) typically formed upon oxidation. Features at lower wavenumbers like  $1670\text{ cm}^{-1}$  can be attributed to conjugated carbonyl compounds. In all cases, a decrease of the intensity in the region  $1190\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$  (attributed to C-O stretching of triglycerides) was also observed.

**Table 1.** Tentative assignment of changes in the infrared bands during ageing of samples with different pigments and linseed oil as binder

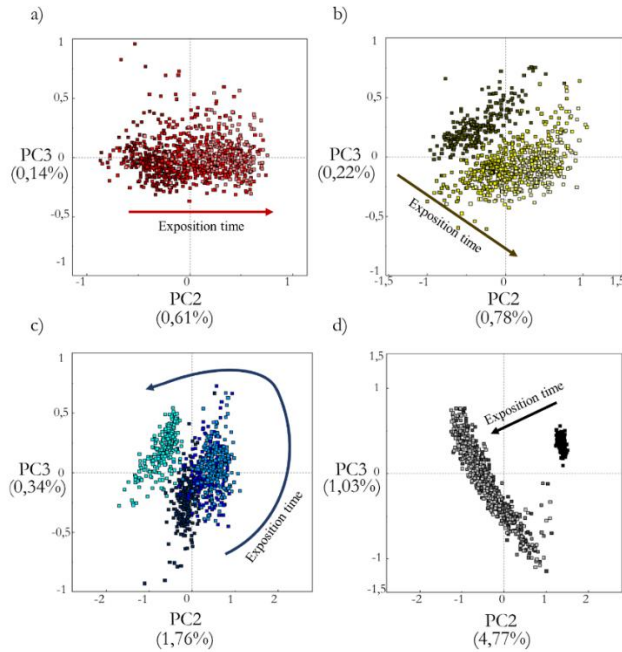
Pigment	Bands (cm <sup>-1</sup> )	Assignment	Reference
Vermilion	Increasing	1770 C=O stretching of ester	[44]
	Decreasing	1701 Carboxylic and dicarboxylic acids	[45]
		1616 Formation of calcium oxalates	[51]
Orpiment	Decreasing	1187 C-O stretching of triglycerides	[50]
		1772 C=O stretching of ester	[44]
	Increasing	1677 Conjugated carbonyl compounds	[50]
		1629 Calcium oxalates	[51]
		1741 C=O stretching of ester	[44]
		1146 C-O stretching of triglycerides	[50]
		2558 ν1 + ν3 combination modes of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> of pigment	[26]
Azurite	Increasing	2496 ν1 + ν3 combination modes of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> of pigment	[26]
		1879 ν1 + ν4 combination modes of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> of pigment	[26]
		1587 Copper carboxylates	[50]
	Decreasing	1741 C=O stretching of ester	[44]
White lead	Decreasing	1689 Conjugated carbonyl compounds	[50]
		1463 Antisymmetric stretching (ν3) of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> of pigment	[26]
	Increasing	1432 Antisymmetric stretching (ν3) of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> of pigment	[26]
		1787 Lactones or anhydrides	[45]
		1725 ν1 + ν4 combination modes of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> of pigment	[26]
		1494 Antisymmetric stretching (ν3) of CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> of pigment	[39]
		2913 Asymmetric (C-H) CH <sub>2</sub> stretching	[42]
Decreasing	2853 Symmetric (C-H) CH <sub>2</sub> stretching	[42]	
	1679 Conjugated carbonyl compounds	[50]	
	1509 Lead carboxylates	[50]	
	1125 C-O stretching of triglycerides	[50]	

Furthermore, the formation of metal carboxylates has been reported to be a common degradation phenomenon in paintings, due to the reaction of mono and dicarboxylic acids not incorporated in the polyanionic network with metal cations from the pigments. In our study, this was clearly observed only for azurite, with the increase of the band at  $1587\text{ cm}^{-1}$  characteristic of copper carboxylates <sup>[54]</sup>. In the case of lead white, the band at  $1509\text{ cm}^{-1}$  observed in the loading vector of the PC related to ageing, is difficult to attribute to lead carboxylates, as the pigment shows a band in the region. For vermilion and orpiment, there was no evidence of metal carboxylates formation. Nevertheless, the increasing band observed for these two pigments at ca.  $1620\text{ cm}^{-1}$  could be attributed to calcium oxalates formed due to the interaction of oxalic acid, a dicarboxylic acid typically found in aged lipidic binders <sup>[55]</sup>, and the gypsum support.

### **Egg tempera**

In the case of this binder, the score plot of PC1 versus PC2 for the single binder PCA model (Figure 4) shows a clear distinction between the non-irradiated samples (0h) and the rest, corresponding to the progressive steps of the ageing process. This reveals that main changes occurred during the first hours of irradiation. The same happened for the pigment-binder models, which is an interesting observation since, for this binder, the color changes of the pigments occurred in the opposite way: little color changes were detected at the beginning and they were more pronounced with long exposure times. Thus, in the initial phases of the ageing treatment, the oxidation of the binder was the main effect induced by UV irradiation. This fact was particularly remarkable in the case of lead white (see Figure 8). This suggests that the presence of lead white accelerated the oxidation of the binder. In the case of azurite, the tendency observed is more complex, since the score values for PC2 increase in the first

steps of irradiation and then decrease reaching negative values. The inspection of the corresponding loading vectors revealed changes mostly coincident with those observed for linseed oil. The most noticeable were the increase of absorption bands at  $1770\text{ cm}^{-1}$  and  $1710\text{ cm}^{-1}$ . This is not surprising since egg tempera is a mixture of egg yolk and linseed oil, and triglycerides are present in both materials. The distinctive features of egg yolk are the bands of proteins, which seem to be more stable upon irradiation than lipidic components. As can be seen in Figure 8, in the case of this binder, it is also remarkable that the changes associated with irradiation are clearly reflected in changes in the score values of more than one PC (with the exception of vermilion, for which PC2 explained most of the variance related to ageing). Since principal components are mutually orthogonal that means that two uncorrelated processes are simultaneously happening upon irradiation. The inspection of the loadings of PC2 and PC3 revealed differences mainly in the region  $1200\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ . They could be related to the oxidation of phospholipids present in egg yolk that present distinctive spectral features in this region when compared with triglycerides <sup>[56]</sup>.



**Figure 8.** Score plots of pigment-binder PCA models of (a) vermilion, (b) orpiment, (c) azurite and (d) lead white with egg tempera. Color code for the figure: from dark to bright color (0h to 120h). Arrows to indicate the direction from initial to final step of ageing treatment

#### 4.- Conclusions

The methodological study presented illustrates the high potential of hyperspectral infrared microimaging for the investigation of UV induced changes of organic binders in pictorial layers. Painting layers are intrinsically heterogeneous, showing variable thickness and surface roughness and with uneven pigment-binder distribution. Using FTIR microimaging each pixel of the image is representative of the sample area of the mock-up sample from it was recorded and therefore, when the whole image is considered, differences in the behaviour upon UV irradiation are taken into consideration. To extract useful information from the data, different PCA models have been built including both

single-binder models and models with pigment-binder mixtures. Even when considering short UV radiation exposition times, the characteristic spectral changes of the binders have been detected, being mostly related to the formation of oxidized functional groups. Fiber optic visible reflection spectroscopy (FORS) provided complementary information about the color changes of the pigments. However, no clear relation was found between colorimetric changes registered and the alteration processes suffered by the binders in our model samples. The interaction between different pigments and binders is also an interesting issue. Thus, for example, in the case of egg tempera, it was clearly seen that the presence of lead accelerated the alteration of the binder and this was also reflected in the loss of the yellow color due to the binder in these mixtures. Curiously, for the rest of the analyzed pigments, egg tempera seemed to play a protective role in the preservation of the color. The obtained results highlight the need of considering pigment-binder interactions when studying the degradation processes of the binders. This is the case, for example of linseed oil: the evaporation of the binder, probably due to the breakdown of the triacylglycerols, was clearly observed in the single binder model but not when it was mixed with the pigments. Even when more investigations are needed to draw general conclusions on the effects of different pigments on a given binder, the usefulness of hyperspectral FTIR microimaging for the evaluation of UV induced ageing of pictorial samples is demonstrated.

### **Acknowledgments**

This work was financed with the project BIA2017-87131-R (Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness). Authors would also like to acknowledge technical and financial support from FQM-363 Research group and CICT of the Universidad de Jaén. M. González-Cabrera also acknowledges the FPU15/03119 fellowship from Spanish Ministry of Education, Culture and Sport.

## References

- [1] M.A. Rogerio-Candelera, M. Lazzari, E. Cano, *Science and Technology for the Conservation of Cultural Heritage*, Taylor & Francis, United Kingdom, 2013.
- [2] A. Heritage, S. Golfomitsou, *Conservation science: Reflections and future perspectives*, *Stud. Conserv.* 60 (2015) S22–S26.
- [3] J.M. Madariaga, *Analytical chemistry in the field of cultural heritage*, *Anal. Methods.* 7 (2015) 4848–4876.
- [4] T. Aytürk, *A History of the Restoration and Conservation of Works of Art - Alessandro Conti*, Electa, Florence, 1998.
- [5] A. Nevin, *Pigment Alteration*, in: *Encycl. Archaeol. Sci.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2018
- [6] R.L. Feller, *Aspects of chemical research in conservation: The deterioration process*, *J. Am. Inst. Conserv.* 33 (1994) 91–99.
- [7] Y.M. Issa, G. Abdel-Maksoud, M. Ibrahim, M. Magdy, *A combination of analytical methods to evaluate the effect of humidity aging on the painting materials of icon models*, *Vib. Spectrosc.* 107 (2020) 103010.
- [8] F. Modugno, F. Di Gianvincenzo, I. Degano, I.D. van der Werf, I. Bonaduce, K.J. van den Berg, *On the influence of relative humidity on the oxidation and hydrolysis of fresh and aged oil paints*, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–16.
- [9] S. Garrappa, E. Kočí, S. Švarcová, P. Bezdička, D. Hradil, *Initial stages of metal soaps` formation in model paints: The role of humidity*, *Microchem. J.* 156 (2020) 104842.

- [10] J.S. Mills, R. White, *The organic chemistry of museum objects*, Butterworth-Heinemann Series in Conservation & Museology, 1987.
- [11] X. Martiarena, *Conservación y restauración*, Cuad. Sección. Artes Plásticas y Doc. 10 (1992) 177–224.
- [12] E. Manzano, N. Navas, R. Checa-Moreno, L.Rodríguez-Simón, L.F. Capitán-Vallvey, Preliminary study of UV ageing process of proteinaceous paint binder by FT-IR and principal component analysis, *Talanta*. 77 (2009) 1724–1731.
- [13] M.P. Colombini, F. Modugno, R. Fuoco, A. Tognazzi, A GC-MS study on the deterioration of lipidic paint binders, *Microchem. J.* 73 (2002) 175–185.
- [14] E.J. Llorent-Martínez, A. Domínguez-Vidal, R. Rubio-Domene, M.I. Pascual-Reguera, A. Ruiz-Medina, M.J. Ayora-Cañada, Identification of lipidic binding media in plasterwork decorations from the Alhambra using GC-MS and chemometrics: Influence of pigments and aging, *Microchem. J.* 115 (2014) 11–18.
- [15] K. Elert, C. Cardell, Weathering behavior of cinnabar-based tempera paints upon natural and accelerated aging, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 216 (2019) 236–248.
- [16] P.M. Whitmore, V.G. Colaluca, The natural and accelerated aging of an acrylic artists' medium, *Stud. Conserv.* 40 (1995) 51–64.
- [17] T. Learner, O. Chiantore, D.M. Scalarone, Ageing studies on acrylic emulsion paints, *Prepr. ICOM Comm. Conserv. 13th Trienn. Meet. James James.* (2002) 911–919.
- [18] V. Pintus, S. Wei, M. Schreiner, Accelerated UV ageing studies of acrylic, alkyd, and polyvinyl acetate paints: Influence of inorganic pigments, *Microchem. J.* 124 (2016) 949–961.

- [19] F.J. Collado-Montero, A.I. Calero-Castillo, M. Melgosa, V.J. Medina, Colorimetric Evaluation of Pictorial Coatings in Conservation of Plasterworks from the Islamic Tradition, *Stud. Conserv.* 64 (2019) 90–100.
- [20] M. Picollo, M. Bacci, A. Casini, F. Lotti, S. Porcinai, B. Radicati, L. Stefani, Fiber Optics Reflectance Spectroscopy: A Non-destructive Technique for the Analysis of Works of Art, in: *Opt. Sensors Microsystems*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2005: pp. 259–265.
- [21] P. Arjonilla, M.J. Ayora-Cañada, R. Rubio Domene, E. Correa Gómez, M.J. de la Torre-López, A. Domínguez-Vidal, Romantic restorations in the Alhambra monument: Spectroscopic characterization of decorative plasterwork in the Royal Baths of Comares, *J. Raman Spectrosc.* 50 (2019) 184–192.
- [22] S. Sotiropoulou, G. Sciutto, A.L. Tenorio, J. Mazurek, I. Bonaduce, S. Prati, R. Mazzeo, M. Schilling, M.P. Colombini, Advanced analytical investigation on degradation markers in wall paintings, *Microchem. J.* 139 (2018) 278–294.
- [23] E.L. Kendix, S. Prati, R. Mazzeo, E. Joseph, G. Sciutto, C. Fagnano, Far Infrared spectroscopy in the field of cultural heritage, *E-PRESERVATIONScience.* 7 (2010) 8–13.
- [24] K. Katayama, H. Kandori, FTIR study of primate color visual pigments, *Biophys.* 11 (2015) 61–66.
- [25] F. Rosi, A. Daveri, C. Miliani, G. Verri, P. Benedetti, F. Piqué, B.G. Brunetti, A. Sgamellotti, Non-invasive identification of organic materials in wall paintings by fiber optic reflectance infrared spectroscopy: A statistical multivariate approach, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2097–2106.
- [26] D. Pellegrini, C. Duce, I. Bonaduce, S. Biagi, L. Ghezzi, M.P. Colombini, M.R. Tinè, E. Bramanti, Fourier transform infrared spectroscopic study of rabbit

glue/inorganic pigments mixtures in fresh and aged reference paint reconstructions, *Microchem. J.* 124 (2016) 31–35.

[27] C. Azémard, C. Vieillescazes, M. Ménager, Effect of photodegradation on the identification of natural varnishes by FT-IR spectroscopy, *Microchem. J.* 112 (2014) 137–149.

[28] H. Grahn, P. Geladi, Techniques and applications of hyperspectral image analysis, J. Wiley, 2007.

[29] C. Fischer, I. Kakoulli, Multispectral and hyperspectral imaging technologies in conservation: current research and potential applications, *Stud. Conserv.* 51 (2006) 3–16.

[30] C. Cucci, J.K. Delaney, M. Picollo, Reflectance Hyperspectral Imaging for Investigation of Works of Art: Old Master Paintings and Illuminated Manuscripts, *Acc. Chem. Res.* 49 (2016) 2070–2079.

[31] M. Picollo, C. Cucci, A. Casini, L. Stefani, Hyper-spectral imaging technique in the cultural heritage field: New possible scenarios, *Sensors*. 20 (2020) 2843.

[32] J.K. Delaney, J.G. Zeibel, M. Thoury, R. Littleton, M. Palmer, K.M. Morales, E.R. De La Rie, A. Hoenigswald, Visible and infrared imaging spectroscopy of picasso's harlequin musician: Mapping and identification of artist materials in situ, *Appl. Spectrosc.* 64 (2010) 584–594.

[33] C. Biron, A. Mounier, G. Le Bourdon, L. Servant, R. Chapoulie, F. Daniel, A blue can conceal another! Noninvasive multispectroscopic analyses of mixtures of indigo and Prussian blue, *Color Res. Appl.* 45 (2020) 262–274.

[34] L. de Viguerie, N.O. Pladevall, H. Lotz, V. Freni, N. Fauquet, M. Mestre, P. Walter, M. Verdaguer, Mapping pigments and binders in 15th century Gothic

works of art using a combination of visible and near infrared hyperspectral imaging, *Microchem. J.* 155 (2020) 104674.

[35] F. Rosi, C. Miliani, R. Braun, R. Harig, D. Sali, B.G. Brunetti, A. Sgamellotti, Noninvasive Analysis of Paintings by Mid-infrared Hyperspectral Imaging, *Angew. Chemie Int. Ed.* 52 (2013) 5258–5261.

[36] F. Rosi, A. Federici, B.G. Brunetti, A. Sgamellotti, S. Clementi, C. Miliani, Multivariate chemical mapping of pigments and binders in easel painting cross-sections by micro IR reflection spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3133–3145.

[37] Hunter Lab, CIE L\*a\*b\* Color Scale. Insight on color, *Apl. Note.* 8 (1996).

[38] D.H. Brainard, *Color Appearance and Color Difference Specification*, Optical Society of America, Washington, 2003.

[39] J. Sellors, R.A. Crocombe, R.A. Holt, N.A. Wright, FT-IR Imaging Hardware, in: Slobodan Sasic, Yukihiko Ozaki (Eds.), *Raman, Infrared, Near-Infrared Chem. Imaging*, Wiley, 2010.

[40] M. Manfredi, E. Barberis, A. Rava, E. Robotti, F. Gosetti, E. Marengo, Portable diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) technique for the non-invasive identification of canvas ground: IR spectra reference collection, *Anal. Methods.* 7 (2015) 2313–2322.

[41] J. Tocháček, Z. Vrátníčková, Polymer life-time prediction: The role of temperature in UV accelerated ageing of polypropylene and its copolymers, *Polym. Test.* 36 (2014) 82–87.

[42] A. Coccato, L. Moens, P. Vandenabeele, On the stability of mediaeval inorganic pigments: A literature review of the effect of climate, material selection, biological activity, analysis and conservation treatments, *Herit. Sci.* 5 (2017) 12.

- [43] R.L. Feller, *Artists' Pigments: a handbook of their history and characteristics*, National Gallery of Art, Washington D.C., 1993.
- [44] Z. Rahiminezhad, H. Hashemi Gahruei, S. Esteghlal, G.R. Mesbahi, M.T. Golmakani, S.M.H. Hosseini, Oxidative stability of linseed oil nano-emulsions filled in calcium alginate hydrogels, *LWT*. 127 (2020) 109392.
- [45] S. Lang, Q. Zhou, Synthesis and characterization of poly(urea-formaldehyde) microcapsules containing linseed oil for self-healing coating development, *Prog. Org. Coatings*. 105 (2017) 99–110.
- [46] B. Muik, B. Lendl, A. Molina-Diaz, M. Valcarcel, M.J. Ayora-Cañada, Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy, *Anal. Chim. Acta*. 593 (2007) 54–67.
- [47] R.J. Meilunas, J.G. Bentsen, A. Steinberg, Analysis of Aged Paint Binders by FTIR Spectroscopy, *Stud. Conserv.* 35 (1990) 33–51.
- [48] I.A. Balakhnina, N.N. Brandt, Y.S. Kimberg, N.L. Rebrikova, A.Y. Chikishev, Variations in the IR spectra of yellow ochre due to mixing with binding medium and drying, *J. Appl. Spectrosc.* 78 (2011) 183–188.
- [49] J. van der Weerd, A. van Loon, J.J. Boon, FTIR studies of the effects of pigments on the aging of oil, *Stud. Conserv.* 50 (2005) 3–22.
- [50] C. Miliani, F. Rosi, A. Daveri, B.G. Brunetti, Reflection infrared spectroscopy for the non-invasive in situ study of artists' pigments, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 106 (2012) 295–307.
- [51] A. Kamińska, A. Sionkowska, Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen, *Polym. Degrad. Stab.* 51 (1996) 19–26.

- [52] M. Ciglanská, V. Jančovičová, B. Havlínová, Z. Machatová, V. Brezová, The influence of pollutants on accelerated ageing of parchment with iron gall inks, *J. Cult. Herit.* 15 (2014) 373–381.
- [53] I. Bonaduce, L. Carlyle, M.P. Colombini, C. Duce, C. Ferrari, E. Ribechini, P. Selleri, M.R. Tiné, New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study, *PLoS One.* 7 (2012) e49333.
- [54] V. Otero, D. Sanches, C. Montagner, M. Vilarigues, L. Carlyle, J.A. Lopes, M.J. Melo, Characterisation of metal carboxylates by Raman and infrared spectroscopy in works of art, *J. Raman Spectrosc.* 45 (2014) 1197–1206.
- [55] M.P. Colombini, F. Modugno, E. Menicagli, R. Fuoco, A. Giacomelli, GC-MS characterization of proteinaceous and lipid binders in UV aged polychrome artifacts, *Microchem. J.* 67 (2000) 291–300.
- [56] J.M. Nzai, A. Proctor, Determination of phospholipids in vegetable oil by fourier transform infrared spectroscopy, *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 1281–1289.

## 5.2 Análisis multimodal

En este apartado se incluyen dos estudios enfocados a la caracterización multimodal del pigmento azul ultramar. Estos trabajos tratan de explotar el potencial de la combinación de información espectral, planteando dos estrategias principales. La primera, dedicada en este caso a la autenticación del azul ultramar, se basa en aprovechar toda la información contenida en los espectros obtenidos con un único instrumento, independientemente de su origen espectral. Por otra parte, se explorará la capacidad de la combinación de información obtenida con diferentes instrumentos analíticos mediante la construcción de un cubo hiperespectral para la caracterización completa del pigmento y sus impurezas.

El lapislázuli,  $((\text{Na}, \text{Ca})_8(\text{AlSiO}_4)_6(\text{SO}_4, \text{S}, \text{Cl})_2)$ , es una piedra semipreciosa que alcanzó un gran valor material en la antigüedad, debido a las escasas minas dónde podía encontrarse y a la palpable dificultad para su extracción. De su purificación mediante un procedimiento manual muy laborioso, puede obtenerse el pigmento azul ultramar, muy codiciado en Europa durante los siglos XIV y XV, dado su brillante y fuerte color azul. Dicha tonalidad se debe a la lazurita  $(\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_n)$ , mineral que forma parte de su composición y tiene una estructura química que puede incluirse en el grupo de las sodalitas. Sin embargo, tras obtenerse por primera vez, en 1828, una versión sintética del pigmento con idéntica composición a la lazurita, el coste del azul ultramar natural se abarató enormemente y su uso fue sustituido en numerosas obras de arte y policromías. Desde entonces, el poder discernir entre los dos pigmentos ha constituido un reto en el mundo de la restauración, así como para todos aquellos estudios en patrimonio y arte que pretenden determinar la época en la que el pigmento fue aplicado o si ha sido repintado con otro de apariencia similar.

- *¿Natural o sintético? Microimágenes hiperespectrales simultáneas de señal Raman/luminiscencia para la diferenciación rápida de pigmentos de azul ultramar*

Este trabajo propone el uso de la metodología basada en el registro de imágenes hiperespectrales para la autenticación del azul ultramar natural. En este caso, se hace uso de la primera estrategia expuesta, puesto que se aprovechó la circunstancia (que se da en ocasiones) de que un único instrumento proporcione señales espectrales de distinta naturaleza. Tal es el caso de los espectros Raman del azul ultramar, que no sólo contienen información acerca de la dispersión Raman, sino que, cuando se registran empleando una excitación de 785 nm, recogen también bandas de luminiscencia. Para profundizar en este hecho, se trabajó con muestras de azul ultramar natural de diferente grado de calidad en función de su purificación y dos muestras de azul ultramar sintético.

Gracias a las imágenes registradas, fue posible demostrar que la distribución espacial de la banda Raman característica de la lazurita y la de las bandas propias de luminiscencia (que aparecen en la región situada entre 1200-1800  $\text{cm}^{-1}$  cuando se usa la fuente de excitación de 785 nm) eran diferentes según la naturaleza del pigmento, constituyendo así un procedimiento robusto para su diferenciación. Se comprobó que dichas tendencias luminiscentes no aparecían en las muestras sintéticas y aumentaban su proporción en las muestras naturales con menor pureza, corroborando así que puedan estar basadas en mecanismos electrónicos activados por minerales accesorios o impurezas presentes en la roca.

Además, las diferencias entre los patrones de distribución espacial de la principal banda Raman asociada con la lazurita posibilitaron el establecimiento de un rango de calidad entre muestras de pigmentos de azul ultramar natural (desde el

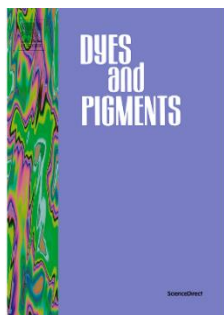
## Discusión conjunta de resultados

pigmento puro hasta las cenizas, pasando por buena y media calidad). Para ello, también se tuvieron en cuenta cálculos matemáticos realizados en función del número de píxeles de las imágenes que contenían las bandas de infrarrojo deseadas (habiendo establecido, previamente, un umbral de intensidad relativa).

De manera adicional, este método también se empleó para discernir entre las policromías azules de muestras históricas provenientes de distintas estancias de la Alhambra de Granada, obteniéndose resultados satisfactorios en distintos soportes, como yeserías, madera o capiteles de mármol.

Por último, las medidas de imágenes hiperespectrales Raman fueron complementadas con la información obtenida mediante técnicas de análisis colorimétrico, elemental y de identificación de fases cristalina, tales como la espectroscopía de reflectancia con fibra óptica (FORS), fluorescencia de rayos X (XRF) y difracción de rayos X (XRD), respectivamente.

## Artículo publicado



### **“Natural or synthetic? Simultaneous Raman/luminiscence hyperspectral microimaging for the fast distinction of ultramarine pigments”**

González-Cabrera, M., Arjonilla, P., Domínguez-Vidal, A. y Ayora-Cañada, M.J.

Referencia: Dyes and Pigments, 2020, 178, 108349

## Abstract

Genuine ultramarine has been one of the most precious blue pigments employed since ancient times. It used to be obtained by crushing and grinding the lapis lazuli rock and selectively extracting the blue mineral lazurite. Since 1828, when it was produced the synthetic version, the use of this much less expensive

material became widespread and synthetic ultramarine blue replaced the natural one in painting palettes. The distinction between natural and synthetic ultramarine is, therefore, an important goal in authentication issues. Here, we present a hyperspectral microRaman imaging analysis, complemented with the characterization of ultramarine pigment samples in terms of colour, elemental composition and identification of crystalline phases by means of fiber optics reflection spectroscopy (FORS), X-Ray Fluorescence (XRF) and X-Ray diffraction (XRD), respectively. We show that a characteristic luminescence signature, easily detected in the course of standard Raman spectroscopic analysis using 785 nm as excitation, is indicative of the natural origin of the ultramarine blue pigments. Furthermore, simultaneous Raman/luminescence hyperspectral microimages allow the distinction between natural pigments of different quality thanks to the different intensity and spatial distribution of the lazurite characteristic band at  $548\text{ cm}^{-1}$  and those of the luminescent impurities in the region between  $1200$  and  $2000\text{ cm}^{-1}$ . The establishment of a range of quality between different samples of lapis lazuli was also attempted taking into account the variations in the intensity of the Raman bands located at  $548\text{ cm}^{-1}$  and  $1286\text{ cm}^{-1}$ . Finally, the feasibility of using the simultaneous Raman/luminescence features for authentication of ultramarine blue in a real historical context, even with non-invasive investigations, is illustrated with examples of different types of blue decorations from several halls of the Alhambra monumental ensemble, in Granada.

## 1.- Introduction

Ultramarine was a very expensive and precious blue pigment extensively used in Europe throughout the 14th and 15th centuries in mediaeval paintings and frescoes. This precious pigment took on an iconographic value and it was reserved for the robes of only the most prominent figures, such as Christ and

the Virgin Mary in religious scenes. The first known use of lapis lazuli pigment dates back to the 6th and 7th centuries CE, in paintings of cave temples in Afghanistan <sup>[1]</sup>. The oldest western paintings where lapis lazuli has been found are in the church of San Saba (Rome), dating to the first half of the 8th century CE <sup>[2]</sup>. The mineral responsible for the blue colour of lapis lazuli is lazurite ( $\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{Sn}$ ), a member of the aluminosilicate group, with the same structure as sodalite ( $\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{Cl}_2$ ) <sup>[3]</sup>. It comprises interconnected  $\text{AlO}_4$  and  $\text{SiO}_4$  tetrahedra joined to form a three-dimensional framework with anions and cations located inside the large central cavities, commonly designated as  $\beta$ -cages <sup>[4][5][6]</sup>. Lazurite's colour is attributed to sulfur polyanions trapped in the  $\beta$ -cages, being the trisulfur radical ( $\text{S}^{3-\cdot}$ ) mainly responsible for the blue colour. Contributions from disulfur ( $\text{S}^{2-\cdot}$ ) and tetrasulfur ( $\text{S}^{4-\cdot}$ ) radicals can shift the colour towards yellow or red, respectively. Thus, the proportion of different sulfur species is regarded as one of the decisive factors influencing the final aspect of the pigment <sup>[7]</sup>. The most famous traditional method to purify lazurite as reported in Cennino Cennini's *Il Libro dell'Arte* <sup>[8]</sup>, is a lengthy extraction process. Natural lazurite occurs in association with other minerals like calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) <sup>[9]</sup>, pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) <sup>[10]</sup>, diopside ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ )<sup>[9][11]</sup>, wollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ ) <sup>[10]</sup>, forsterite ( $\text{Mg}_2\text{SiO}_4$ ) <sup>[10]</sup>, phlogopite ( $\text{K}(\text{Mg,Fe,Mn})_3\text{Si}_3\text{AlO}_{16}(\text{F}(\text{OH})_2)$ ) <sup>[9]</sup>, muscovite ( $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$ ) <sup>[10]</sup>, and other sodalite group members such as nosean ( $\text{Na}_8\text{Si}_6\text{Al}_6\text{O}_{24}(\text{SO}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>[10][11]</sup> and haüyne ( $\text{Na}_3\text{CaSi}_3\text{Al}_3\text{O}_{12}(\text{SO}_4)$ ) <sup>[10][12]</sup> depending on the geographical origin of the rock. Thus, the purification process involved the mixing of finely ground lapis lazuli with pine rosin, gum mastic, and beeswax to form the so-called *pastello*. The *pastello* was then stored and massaged in a warm solution of plant ashes, which preferentially separated the blue lazurite particles. Repeated several times, this process produced several grades of pigment. The first grade possesses a deep blue hue whereas the last

and crudest grade has a pale-blue hue and is typically called ultramarine ash <sup>[13]</sup>.

In 1828, a synthetic version of the ultramarine blue pigment was first obtained by means of a chemical process involving both calcination and oxidation steps <sup>[14]</sup>. Owing to a similar composition to lazurite, the use of its synthetic analogue,  $\text{Na}_{6-10}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ , quickly spread across Europe during the 19th century, replacing the natural one in many of its applications, since it was cheaper and easier to produce but maintaining the appreciated bright blue aspect. Thenceforth, the identification and discrimination between natural and the synthetic ultramarine pigments is relevant to the analysis of works of art. The occurrence of anachronistic modern pigments like synthetic ultramarine blue in historic paintings could be particularly interesting in authentication issues and/or for the detection of unknown subsequent restoration interventions. Multitechnique approaches have been found useful in order to identify accessory minerals and impurities present only in natural pigments and absent in artificial ones. Thus, different combinations of techniques including pulsed laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM/EDX) and Raman microspectroscopy have been described <sup>[15][16][17]</sup>. Nevertheless, the use of a unique analytical technique to distinguish synthetic from natural pigments and among different quality grades in a fast, reliable and even in a non-invasive manner is still an analytical challenge. Miliani et al. <sup>[18]</sup> proposed the use of a distinctive band in the FT-IR spectrum of natural Afghan lapis lazuli which was first observed by researchers at the Getty Conservation Institute (GCI) <sup>[19]</sup>. This band, located at around  $2340\text{ cm}^{-1}$ , was absent in the spectra of the synthetic versions and in Chilean natural ultramarine. They attributed the band to entrapped carbon dioxide and proposed its use as a geographical marker. Smith and Klinshaw<sup>[20]</sup> corroborated the assignment to trapped  $\text{CO}_2$  in the  $\beta$ -cage of lazurite.

Nevertheless, they proved that its absence cannot be taken necessarily as a sign of synthetic ultramarine since poor quality lapis lazuli samples and highly processed natural pigment samples did not show this band. Thus, the possibility of using this spectral feature as a geographic marker is questioned <sup>[20]</sup>. The use of fiber optics reflectance spectroscopy (FORS) has been also recently explored with the purpose of distinguishing between different quality ultramarine pigments since UV-visible reflectance spectra exhibit certain differences <sup>[21]</sup>. In this case and, in combination with some unsupervised chemometric analysis, the differentiation between natural and synthetic ultramarine blue was possible, showing certain difficulties when white pigments were added to the blue ones. Raman spectroscopy has also been suggested but only subtle differences between the spectra of synthetic ultramarine blue and lazurite from lapis lazuli rocks of different geographical sources were found. Thus, their differentiation required very high spectral quality, which involved long acquisition times and very accurate calibration of the spectrometer <sup>[22]</sup>. In this work, we further explore the possibilities of this technique by exploiting the additional information provided by laser-induced luminescence of accessory minerals that occurs when recording the Raman spectra of natural ultramarine blue pigments at certain excitation wavelengths. In particular, the use of hyperspectral micro-imaging to simultaneously gather Raman and luminescence signals to map sample heterogeneities will be explored. This methodology is in a constantly growing state, due to its ability to provide not only spectral information about complex samples but also the spatial distribution of any of the components present in the registered zone of interest <sup>[23][24]</sup>.

## 2.- Materials and methods

### 2.1 Pigment samples

Six ultramarine blue pigments in the form of powders were purchased from Kremer Pigmente GmbH & Co. KG (Germany). The codes and descriptions are included in Table 1 where it can be seen that four natural samples of different quality, as well as two synthetic ones, were considered. They had been prepared from lapis lazuli rock according to traditional procedures as stated by the supplier.

**Table 1.** Natural and synthetic ultramarine blue pigments employed in this study.

SAMPLE CODE	KREMER NAME	KREMER REFERENCE	DESCRIPTION
NU-1	Purest lapis lazuli	10530.12010.315	Clear, distinct blue.
NU-2	Lapis lazuli, good quality	10520.12010.104	Natural ultramarine, good quality
NU-3	Lapis lazuli, medium quality	10510.12010.104	Natural ultramarine, medium quality
UA	Ultramarine ash	10580.12050.104	By-product of purest Lapislazuli
SU-1	Ultramarine blue, dark	45010.12100.136	Synthetic mineral pigment
SU-2	Ultramarine blue, greenish extra	45030.12100.136	Synthetic mineral pigment

### 2.2. Historical blue decorations

The decorative revetments of the Alhambra monumental ensemble (Granada, Spain) have been investigated by our research group during the last years [25][26][27][28][29]. These studies have paid special attention to the materials employed in the Nasrid original decorations as well as to the redecorations and they were performed in cooperation with the conservation experts of the Alhambra

Council. Blue colour is widely used in the decoration of the Alhambra <sup>[30][31]</sup>, thus we consider for this study in situ measurements of the blue decorations in different spaces and revetments (plasterwork, marble capitals and wooden ceilings) as well as two small fragments of plasterwork from the Hall of the Kings. These fragments, from vaults V4 and V6, were detached during a conservation intervention carried out to consolidate the stalactite vaults of this space <sup>[26]</sup>.

### 2.3. Instrumentation

Raman spectra were recorded by using an XploRA-Plus full confocal Raman microscope, equipped with two lasers for excitation: 532 nm (25mW) and 785 nm (100 mW) and an electron-multiplying CCD (EMCCD) detector from Horiba (Kyoto, Japan). Single measurement conditions were optimized for each sample, always considering their peculiarities to achieve a good signal-to-noise ratio in the spectra and maintaining the laser power lower than 10 mW to prevent any sort of damage.

Hyperspectral point to point scanning imaging method was used, in which a single spectrum of a small pixel of the desired area is recorded at a time <sup>[24]</sup>. For the mapping analysis, 10X objective was used, resulting in a spot size of  $\sim 4 \mu\text{m}$  and a power density on samples of  $0,625 \text{ mW}/\mu\text{m}^2$ . The pixel size was established to  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  and total lateral area scanned was set to  $140 \mu\text{m} \times 140 \mu\text{m}$ . The number of scans and acquisition time were set to 1 and 5 seconds per scan. Each mapping was recorded reaching a minimum of 180 spectra, fixing the same area of each sample for the analysis with the two excitation wavelengths, with an average time consumption of 15 minutes per map. Initial data pretreatment was performed by using LabSpec6 (Spectroscopy Suite) commercial software from Horiba. Spectra were firstly baseline corrected and

normalized by area. ImageLab software (Epina GmbH, Austria) was used to calculate distribution maps in false colour taking areas with baseline points from 520 to 565  $\text{cm}^{-1}$  for the band located at 548  $\text{cm}^{-1}$  and from 1260 to 1355  $\text{cm}^{-1}$  for the one at 1286  $\text{cm}^{-1}$ . A sort of ratio of the intensities of the bands at 1286  $\text{cm}^{-1}$  (I1) and 548  $\text{cm}^{-1}$  (I2) was also calculated. This ratio is mathematically calculated as the logarithm of the ratio of two peak intensities at two different wavelengths weighted by the intensity of the second peak. That is:

$$\text{Ratio} = I2 \frac{\ln(I1)}{\ln(I2)}$$

For quantitative estimations, black/white maps were created after a thresholding operation. A threshold of 1.5 out of the maximum intensity of 10 was set allowing the distinction of a band from the noise. The threshold value was estimated considering the average signal to noise ratio in regions without clear spectral features after normalization and multiplying it by a factor of 3. Those values lying under this threshold were converted to black and all pixels with values above the threshold converted to white. In this way, the percentage of pixels above the threshold was calculated.

Historical blue decorations from the Alhambra monumental ensemble (Granada, Spain) were investigated in situ using a portable Raman microspectrometer innoRam (B&W TEK Inc., Newark, USA). It is equipped with a CCD detector thermoelectrically cooled to  $-20^{\circ}\text{C}$  and a 785 nm excitation laser (300 mW). The spectral range was defined to 65–2000  $\text{cm}^{-1}$ .

Reflectance measurements in the range from 370 nm to 1000 nm were carried out with a compact Bluewave-Vis spectrometer (StellarNet) equipped with a charge-coupled detector and employing a tungsten krypton lamp. The sample is illuminated over a surface area of ca. 4  $\text{mm}^2$  at a distance of 15 mm. A  $45^{\circ}/45^{\circ}$

## Discusión conjunta de resultados

back scattering configuration was used. The spectrum of a 50 mm Halon reflectance standard (STN-RS50) was set as a reference. Colorimetric parameters in the CIELAB space, being  $L^*$  for the lightness,  $a^*$  from green (-) to red (+), and  $b^*$  from blue (-) to yellow (+) <sup>[32]</sup>, were then calculated from the reflectance spectra.

A Niton XL3t GOLDD+ X-ray fluorescence analyser was used. It is a handheld instrument equipped with a sensitive silicon drift detector, an X-ray tube (silver anode, 6-50 kV, 0-200  $\mu$ A) and a CCD camera to visualize the sample. Samples were placed on circular Mylar® films (polypropylene 4  $\mu$ m thick) in the shielded test stand, which provides a safe platform for the analysis of small and irregularly shaped samples. The small spot option, which reduced the area of measurement to 3 mm in diameter by means of a beam collimator, was used. The measurement mode “mining” performed four scans with filters optimized for the different elements. Total measurement time consuming for each sample was of 120 seconds. An in-built factory calibration based on fundamental parameters specifically indicated to measure elements in minerals in concentrations higher than 1%, provided a semi-quantitative estimation. Only the elements with concentrations above the LOD were considered.

X-ray powder diffractograms were acquired using an Empyrean X-ray Diffractometer from Malvern PANalytical Ltd (United Kingdom). Measurements were carried out by using Cu-K $\alpha$  radiation (45kV, 40mA) and a PIXcel 3D detector, in the angular range of 5°-80°(2 $\theta$ ) with a step of 0.01°( $\lambda=1,540593$ ). For the data analysis, diffractograms were baseline corrected and profile fitted. Phase identification was performed by comparison to database standard X-ray powder patterns using HighScore software. The Rietveld analysis method was used for quantification <sup>[33]</sup>. Refinement factors such as the weighted

residual profile (WRP) and the goodness of fit (GOF) were used for the monitoring of the convergence of the refinement.

### 3.- Results

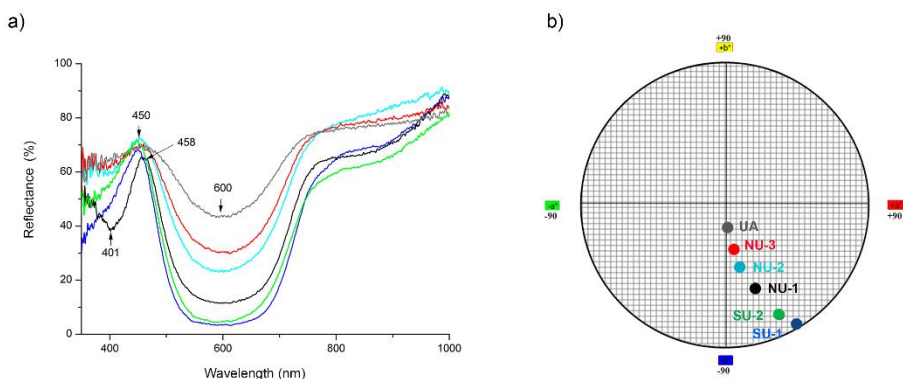
#### 3.1 Pigments characterization: colour and elemental composition

An initial characterization of the commercial pigments samples was achieved by FORS and XRF before the study with Raman spectroscopy. Figure 1a shows the reflectance spectra obtained for the different samples. All of them present a broad band of minimum reflectance at around 600 nm. This band, attributed to the  $S^{3-}$  radical trapped in the structural sodalite cages of lazurite <sup>[34]</sup>, is directly related to the blue nuance of lapis lazuli. It displays different intensities depending on the type and quality of the pigment samples. As can be seen, synthetic ultramarine samples show the most intense absorption with minimum reflectance values, whereas in natural pigments there is a notable increase of reflectance. There are also slight differences in the position of the maximum reflectance band near 450 nm. This was reported as an indicator for the distinction of synthetic ultramarine pigments that present a maximum reflectance located at 450 nm compared with the slightly shifted position (455-458 nm) for the natural ones. However, this movement can be induced by several factors, including the mixing of the blue pigment with white material as already pointed out by Aceto et al <sup>[21]</sup>. In fact, here, as illustrated by the differences between the samples of the natural pigments with different quality, this shift cannot be used as a clear indicator of the origin of the pigment.

An additional band, only observed in the case of the purest ultramarine sample (NU-1), with a reflectance minimum at 401 nm is observed. This band has been traditionally attributed to the  $S^{2-}$  anion, which provides a certain yellow hue <sup>[35]</sup>; however other authors reported that  $HS^{3-}$  species can contribute to the

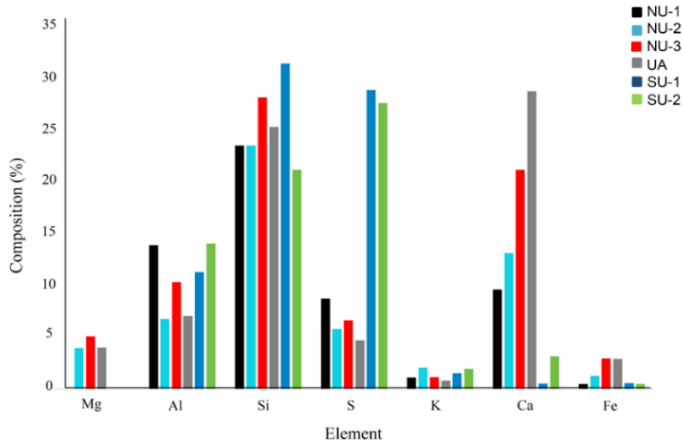
## Discusión conjunta de resultados

absorption of radiation around 400 nm <sup>[36]</sup>. Finally, some differences are also apparent in the shape of the spectra in the near-infrared region but they neither provide clear differentiation between natural and artificial samples. In order to illustrate the differences in colour observed among the samples, a graph including the CIELAB parameters  $a^*$  and  $b^*$  for each of them is shown in Figure 1b. As it is observed, synthetic samples are the bluest ones, being the SU2 marginally greener than SU1, which is in agreement with the description of the manufacturer. On the other hand, the blue hue is less pronounced in the natural pigments, and it decreases in concordance with the quality of the pigment indicated by the manufacturer. The ultramarine ash pigment (UA), obtained in the last extraction from the lapis lazuli rock, is very close to the centre since it contains a high proportion of colourless material, so it could barely be described as a blue pigment. Regarding the parameter  $L^*$ , which gives information about the lightness exhibited by the pigments, the natural pigments exhibited higher values than the synthetic ones. Considering only the natural samples, the lower the quality, the lighter the pigment.



**Figure 1.** Colour characterization of the pigments: (a) Reflectance spectra and (b) CIELAB space including colour parameters  $a^*$  and  $b^*$ . Colour code for both graphs (●) NU-1, (●) NU-2, (●) NU-3, (●) UA, (●) SU-1 and (●) SU-2.

These colour differences are related to differences in the chemical composition of the pigments as shown by X-ray fluorescence. In Figure 2 the concentration of the main elements in the pigments is compared.

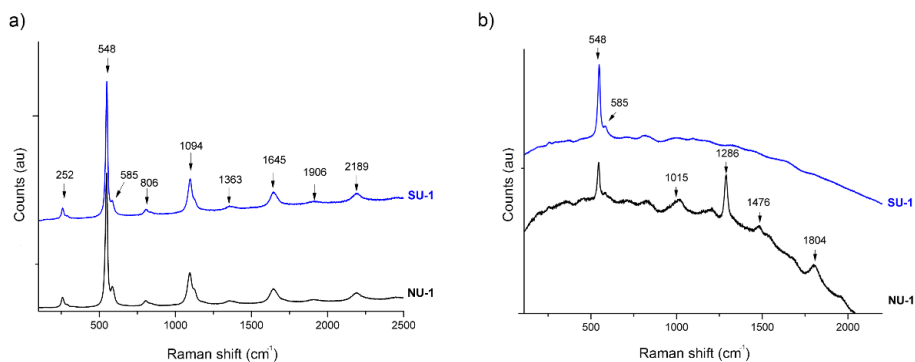


**Figure 2.** Relative elemental composition (%) of the different pigment samples obtained by X-ray fluorescence.

The major differences are observed for S, with significantly higher concentration for the synthetic samples. Noticeable differences are also found in Ca and Mg contents, being the latter below the limit of detection in the synthetic pigments and also in the purest ultramarine. The Ca content is also lower for the synthetic samples, and in fact, the content in natural samples is clearly related to the quality. The lower the quality, the higher the Ca content. This can be due to the presence of calcium-rich accessory minerals other than lazurite in the lower quality pigments. No clear differences were found for Si and Al contents. This could be explained because the most commonly employed synthesis methods of ultramarine blue involved the use of natural sources quite rich in Al and Si like kaolin,  $(Al_2Si_2O_5(OH)_4)$  [37], different kinds of zeolites [38], sodalite  $(Na_8Al_6Si_6O_{24}Cl_2)$  and other aluminosilicate compounds [4] as raw materials.

### 3.2 Raman Microspectroscopy

Single point Raman spectra and hyperspectral microimages of natural and synthetic pigments were recorded in order to characterize not only the mean spectral features of the samples but also their spatial distribution. Typical Raman spectra using two different excitation sources (532 and 785 nm) of high quality natural and synthetic ultramarine are shown in Figure 3. All of them exhibit the characteristic Raman fingerprint of lazurite, which is dominated by the band located at  $548\text{ cm}^{-1}$  and attributed to the symmetric stretching vibration of  $\text{S}^{3-}$  radicals.



**Figure 3.** Raman spectra of SU-1 (blue) and NU-1 (black) samples acquired when using a (a) 532 nm and (b) 785 nm laser excitation.

Furthermore, the resonance enhancement of the Raman spectrum when using green or red radiation (between 510 and 647 nm) for excitation <sup>[39]</sup> allows for the observation of additional bands when 532 nm is used as excitation source. This is the case of the corresponding band of the bending vibration of  $\text{S}^{3-}$  at  $252\text{ cm}^{-1}$  and the overtones at  $1094\text{ cm}^{-1}$  and  $1645\text{ cm}^{-1}$  (first and second overtones of the  $\text{S}^{3-}$  stretching mode, respectively). An additional shoulder appears at  $585\text{ cm}^{-1}$ , commonly associated with either the symmetric stretching of  $\text{S}^{2-}$  radical <sup>[40]</sup> or with the asymmetric stretching of  $\text{S}^{3-}$  <sup>[41]</sup>, being more visible in the samples of natural pigments.

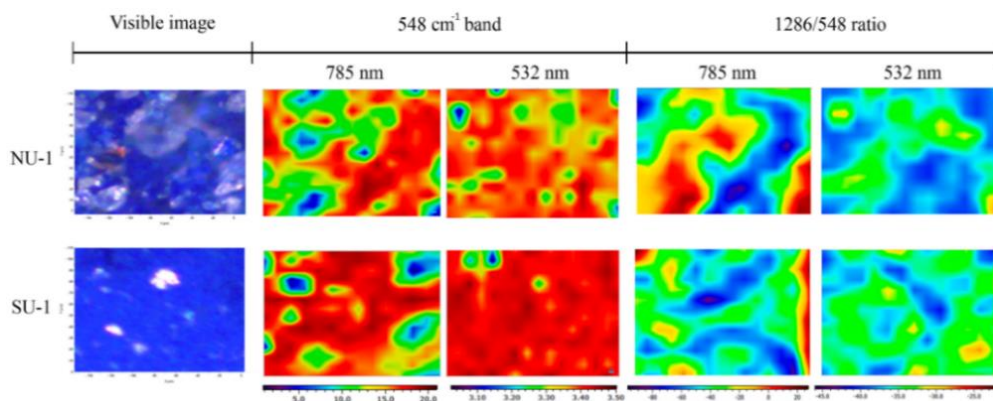
The similarity between the spectra of the natural and synthetic samples recorded at 532 nm contrasts with those obtained when using excitation at 785 nm (Figure 3b). Both spectra exhibit a broad fluorescence background. However, in the case of the natural pigment, several bands appear in the range between 1000 and 2000  $\text{cm}^{-1}$ , being the most intense located at 1286, 1476 and 1804  $\text{cm}^{-1}$ . Similar features, with slight differences in band positions, have already been reported to occur only for genuine lapis lazuli rock or for genuine natural pigments <sup>[42][43][25]</sup>. However, little attention has been paid to fully exploit their potential for discrimination between natural and synthetic pigments and to the investigation of their origin with the exception of the work performed by Schmidt et al <sup>[10]</sup>. They demonstrated that the strong features observed in Raman spectra of lapis lazuli rocks and natural pigments above 1100  $\text{cm}^{-1}$  were not the result of Raman scattering as they did not appear in the anti-Stokes region. They attributed these features to fluorescence emission bands resulting from an electronic mechanism activated by exposure of associated minerals to 785 nm radiation, suggesting that they could be related to the presence of diopside impurities containing some transition metals. Although the latter hypothesis was not definitely proved, these luminescence patterns were also found to be strongly dependent on the geographical origin of the natural rock <sup>[26]</sup>.

Therefore, the luminescence features registered simultaneously with the Raman response when using excitation at 785 nm can enable a fast and non-destructive differentiation between natural and synthetic pigments. Here, we further investigate the characteristics of this luminescence emission using hyperspectral microimages to characterize the spatial distribution of both Raman and luminescence features in natural ultramarine blue taking into account samples of synthetic and natural pigments of different quality.

First, the hyperspectral images of natural (pure sample) and synthetic samples

## Discusión conjunta de resultados

were compared. As can be seen in Figure 4, the lazurite characteristic band at  $548\text{ cm}^{-1}$  is almost homogeneously distributed in the synthetic ultramarine sample. It should be noted that, in this case, the bright areas observed in the visible image are just artefacts due to the reflection of light. In the case of the natural ultramarine, blue and colourless areas can be observed in the visible image. In the false colour image, the lazurite band shows an uneven distribution, being much more intense in those areas corresponding to the blue areas of the visible image. To visualize the luminescence effect, the false-colour distribution maps of the ratio between the intensities of the luminescence band at  $1286\text{ cm}^{-1}$  (I1) and the lazurite Raman band at  $548\text{ cm}^{-1}$  (I2) are presented for natural and synthetic pigments using both excitation sources (532 and 785 nm). According to the mathematical definition of this ratio (see Materials and Methods), the map shows negative values when the  $I_2 < I_1$  and the bigger is the difference between both, more negative is the value. The luminescence band is absent with the 532 nm laser wavelength, which is in concordance with the individual spectra described above. However, with the 785 nm laser excitation, a distribution of higher intensity in the white areas is detected in the natural sample, whilst it barely appears in the synthetic one.



**Figure 4.** Visible images of NU-1 and SU-1 samples and corresponding distribution

maps of the area of the band at  $548\text{ cm}^{-1}$  and the ratio  $1286/548$  recorded with both excitation wavelengths.

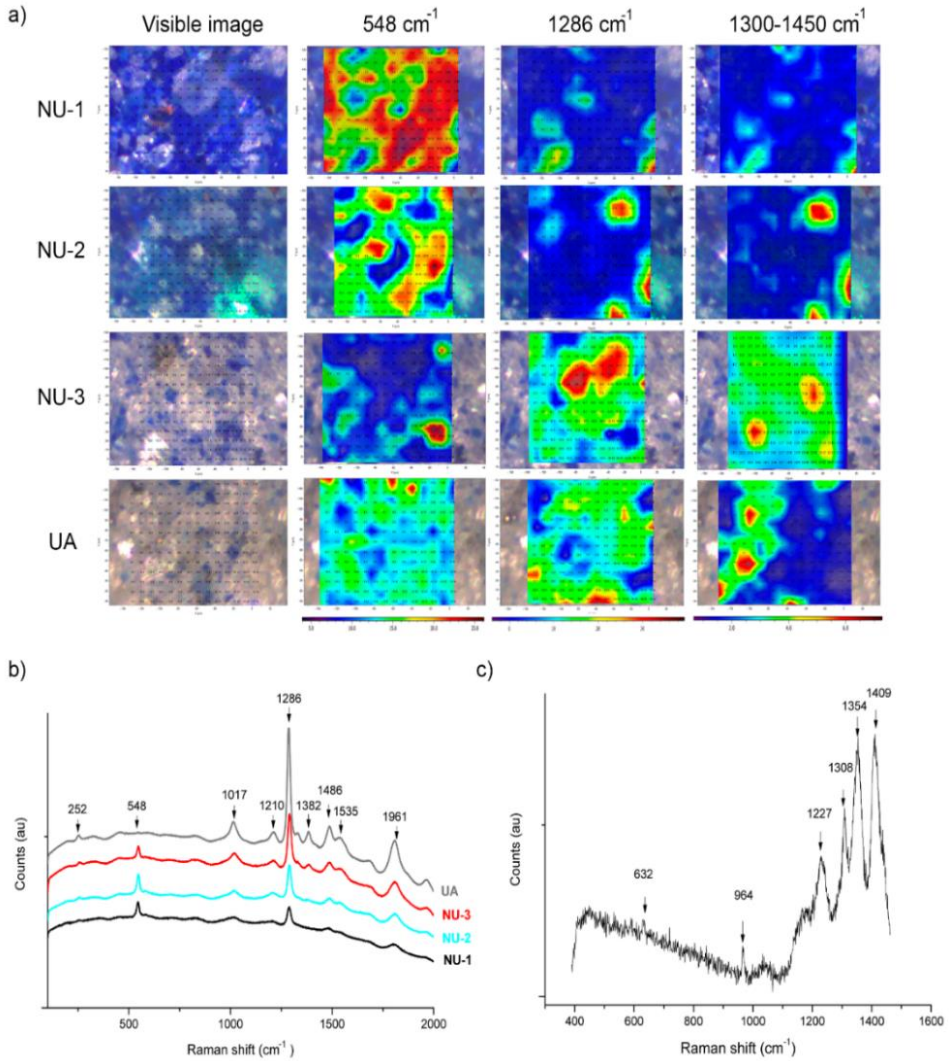
Furthermore, the possibility of distinguishing between several natural ultramarine pigments of different qualities has also been explored in this work. Hyperspectral Raman/luminescence micro-images obtained with  $785\text{ nm}$  laser for excitation are shown in Figure 5. It is clear from the distribution maps that the intensity of the lazurite band at  $548\text{ cm}^{-1}$  decreases with decreasing quality. Thus, it can be associated with the intense blue particles that are observed in the visible images (less abundant in the samples of lower quality). On the contrary, the intensity of the luminescence band at  $1286\text{ cm}^{-1}$  increases in the samples of lower quality, being particularly intense in NU-3 and UA samples. According to Schmidt et al.<sup>[10]</sup>, the monoclinic pyroxene mineral diopside ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) could be the cause of the appearance of luminescence bands in the Raman spectra of natural ultramarine pigments.

In order to better investigate the crystalline phases, present in the samples, we performed X-ray diffraction (Figure 6a). As expected, the two synthetic pigments showed very similar diffraction patterns to lazurite as the major crystalline phase identified. This is also the result obtained for the purest natural pigment, NU-1, where again lazurite was undoubtedly identified as the major mineral phase. This is in agreement with previous studies that reported that the first separation step of the traditional purification process extracts lazurite as the dominant phase<sup>[44]</sup>.

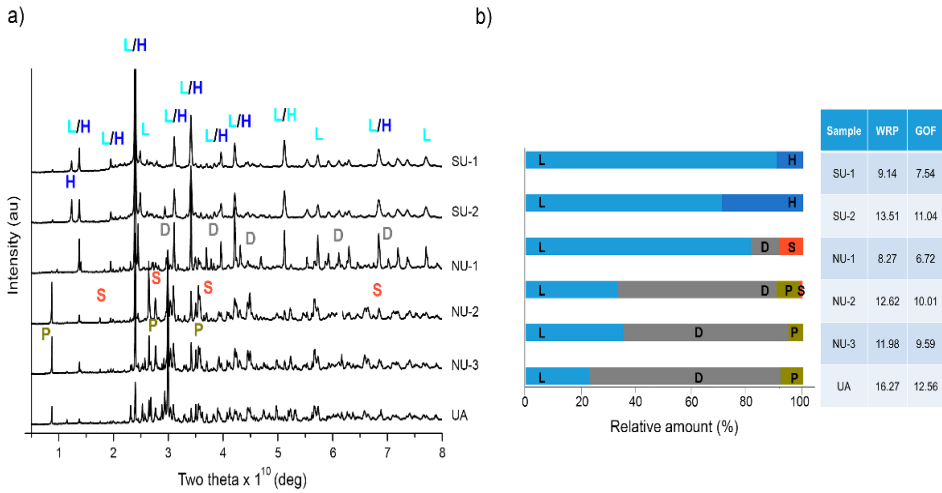
Diffraction patterns become much more complex when the quality of the pigments decreases, due to the increase in the content of accessory minerals. Diopside was distinctly identified in all of the natural pigments, (see Figure S2), with increasing concentration in samples of lower quality, being even the major

## Discusión conjunta de resultados

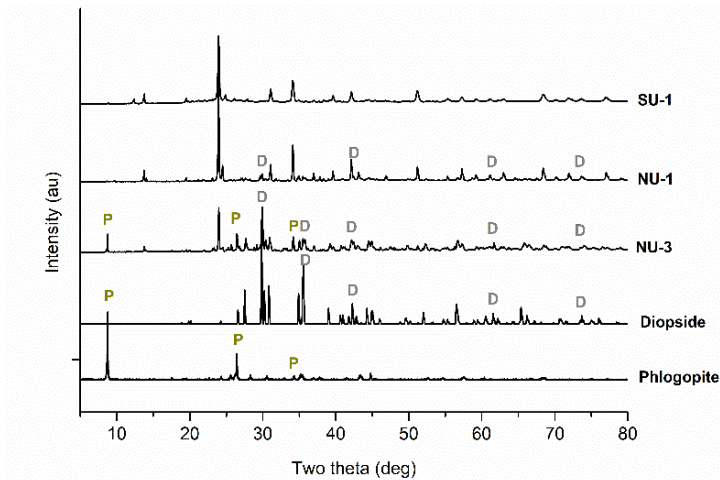
phase found in the samples NU-2, NU-3 and UA. Other accessory minerals identified were haüyne, sodalite and phlogopite.



**Figure 5.** (a) Visible images and distribution maps of the bands at 548 cm<sup>-1</sup>, 1286 cm<sup>-1</sup> and the region 1300-1450 cm<sup>-1</sup>, (b) typical Raman spectra of the pigments with different quality, and (c) Raman spectrum collected in a peculiar point of the region between 1300-1500 cm<sup>-1</sup> for the UA sample. Spectra were stacked for better visualization.



**Figure 6.** (a) X-Ray diffractograms and (b) Rietveld method quantification results of the different pigment samples. L=Lazurite, H=Haüyne, D=Diopside, P=Phlogopite, S=Sodalite. WRP=weighted residual profile, GOF=goodness of fit. Diffractograms were stacked for better visualization.

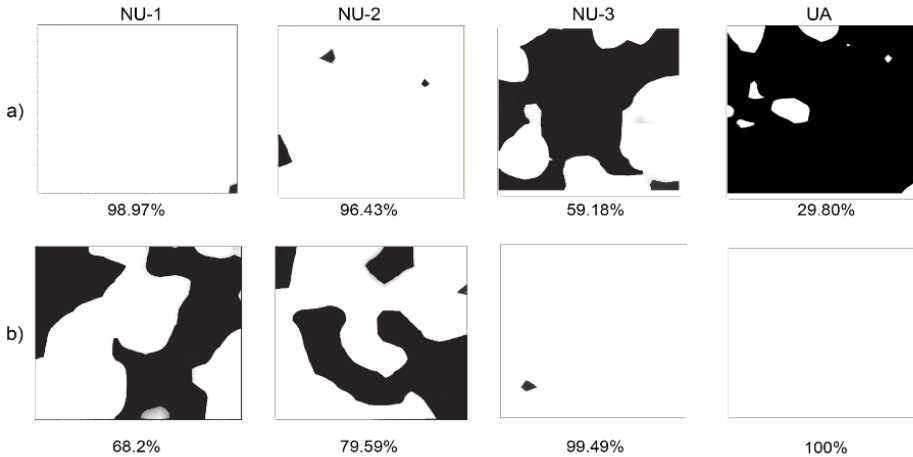


**Figure S2.** X-Ray diffractograms of SU-1, NU-1 and NU-3 samples compared to the ones of diopside and phlogopite standards. Diffractograms were stacked for better visualization.

Thus, it can be concluded that diopside must be the responsible phase for the luminescence bands found in the Raman spectra in the region around  $1286\text{ cm}^{-1}$ . However, we cannot attribute these spectral features to the diopside mineral itself since the conventional Raman spectrum of diopside does not show such luminescent features <sup>[45]</sup>. Such features could be due to impurities and, for this reason, the luminescence emission, although it was clearly associated with colourless areas, it concentrates in certain spots, not being homogeneously distributed in all white/grey areas of the samples. Nevertheless, it was not possible to obtain useful Raman signatures in most white/colourless areas that allow unequivocal identification. In the case of the sample of ultramarine ash (poorest quality, UA) it is noticeable a different spectral pattern, which is present only in certain areas but it is particularly intense (see Figure 5c). In this case, the two weak bands below  $1000\text{ cm}^{-1}$  (located at  $964$  and  $632\text{ cm}^{-1}$ ) are in good agreement with those reported for wollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ ) <sup>[46]</sup>. However, again the broad and strong bands in the region of  $1300\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  are more likely to be due to luminescence phenomena but, in this case, with a different origin than the pattern described before with the major band at  $1286\text{ cm}^{-1}$ . In general, luminescence is caused and influenced by several mechanisms promoting the formation of luminescence centres. The “activators” are mainly chemical impurities in the mineral structure, structural defects and vacancies (non-stoichiometries). Luminescence activators and quenchers for different minerals include rare earth elements,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  <sup>[47]</sup>.

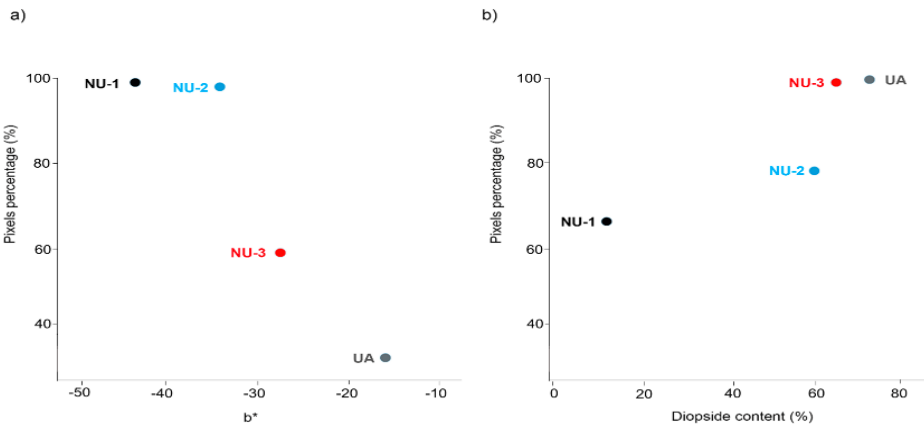
Another interesting task is to test the feasibility of performing a quantitative analysis of lazurite content based on Raman images obtained using  $785\text{ nm}$  as the excitation source. To do this, an intensity threshold of 1,5 (out of a maximum intensity of 10) was set and black and white maps were built by converting those pixels whose value lie under/above this threshold to black and white,

respectively. This was performed for the band of lazurite ( $548\text{ cm}^{-1}$ ) and for the most intense luminescence band ( $1286\text{ cm}^{-1}$ ). The results are shown in the supplementary information (Figure S1)



**Figure S1.** Black and white maps of lapis lazuli samples showing pixels below and above the established threshold, respectively, for (a)  $548\text{ cm}^{-1}$  and (b)  $1286\text{ cm}^{-1}$  bands. The percentage of pixels above the threshold is given.

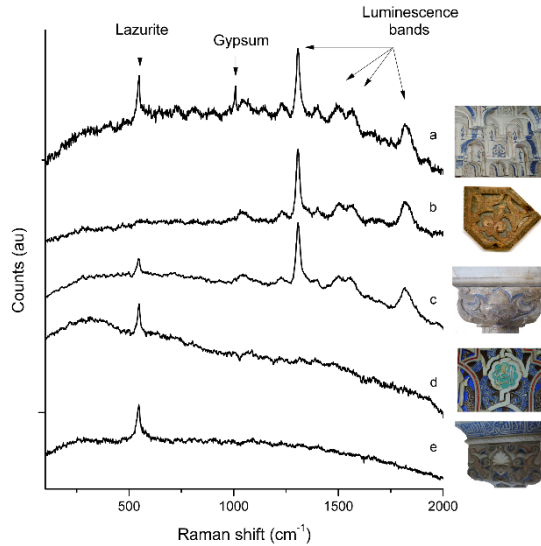
As can be seen in Figure 7, there is a good correlation ( $R^2 = 0.9057$ ) between the results for the band at  $548\text{ cm}^{-1}$  and the colorimetric parameter  $b^*$ , which is a measurement of the blue tonality of the samples. A certain relationship ( $R^2 = 0.7627$ ) is also obtained between the percentage of pixels above the threshold for the luminescence band ( $1286\text{ cm}^{-1}$ ) and the amount of diopside obtained by XRD (Figure 7b), showing that the lower the pigment quality, the greater the diopside mineral content and the higher the intensity of this luminescence band. Although these results are promising, the sample set is very limited and further studies have to be performed to confirm the correlations, especially taking into account the heterogeneity of natural lapis lazuli sources.



**Figure 7.** Graphs showing the correlation between the percentage of pixels containing (a) the 548 cm<sup>-1</sup> band vs b\* parameter of CIELAB and (b) the 1286 cm<sup>-1</sup> band vs the content (%) of diopside mineral for each sample.

### 3.3 Application to the investigation of historical decorations

Ultramarine can be found in different decorative revetments of the Alhambra, including polychrome plasterwork in domes, decorated marble capitals and polychrome carpentry. Different decorative motifs showing blue colour (with distinct colour hue) were investigated in order to compare their Raman spectra and identify whether the employed pigment was natural or synthetic. In some cases, there was information from historical sources about the origin of the pigment whereas in other cases not. In Figure 8, a summary of the obtained results from in situ measurements is presented, including a representative image of the decorative motifs.

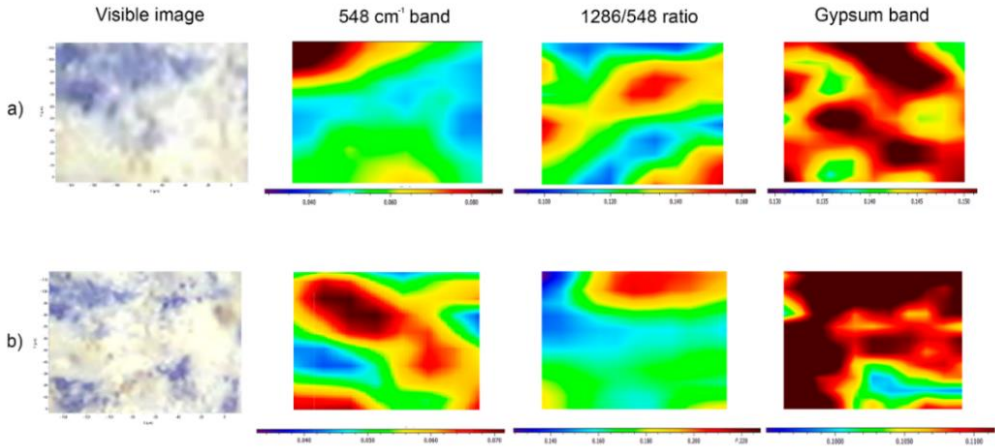


**Figure 8.** In situ Raman spectra registered by using 785 nm laser excitation in different rooms of the Alhambra Monumental Ensemble. Different supports were considered being plasterwork (a, Hall of the Kings, and d, Room of the Beds), wooden ceilings (b, Hall of the Abencerrages) and marble capitals (c and e, Hall of the Mexuar). Spectra were stacked for better visualization and linked to the images of the decorative motifs. Both natural and synthetic ultramarine were found.

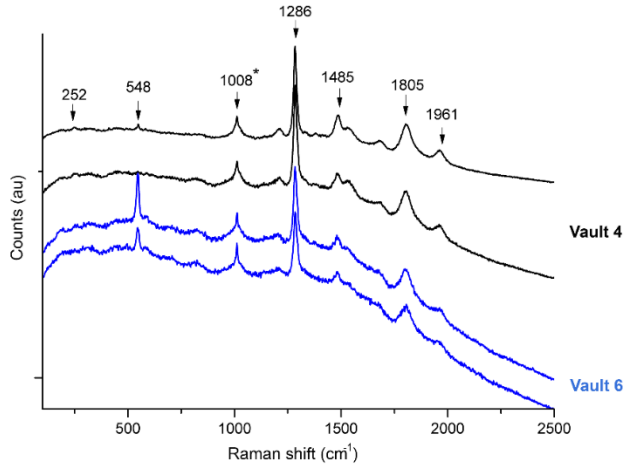
The decorations under study were in very different conservation conditions. Some motifs showed intense and bright blue colour, whereas in other cases the blue pigment was partially detached or covered with layers of dirt. Raman spectra recorded allowed a straightforward distinction between natural and synthetic ultramarine blue thanks to the luminescence bands in the region 1200-2000  $\text{cm}^{-1}$ . Natural ultramarine blue was found in most of the spaces investigated, including plasterwork decorations of the mocarabes (stalactites-like) domes of the Hall of the Kings, marble capitals of several courts and halls and the polychrome wooden ceiling of the Hall of the Abencerrages. Differences in the relative intensity of the lazurite/luminescence bands in the spectra of the natural ultramarine blue were also found, that could be related to the quality of the

pigments employed. Particularly in the case of the wooden ceiling, the  $548\text{ cm}^{-1}$  band is barely recognized, whereas the luminescence bands appearing between  $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  are very intense. In the case of the marble capitals, even though the luminescence bands are clearly visible, the main band of lazurite appears always with a higher intensity revealing the use of a better quality pigment. The synthetic version of ultramarine was the only pigment detected in the plasterwork decorations of the Room of the Beds. This finding is in agreement with the historical knowledge about the monument since this Hall was completely redecorated by the architect Rafael Contreras´ in the 19th century <sup>[48]</sup>. Furthermore, synthetic ultramarine blue was also the pigment employed in the colour reintegration of lost parts carried out in one of the marble capitals of the Hall of the Mexuar at the end of the 20th century.

Although this non-invasive approach is the most adequate for the investigation of historical pigments, we also had the possibility of studying two fragments of plasterwork with blue decoration that were detached during the intervention of the Hall of the Kings. Hyperspectral Raman images were registered with similar measurement conditions to the ones with powder commercial pigments. Results can be observed in Figure 9 and typical Raman spectra are depicted in Figure S3. The visible images show a very heterogeneous distribution of blue and white areas but in this case, we must take into account the contribution of the gypsum support on which the pigment was applied.



**Figure 9.** Visible images of the two small historical decorations from vaults (a) 4 and (b) 6 of the Hall of the Kings samples and corresponding distribution maps of  $548\text{ cm}^{-1}$  intensity band, the ratio  $1286/548\text{ cm}^{-1}$  and the gypsum band ( $1008\text{ cm}^{-1}$ ) recorded with  $785\text{ nm}$  laser excitation source.



**Figure S3.** Single Raman spectra acquired in different blue zones of the two small historical decorations from vaults 4 (black) and 6 (blue) of the Hall of the Kings by using  $785\text{ nm}$  excitation source. Spectra were stacked for better visualization.

\*=Gypsum band

The analysis in those samples is much more complex than the one with commercial pigments, as the pigment is not homogeneously distributed and white areas can correspond not only to accessory minerals in lapis lazuli but also to gypsum support. In fact, the distribution of the gypsum band ( $1008\text{ cm}^{-1}$ ) is all over the sample image. In order to estimate the quality of the pigment employed in these decorations, we calculated the percentage of pixels above and below the threshold in the same way than for the commercial pigments. Results for the samples of vault 6 (60.8% and 98.3% for  $548$  and  $1286\text{ cm}^{-1}$ , respectively) were very similar to those obtained for the sample NU-3, which is a medium quality pigment. The much lower percentage of pixels of lazurite band (9.1 %) in the case of the sample from vault 4, does not fit with any of the studied pigments. This can be due to the use of a much lower quality pigment or even the use of ground lapis lazuli without purification. Another possible explanation could be the partial detachment of the lazurite particles while impurities remains in the decoration showing the characteristic luminescence pattern. In any case, it is clear that luminescent impurities can vary a lot in historical samples depending on the sources of natural ultramarine blue and on the employed purification method. Consequently, in order to understand if it would be possible to establish the quality of the natural ultramarine blue as the basis of its luminescent signal, a larger number of historical samples should be considered in future research. This would allow to study and characterize the amounts and types of luminescent impurities that can be present in the different degrees of quality of natural ultramarine blue.

#### 4.- Conclusions

The characteristic pattern of luminescence bands emerging in the zone between 1200-2000  $\text{cm}^{-1}$  when 785 nm laser excitation is used to record the Raman spectra of natural ultramarine blue pigments allows a clear differentiation from synthetic ones. This information can be obtained simultaneously with Raman signatures and, when using microscopy, it is useful to extract information about sample heterogeneities in the form of hyperspectral microimages. Spatial distribution of the lazurite characteristic band at 548  $\text{cm}^{-1}$  and the luminescence features in natural pigments of different qualities clearly revealed the relationship between the latter and the impurities present in higher proportion in the lowest quality pigments. Furthermore, the luminescence of the number of pixels of selected bands over a certain threshold can be used as a purity criterion and it is also related to colorimetric parameters.

Since natural ultramarine blue pigments were traditionally prepared from finely ground lapis lazuli, their differentiation from synthetic pigments has been mainly based in the detection of analytical signatures of other components of the rock matrix either elements (Ca, Mg and trace elements) or minerals like calcite, diopside, wollastonite, etc. Here, the information obtained by XRF analysis also showed huge differences in the content of some elements, mainly Mg and Ca between natural and synthetic samples. Furthermore, the amount of Ca is significantly increasing as the quality of the natural pigments decreases from the purest one to ultramarine ash. For example, diopside was clearly identified by XRD in natural pigments, However, the analysis of standard pigments is a distant analogy to real samples, and when dealing, for instance, with wall paintings, interferences from substrate and ground preparation layers typically composed of calcite, gypsum and/or different earth materials, can be important. On the contrary, the luminescent emission observed seems to be unique to

minerals accompanying genuine lazurite. Therefore, the proposed approach is able to easily differentiate natural ultramarine blue from synthetic even in presence of complex grounds like those found in the Alhambra monument.

### **Acknowledgements**

Authors would like to acknowledge to FQM-363 Research group, CICT of the Universidad de Jaén and Research project BIA2017-87131-R from the Ministry of Economy and Competitiveness for technical and financial support. M. González-Cabrera and P. Arjonilla also acknowledge the FPU15/03119 (Spanish Ministry of Education, Culture and Sport) and the BES-2014-068793 (Ministry of Economy and Competitiveness) fellowships, respectively. Authors are also grateful to the Council of Alhambra and Generalife for their support. M.T. BRANDAO ESPAÑA S.L is acknowledged for the access to the XploRA Plus Horiba instrument.

### **References**

- [1] J. Plesters, Ultramarine Blue, Natural and Artificial, in: Ashok Roy (Ed.), *Artist. Pigment. A Handb. Their Hist. Charact.*, 1993: 1–232.
- [2] M.C. Gaetani, U. Santamaria, C. Seccaroni, The Use of Egyptian Blue and Lapis Lazuli in the Middle Ages - The Wall Paintings of the San Saba Church in Rome, *Stud. Conserv.* 49 (2004) 13–22.
- [3] A.A. Finch, H. Friis, M. Maghrabi, Defects in sodalite-group minerals determined from X-ray-induced luminescence, *Phys. Chem. Miner.* 43 (2016) 481–491.
- [4] D. Arieli, A. D. E. W. Vaughan, D. Goldfarb, New Synthesis and Insight into the Structure of Blue Ultramarine Pigments, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5776–5788.

- [5] I. Hassan, R.C. Peterson, H.D. Grundy, The structure of lazurite, ideally  $\text{Na}_6\text{Ca}_2(\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24})\text{S}_2$ , a member of the sodalite group, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 41 (1985) 827–832.
- [6] P. Ballirano, Mineralogical characterization of the blue pigment of Michelangelo's fresco "The Last Judgment," *Am. M.* 91 (2006) 997–1005.
- [7] D. Reinen, G.-G. Lindner, The nature of the chalcogen colour centres in ultramarine-type solids, *Chem. Soc. Rev.* 28 (1999) 75–84.
- [8] Cennino Cennini, *Il libro dell'arte*, Le Monnier, 1859.
- [9] M. Favaro, A. Guastoni, F. Marini, S. Bianchin, A. Gambirasi, Characterization of lapis lazuli and corresponding purified pigments for a provenance study of ultramarine pigments used in works of art, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2195–2208.
- [10] C.M. Schmidt, M.S. Walton, K. Trentelman, Characterization of Lapis Lazuli Pigments Using a Multitechnique Analytical Approach: Implications for Identification and Geological Provenancing, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8513–8518.
- [11] A. Re, A. Lo Giudice, D. Angelici, S. Calusi, L. Giuntini, M. Massi, G. Pratesi, Lapis lazuli provenance study by means of micro-PIXE, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 269 (2011) 2373–2377.
- [12] A. Banerjee, T. Häger, On some Crystals of "Lapis Lazuli," *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. A J. Phys. Sci.* 47 (1992) 1094–1095.
- [13] I. Osticioli, N.F.C. Mendes, A. Nevin, F.P.S.C. Gil, M. Becucci, E. Castellucci, Analysis of natural and artificial ultramarine blue pigments using laser induced breakdown and pulsed Raman spectroscopy, statistical analysis and light microscopy, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Bio. Spectrosc.* 73 (2009) 525–531.

- [14] R. Nečas, D. Všianský, Ultramarine – Not Just a Pigment of Traditional Folk Architecture Plasters, *Procedia Eng.* 151 (2016) 114–118.
- [15] E. Climent-Pascual, R. Sáez-Puche, A. Gómez-Herrero, J.R. de Paz, Cluster ordering in synthetic ultramarine pigments, *Microporous Mesoporous Mater.* 116 (2008) 344–351.
- [16] C.E. Silva, L.P. Silva, H.G.M. Edwards, L.F.C. de Oliveira, Diffuse reflection FTIR spectral database of dyes and pigments, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 2183–2191.
- [17] Q.G. Zeng, G.X. Zhang, C.W. Leung, J. Zuo, Studies of wall painting fragments from Kaiping Diaolou by SEM/EDX, micro Raman and FT-IR spectroscopy, *Microchem. J.* 96 (2010) 330–336.
- [18] C. Miliani, A. Daveri, B.G. Brunetti, A. Sgamellotti, CO<sub>2</sub> entrapment in natural ultramarine blue, *Chem. Phys. Lett.* 466 (2008) 148–151.
- [19] M.R. Derrick, J.M. Landry, *Scientific Tools for Conservation Infrared Spectroscopy in Conservation Science*, Los Angeles, 1999.
- [20] G.D. Smith, R.J. Klinshaw, The presence of trapped carbon dioxide in lapis lazuli and its potential use in geo-sourcing natural ultramarine pigment, *J. Cult. Herit.* 10 (2009) 415–421.
- [21] M. Aceto, A. Agostino, G. Fenoglio, M. Picollo, Non-invasive differentiation between natural and synthetic ultramarine blue pigments by means of 250–900 nm FORS analysis, *Anal. Methods.* 5 (2013) 4184–4189.
- [22] A.R. De Torres, S. Ruiz-Moreno, A. López-Gil, P. Ferrer, M.C. Chillón, Differentiation with Raman spectroscopy among several natural ultramarine blues and the synthetic ultramarine blue used by the Catalanian modernist painter Ramon Casas i Carbó, *J. Raman Spectrosc.* 45 (2014) 1279–1284.

- [23] R. Salzer, H.W. Siesler, eds., *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009.
- [24] H.F. Grahn, P. Geladi, *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*, J. Wiley, 2007.
- [25] P. Arjonilla, A. Domínguez-Vidal, M.J. de la Torre López, R. Rubio-Domene, M.J. Ayora-Cañada, In situ Raman spectroscopic study of marble capitals in the Alhambra monumental ensemble, *Appl. Phys. A*. 122 (2016) 1014.
- [26] A. Domínguez-Vidal, M. Jose De La Torre-Lopez, R. Rubio-Domene, M.J. Ayora-Cañada, In situ noninvasive Raman microspectroscopic investigation of polychrome plasterworks in the Alhambra, *Analyst*. 137 (2012) 5763–5769.
- [27] P. Arjonilla, M.J. Ayora-Cañada, R. Rubio Domene, E. Correa Gómez, M.J. de la Torre-López, A. Domínguez-Vidal, Romantic restorations in the Alhambra monument: Spectroscopic characterization of decorative plasterwork in the Royal Baths of Comares, *J. Raman Spectrosc.* 50 (2019) 184–192.
- [28] P. Arjonilla, A. Domínguez-Vidal, E. Correa-Gómez, M.J. Domene-Ruiz, M.J. Ayora-Cañada, Raman and Fourier transform infrared microspectroscopies reveal medieval Hispano–Muslim wood painting techniques and provide new insights into red lead production technology, *J. Raman Spectrosc.* 50 (2019) 1537–1545.
- [29] P. Arjonilla, A. Domínguez-Vidal, E. Correa-Gómez, R. Rubio-Domene, A. Lluveras-Tenorio, M.J. Ayora-Cañada, M.P. Colombini, Characterization of organic materials in the decoration of ornamental structures in the Alhambra monumental ensemble using gas-chromatography/mass spectrometry (GC/MS), *Microchem. J.* 140 (2018) 14–23.

- [30] A. Dominguez-Vidal, M.J. De La Torre-López, M.J. Campos-Suñol, R. Rubio-Domene, M.J. Ayora-Cañada, Decorated plasterwork in the Alhambra investigated by Raman spectroscopy: Comparative field and laboratory study, *J. Raman Spectrosc.* 45 (2014) 1006–1012.
- [31] C. Cardell, L. Rodriguez-Simon, I. Guerra, A. Sanchez-Navas, Analysis of Nasrid polychrome carpentry at the Hall of the Mexuar Palace, Alhambra complex (Granada, Spain), combining microscopic, chromatographic and spectroscopic methods, *Archaeometry.* 51 (2009) 637–657.
- [32] Hunter Lab, CIE L\*a\*b\* Color Scale. Insight on color, *Apl. Note.* 8 (1996).
- [33] M. Etter, R.E. Dinnebier, A Century of Powder Diffraction: a Brief History, *Zeitschrift Für Anorg. Und Allg. Chemie.* 640 (2014) 3015–3028.
- [34] D. Reinen, G.-G. Lindner, The nature of the chalcogen colour centres in ultramarine-type solids, *Chem. Soc. Rev.* 28 (1999) 75–84.
- [35] R.J.H. Clark, T.J. Dines, M. Kurmoo, On the nature of the sulfur chromophores in ultramarine blue, green, violet, and pink and of the selenium chromophore in ultramarine selenium: characterization of radical anions by electronic and resonance Raman spectroscopy and the determination of their excited-state geometries, *Inorg. Chem.* 22 (1983) 2766–2772.
- [36] M. Bacci, C. Cucci, E. Del Federico, A. Ienco, A. Jerschow, J.M. Newman, M. Picollo, An integrated spectroscopic approach for the identification of what distinguishes Afghan lapis lazuli from others, *Vib. Spectrosc.* 49 (2009) 80–83.
- [37] L. Goncalves, D. Moronta, F. Ocanto, C. Linares, Synthesis of ultramarine blue type pigments using several raw materials, *Rev. La Fac. Ing. Univ. Cent. Venez.* 25 (1986) 25–31.

- [38] S. Kowalak, M. Pawłowska, M. Miluška, M. Stróżyk, J. Kania, W. Przystajko, Synthesis of ultramarine from synthetic molecular sieves, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 101 (1995) 179–185.
- [39] R.J.H. Clark, M.L. Curri, C. Laganara, Raman microscopy: The identification of lapis lazuli on medieval pottery fragments from the south of Italy, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 53 (1997) 597–603.
- [40] P. Colombari, A. Tournié, M.C. Caggiani, C. Paris, Pigments and enamelling/gilding technology of Mamluk mosque lamps and bottle, *J. Raman Spectrosc.* 43 (2012) 1975–1984.
- [41] O. El Jaroudi, E. Picquenard, A. Demortier, J.P. Lelieur, J. Corset, Polysulfide anions II: Structure and vibrational spectra of the  $S_4^{2-}$  and  $S_5^{2-}$  anions. Influence of the cations on bond length, valence, and torsion angle, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 2593–2603.
- [42] R.R. Hark, R.J.H. Clark, P.M. Champion, L.D. Ziegler, Raman Microscopy of Diverse Samples of Lapis Lazuli at Multiple Excitation Wavelengths, *AIP Conf. Proc.* 1267 (2010) 315–316.
- [43] E.M.A. Ali, H.G.M. Edwards, Analytical Raman spectroscopy in a forensic art context: the non-destructive discrimination of genuine and fake lapis lazuli., *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* 121 (2014) 415–419.
- [44] M. Favaro, A. Guastoni, F. Marini, S. Bianchin, A. Gambirasi, Characterization of lapis lazuli and corresponding purified pigments for a provenance study of ultramarine pigments used in works of art, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2195–2208.

- [45] M. Prencipe, L. Mantovani, M. Tribaudino, D. Bersani, P.P. Lottici, The Raman spectrum of diopside: a comparison between ab initio calculated and experimentally measured frequencies, *Eur. J. Miner.* 24 (2012) 457–464.
- [46] G.C. Serghiou, W.S. Hammack, Pressure-induced amorphization of wollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ ) at room temperature, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 9830–9834.
- [47] A.S. Marfunin, *Spectroscopy, Luminescence and Radiation Centers in Minerals*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1979.
- [48] A. González Pérez, Reconstructing the Alhambra: Rafael Contreras and Architectural Models of the Alhambra in the Nineteenth Century, *Art Transl.* 9 (2017) 29–49.

- ***Cubo multisensor por fusión de imágenes hiperespectrales para el microanálisis de pigmentos azul ultramar***

En este trabajo se profundiza en la caracterización del pigmento azul ultramar natural, obtenido a partir de lapislázuli, mediante la fusión de información obtenida con diferentes técnicas analíticas. Para ello, se aplicó la estrategia de combinar imágenes hiperespectrales registradas sobre la misma muestra empleando técnicas de análisis molecular, elemental e isotópico como son la microespectroscopía Raman, la microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de dispersión de energía (SEM-EDX), la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente y ablación láser (LA-ICP-MS), respectivamente. De esta forma, se consigue una mayor cantidad de información accediendo a elementos no sólo mayoritarios, sino también presentes a nivel de trazas, y combinando la información elemental con la estructural proporcionada por la espectroscopía Raman. Así, se pretende profundizar en el papel de las impurezas en las calidades del pigmento azul ultramar. Además, este caso permite ilustrar el potencial analítico que supone el empleo de esta metodología emergente, la imagen hiperespectral multimodal, con la que podrían resolverse retos analíticos inalcanzables mediante del empleo de una única técnica.

En este capítulo se incide en la metodología de fusión de la información para construir un cubo multiespectral que combina en un único archivo editable las imágenes hiperespectrales obtenidas de forma individual con cada técnica analítica. Para poder aplicar esta combinación, deben elegirse técnicas no destructivas con el fin de poder analizar la misma zona muestra de manera sucesiva en cada una de ellas. Es posible emplear una técnica que destruya la muestra, pero debe utilizarse siempre al final de la serie. Es el caso de la ablación

## Discusión conjunta de resultados

láser (LA-ICP-MS), técnica que puede considerarse microdestruccion, con profundidades de ablación entre 0.4-0.7  $\mu\text{m}$ . Además, es importante que la resolución espacial de todas las medidas sea comparable.

Aunque esta metodología puede suponer importantes ventajas para el estudio de materiales heterogéneos, su uso no está aún muy extendido (debido, entre otras cosas, a la dificultad experimental y de tratamiento de datos post-adquisición que requiere). Por ello, en la actualidad pueden encontrarse pocos estudios que hagan referencia a la creación de un cubo de datos multisensor, presentando los únicos existentes una combinación de dos o, como mucho, tres técnicas de análisis complementarias.

En este estudio, se presenta el potencial de la unión de cuatro técnicas de adquisición de imágenes hiperespectrales para el análisis de pigmentos de azul ultramar de diferente naturaleza y calidad. Durante la etapa de construcción del archivo multimodal se escoge una de las imágenes de las técnicas empleadas como imagen de referencia, y todas las demás deben ajustarse a la misma. En este proceso, se lleva a cabo una calibración (más o menos compleja según el caso y la calidad de la imagen obtenida) para el alineamiento de las imágenes, orientando espacialmente cada una de ellas, de modo que se defina perfectamente la zona final de análisis común entre todas ellas. A continuación, se seleccionan una serie de descriptores espectrales que formarán el cubo multiespectral, extrayendo la información más relevante de cada técnica, y disminuyendo la dimensionalidad de los datos. Aplicando PCA y HCA a este cubo de datos multisensor puede obtenerse información completa sobre la composición química del material en estudio. Así, el empleo de esta metodología permitió observar la distribución del mineral lazurita ( $\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_n$ ) en todas las muestras estudiadas, disminuyendo su abundancia en las muestras de menor calidad (menos purificadas) gracias al agrupamiento de sus componentes

elementales y las bandas Raman que la caracterizan. También pudieron caracterizarse minerales accesorios en la composición de muestras naturales de poca calidad, como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Más compleja resultó la caracterización de otras fases minerales accesorias, ya que se componen de distintos silicatos, los cuales son dispersores Raman poco eficaces y comparten una composición elemental muy semejante. Por último, se han obtenido agrupamientos espectrales que parecen confirmar la relación existente entre las bandas de luminiscencia observadas en el espectro Raman de pigmentos de baja calidad y la presencia de trazas de elementos de transición, como pueden ser titanio, vanadio, cromo, manganeso e hierro en la composición química de las muestras analizadas. Por el contrario, parece descartarse la relación entre dichos fenómenos de luminiscencia y la presencia de algunos elementos de los grupos de las tierras raras.

### **Resultados pendientes de publicación**

#### **“Multisensor hyperspectral imaging approach for the microchemical analysis of ultramarine blue pigments”**

Trabajo en colaboración

- Universidad de Jaén, Departamento de Química Física y Analítica: González-Cabrera, M., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.

- TU Wien, Institute of Chemical Technologies and Analytics: Wieland, K., Brunnbauer, L., Eitenberger, E., Bleier, A., Lendl, B.

## **Abstract**

In this work, we present a multisensor hyperspectral approach for the characterization of ultramarine blue, a very valuable historical pigment, at the microscopic scale combining information at elemental and molecular level. In order to do that, Raman Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X Ray Spectroscopy (SEM-EDX), Secondary Ion-Mass Spectrometry (SIMS) and Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) were employed for the analysis of samples of both natural and synthetic pigments. The combination of hyperspectral images registered by each of these analytical techniques in a single hypercube, where the pixels of the various spectral components are aligned on top of each other, provides a highly sensitive and powerful tool that undoubtedly aids to understand spectral differences, luminescence effects and spatial heterogeneity occurring in samples of different quality of the pigment. In order to reduce data dimensionality, selected spectral descriptors that define an accurate statistical interpretation of the multisensor data have been defined. Using chemometrics methods like PCA and HCA to cluster spectral responses with similar spatial distribution, the decrease of lazurite, the mineral responsible for the blue color of the pigment, is observed for low quality natural pigments. Furthermore, the presence of impurities like pyrite is detected although the clear identification of other mineral phases with silicate basis is more difficult. Finally, we demonstrate the relationship existing between the presence of certain transition metals and the luminescence bands arising in Raman spectra of natural samples when 785 nm laser source is used.

## 1.- Introduction

Ultramarine blue has been extraordinarily valued since Ancient time<sup>1</sup> and its uses range from many sorts of paintings in the world of art, to medicine or some cultural periapts<sup>2</sup>. This pigment takes its bright and characteristic blue color from lazurite ( $\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_n$ )<sup>3,4</sup> a mineral present in the lapis lazuli semi-precious rock and included within the aluminosilicate group<sup>5</sup>. Owing the same chemical structure as sodalite, ( $\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{Cl}_2$ )<sup>6</sup>, it holds central cavities commonly reported as  $\beta$ -cages<sup>7,8</sup>.  $\text{AlO}_4$  and  $\text{SiO}_4$  tetrahedra are located within them, composing an interconnected anionic and cationic 3-dimensional network<sup>9,10</sup>. Among all the chromophores radicals that have been detailed to be trapped in those cages<sup>11</sup>, trisulfur one ( $\text{S}^{3-\cdot}$ ) is considered the main responsible for the recognizable blue tone of the pigment, being the contributions of disulfur ( $\text{S}^{2-\cdot}$ ) and tetrasulfur ( $\text{S}^{4-\cdot}$ ) radicals also relevant when noticing yellow and red hues, respectively<sup>12</sup>.

After the synthesis of an ultramarine blue version in 1828 by Jean-Baptiste Guimet<sup>13</sup>, the distinction between the natural and synthetic pigments became an analytical challenge, since it may involve authentication issues and the recognition of subsequent restoration interventions. Many studies focusing on this topic can be found, employing several analytical techniques as pulsed laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), fiber optics reflectance spectroscopy (FORS)<sup>14</sup>, and Raman<sup>15,16</sup> and FTIR spectroscopies<sup>17,18</sup>. One of the most simple and efficient ways to distinguish natural from synthetic ultramarine pigments, working even in a non-invasive way as we demonstrated recently<sup>19</sup>, is to consider a group of bands that emerge in the range between 1200-2000  $\text{cm}^{-1}$  when the Raman spectra of the pigment is recorded using 785  $\text{cm}^{-1}$  excitation. These strong features were already observed and proved to not be Raman scattering

bands by Schmidt et al.<sup>20</sup>, who also hypothesized they were luminescence bands of accessory minerals carrying transition metal impurities. However, its origin needs further investigation since other hypotheses are also plausible. Thus, these narrow-line emissions, whose widths (0.1–0.3 nm, or a few  $\text{cm}^{-1}$ ) are on the order of typical Raman-band widths, strongly resemble those reported for rare earth elements (REE) incorporated in crystalline materials<sup>21</sup>. Our previous studies using Raman micro-imaging on ultramar pigments with different qualities and hues revealed that the luminescence emission, although it was clearly associated with colourless areas, it concentrated in certain “hotspots”, not being homogeneously distributed.

Hyperspectral imaging (HSI) is nowadays a commonly employed technique that collects both spatial information (coordinates  $x$  and  $y$ ) and spectral data ( $\lambda$ ) of the sample in order to build the so-called three dimensional hypercube. Thus, it is frequently used for imaging purposes, since it can provide spatial distribution of chemical components and it can aid to solve complexity and heterogeneity difficulties of a given sample or a special area of interest. In the past fifteen years, the study of chemical composition at micro level by means of hyperspectral spectroscopic techniques has quickly spread<sup>22,23</sup>. However, when the goal is to obtain a faithful and robust knowledge of the sample, the results registered by a unique analytical method may be not enough<sup>24</sup>. For this reason, the combination of complementary techniques on a single sample can solve analytical challenges that are unattainable otherwise. In this work, we propose to further characterize ultramarine pigments by using multimodal hyperspectral imaging which is also known as a multisensor hyperspectral imaging (MSHSI). To do that, all the hyperspectral imaging datasets separately acquired via the desired spectroscopic techniques, have to be joined in the same and unique file. Consequently, their spatial resolution must be comparable, they should have been recorded in the

same sample area and, inevitably, they all have to manifest non-destructive nature. Thus, the data fusion step will become possible as long as every image is properly spatially adjusted and all pixels offer the spectral information of the consecutive analytical techniques employed in the analysis. Although this methodology offers clear advantages when dealing with complex and heterogeneous samples, its use is still not very widespread. In fact, only a few studies reporting the employment of MSHSI approach can be found nowadays. Whereas the majority of studies focus on the comprehensive analysis of biological samples, such as cells<sup>25,26</sup>, tissues<sup>27,28,29</sup> or tumours<sup>30,31</sup>, the rest of them either insist on the analytical potential of this technique<sup>32,33</sup> or exploit the benefits of its combination with chemometrics<sup>34,35</sup>.

Here, we evaluate the feasibility of MSHSI analysis for the characterization of ultramarine, a pigment of high historical and pictorial interest, at the microscopic level. With this aim, we combine hyperspectral images registered by means of four analytical techniques, namely Raman Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X Ray Spectroscopy (SEM-EDX), Secondary Ion-Mass Spectrometry (SIMS) and Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) in order to obtain both elemental and molecular information.

## **2.- Materials and methods**

### **2.1 Samples**

Five ultramarine blue pigments purchased from Kremer Pigmente GmbH & Co. KG (Germany) in the form of powders were analysed. The codes and descriptions are included in Table 1. Four natural samples (NU) of different quality prepared from lapis lazuli rock according to traditional procedures, as

stated by the supplier, as well as a synthetic one (SU) were considered. Pigment samples and KBr of spectroscopic grade were mixed in 1:1 ratio and pressed to form a pellet. The same area of each pellet was examined with all analytical techniques. A pure KBr pellet was used as reference.

**Table 1.** Natural and synthetic ultramarine blue pigments employed in this study.

Sample code	Kremer name	Kremer reference	Description
NU-1	Purest <i>lapis lazuli</i>	10530.12010.315	Natural ultramarine, highest quality
NU-2	<i>Lapis lazuli</i> , good quality	10520.12010.104	Natural ultramarine, good quality
NU-3	<i>Lapis lazuli</i> , medium quality	10510.12010.104	Natural ultramarine, medium quality
NU-A	Ultramarine ash	10580.12050.104	By-product
SU	Ultramarine blue, dark	45010.12100.136	Synthetic pigment

## 2.2. Instrumentation

Hyperspectral point-to-point scanning method was used as the main tool for obtaining spectral and spatial information of the samples in every analytical technique implied in the study. In this method, the operation mode consists of the recording of the spectrum of a single pixel within the chosen area at a time<sup>23</sup>.

Raman analysis was carried out by using a confocal microscope alpha300 R<sup>+</sup> from WITec (WITec GmbH, Germany). For the measurements, 785 nm laser source (10 mW) and 10X objective (Zeiss, 0.25 NA) coupled to a 100  $\mu\text{m}$  fiber were used. A total area of 500  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$  containing 250 x 250 pixels of sample (step size of 2  $\mu\text{m}$ ) was measured for each pigment. Raman signals were

detected using a 300 mm spectrograph with 600 g/mm grating coupled with a charged couple device (CCD). Number of scans and acquisition time were set to 1 and 1.5 seconds per scan.

SEM-EDX measurements were performed by using an electron microscopy FEI Quanta 200 (TU-Wien, Institute of Chemical Technologies and Analytics, Austria) coupled to an EDAX spectroscope. By employing a 500X magnification, a total area of 597  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$  was registered.

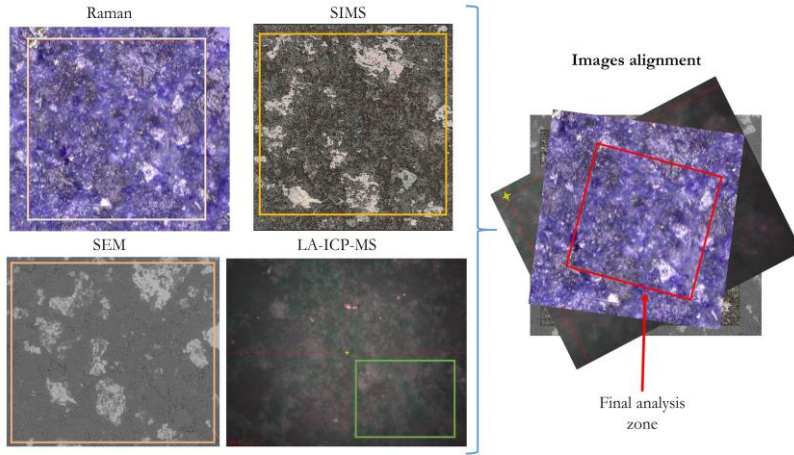
For the SIMS analysis, a ToF-SIMS<sup>5</sup> spectrometer (IONTOF GmbH, Münster, Germany) equipped with a 25 keV bismuth liquid metal ion gun (LMIG) was employed. Data was obtained by operating in positive-ion mode and a gentle oxygen sputtering process of 3 seconds (crater size 1000  $\mu\text{m}$  x 1000  $\mu\text{m}$  with 2 kV O<sub>2</sub> gun) was carried out prior to the measurements in order to activate the surface and enhance the signal of the positive ions. A specific sample area was chosen, of which first was recorded a mass spectrum, and further switched to the high lateral resolution modus to scan images of the chosen sample area. The primary ion beam settings were as follows: region of interest 500  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$ , Bi<sup>1+</sup>, 25 keV, raster mode saw tooth, raster size 1024 by 1024 pixels and 32 scans.

Finally, LA-ICP-MS measurements were carried out using an ESI NWR213 (Fremont, CA) laser ablation system operating at a wavelength of 213 nm coupled to an iCAP Qc ICP-MS system (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) using PTFE tubing. The samples were ablated under a constant stream of helium (0.65 L/min). Argon was used as a make-up gas (1 L/min) before introducing the aerosol to the ICP-MS. Tuning of the instrument was carried out daily for maximum <sup>115</sup>In signal using a NIST612 glass standard (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD). Data was

collected using Qtegra 2.10 provided by the manufacturer of the instrument. Each sample was analyzed using a laser spot size of 8  $\mu\text{m}$ . 100 parallel line scans with a length of 1000  $\mu\text{m}$  each and a distance of 8  $\mu\text{m}$  between each line were measured on each sample. Therefore, a total area of 1000  $\mu\text{m}$  x 800  $\mu\text{m}$  with a lateral resolution of 8  $\mu\text{m}$  was analyzed. LA-ICP-MS mapping is a 'slightly' destructive technique, with ablation depth from 0.4 to 0.7  $\mu\text{m}$  mostly depending on repetition rate<sup>36</sup>. For this reason, it was employed on the samples after finishing the rest of the analysis.

### **2.3. Multimode hyperspectral imaging data fusion procedure**

Data from the different analytical techniques were imported in ImageLab (Epina GmbH)<sup>37</sup> hyperspectral imaging software package, for spectral processing, fusion of the four HSI datasets and data treatment. Before the combination procedure, only Raman spectra were baseline corrected (by Eilers Algorithm with 7 iterations) and subjected to spike removal pre-processing. Each data set was first aligned in its own ImageLab file using the same high-resolution image of the sample (SEM image) for all spectral domains. Finally, a new file containing the four datasets already aligned was created by using the option "Combine hyperspectral images and create multi-sensor data", as can be observed in Figure 1. The result is a hyperspectral multisensor datacube for each of the samples, as previously reported by Lohninger et al<sup>24</sup>.

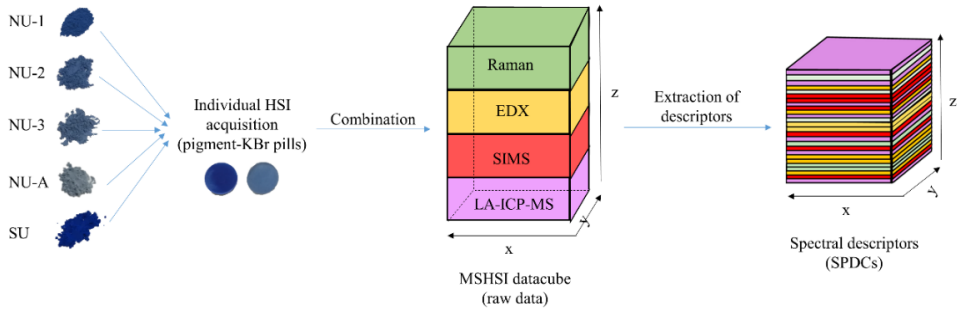


**Figure 1.** Images of the analyzed area of NU-2 sample with each of the individual techniques and final analysis zone resulting from the alignment of all measurements. Regions not contained in the red frame have to be masked and subtracted from the multisensor hyperspectral analysis

## 2.4. Spectral descriptors selection and chemometrics

In order to achieve an accurate statistical interpretation of the multisensor data, some spectral descriptors (SPDCs) were chosen (See Figure 2). In this way, specific and particular information is extracted from each of the data-cubes and spectral dimensionality is highly reduced. For the individual elements, isotopes and masses of EDX, LA-ICP-MS and SIMS datasets, respectively, the option “Intensity at cursor with no baseline correction” was selected. In the case of Raman dataset, the main bands detected in the spectra were chosen using the “correlation with a triangle template weighted by the peak area”. In Table 2, a summary including all the SPDCs for each technique can be seen.

## Discusión conjunta de resultados



**Figure 2.** Basic scheme of the hyperspectral imaging acquisition and the followed methodology for the multisensor datacube construction and spectral descriptors selection

**Table 2.** List of spectral descriptors chosen for each analytical technique employed in this study. \*= Interferences

Spectral descriptors (SPDCs)							
Raman/Luminiscence		EDX			SIMS		LA-ICP-MS
Band	Assignment	Element	Transition	E <sub>energy</sub> (KeV)	Ion	Mass (m/z)	Isotope
548 cm <sup>-1</sup>	Symmetric stretching vibration of S <sub>3</sub> <sup>-</sup>	O	Kα	0.525	Na <sup>+</sup>	22.99	<sup>27</sup> Al
585 cm <sup>-1</sup>	Asymmetric stretching of S <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Na	Kα	1.041	Mg <sup>+</sup> / <sup>25</sup> Mg <sup>+</sup>	23.98/24.98	<sup>39</sup> K
	Symmetric stretching of S <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Mg	Kα	1.254	Al <sup>+</sup>	26.98	<sup>141</sup> Pr
875 nm	Fluorescence emission	Br	Lα	1.481*	Si <sup>+</sup> / <sup>28</sup> Si <sup>+</sup> / <sup>29</sup> Si <sup>+</sup>	27.97/29.01/55.95	<sup>142</sup> Nd
888 nm	Fluorescence emission	Al	Kα	1.487*	P <sup>+</sup>	31.01	<sup>152</sup> Sm
895 nm	Fluorescence emission	Si	Kα	1.740	K <sup>+</sup> / <sup>41</sup> K <sup>+</sup>	38.94/40.98	
915 nm	Fluorescence emission	P	Kα	2.014	Ca <sup>+</sup> / <sup>44</sup> Ca <sup>+</sup>	39.96/43.97	
		S	Kα	2.308	Sc <sup>+</sup>	44.98	
		Cl	Kα	2.622	<sup>47</sup> Ti <sup>+</sup> / <sup>48</sup> Ti <sup>+</sup> / <sup>49</sup> Ti <sup>+</sup>	46.97/47.94/48.95	
		K	Kα	3.314	Fe <sup>+</sup> / <sup>57</sup> Fe <sup>+</sup>	55.95/56.97	
		Ca	Kα	3.692	Y <sup>+</sup>	89.03	
		Ti	Kα	4.511	Zr <sup>+</sup> / <sup>91</sup> Zr <sup>+</sup>	90.02/91.07	
		Cr	Kα	5.415	Pr <sup>+</sup>	141.08	
		Mn	Kα	5.889	<sup>151</sup> Eu <sup>+</sup> / <sup>153</sup> Eu <sup>+</sup>	151.06/153.09	
		Fe	Kα	6.404	Sm <sup>+</sup>	152.07	

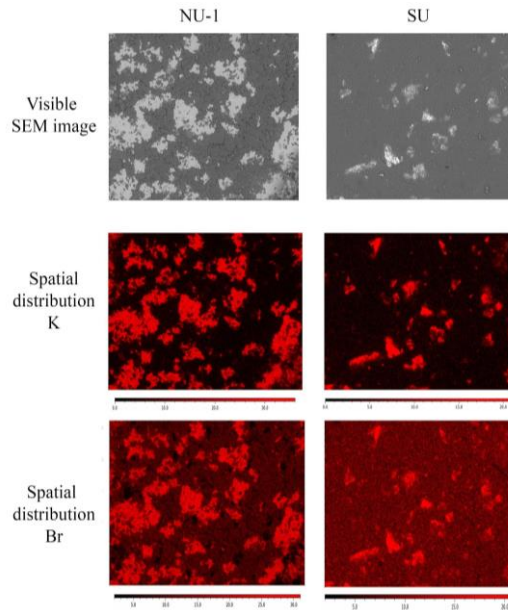
Using the selected multisensor spectral descriptors (SPDC), principal component analysis (PCA) was performed on the MSHSI datacube, after standardization to achieve proper scaling. Thus, each PC is described as a linear combination of the SPDCs. The cumulative explained variance, and the intercluster and intra-cluster distances were considered to select the PCs. Then, hierarchical cluster analysis (HCA) was performed on the loadings of these PCs. Hence, chemically correlated SPDCs can be linked to each other and be extracted as subclusters of the HCA.

### **3.- Results**

#### **3.1. Exploratory analysis**

Initially, a preliminary study was performed considering each technique individually. This preliminary study also aided to select the spectral descriptors for the construction of the multisensor hypercube.

First, we can clearly observe that the acquired SEM images in the backscattered electrons mode (BSE) the brightest zones (corresponding to elements with high atomic number) showed an almost perfect match with the spatial distribution of both K and Br in all the samples. The presence of these elements is related to sample preparation in the form of KBr pills. They appear, moreover, heterogeneously located within the total area of the measurements, as it can be seen in Figure S1. On the contrary, darkest areas of the BSE image correspond to the sample particles, are mainly composed of elements with lower atomic number. The smaller and more homogeneous particle size of the artificial pigment probably leads to better compaction in comparison with the coarser natural pigment.

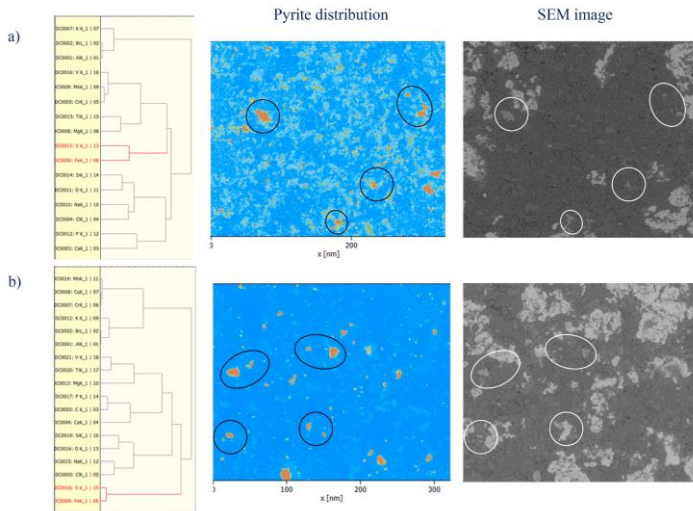


**Figure S1.** Visible SEM images and spatial distribution of K and Br elements for NU-1 and SU samples

HCA performed on EDX images also helped to detect the interference of Br from sample preparation on the identification of Al, due to the proximity of their respective  $L\alpha$  and  $K\alpha$  peaks. For this reason, the EDX spectral descriptor for Al was discarded.

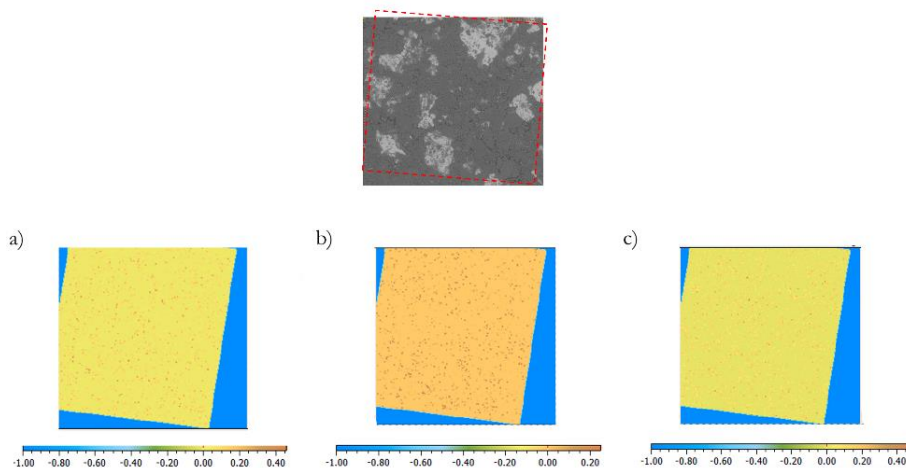
Employing EDX spectral descriptors, PCA was performed for each of the samples. Exploring the dendrograms obtained from HCA of the 6 first PCs (Figure 3) that account for a total variance of 60.82 %, it is clearly seen that Fe and S elemental contributions cluster together. These two elements concentrate in some of the bright areas of the SEM sample images (as marked by circles in Figure 3). This fact can be attributed to pyrite ( $FeS_2$ ) grains, a common impurity in natural lapislazuli<sup>38</sup>. Pyrite was detected in the natural samples except in the

purest one (NU-1), but not in the synthetic pigment. This is in agreement with previous works that reported pyrite being efficiently removed in the traditional pigment purification process<sup>38</sup>.



**Figure 3.** Fe-S cluster in HCA of the loadings of the PCA models, pyrite spatial distribution and SEM image of a) NU-2 and b) NU-3 samples

In the case of SIMS and LA-ICP-MS, we first checked the distribution maps of the different trace elements in order to evaluate if they were detected with enough sensitivity. Thus, when the distribution of the spectral descriptors in the images in false color revealed just noise, these SPDCs were excluded. Figure 4 shows the cases of  $P^+$ ,  $Y^+$  and  $^{49}Ti^+$  as examples of spectral descriptors lacking sensitivity.

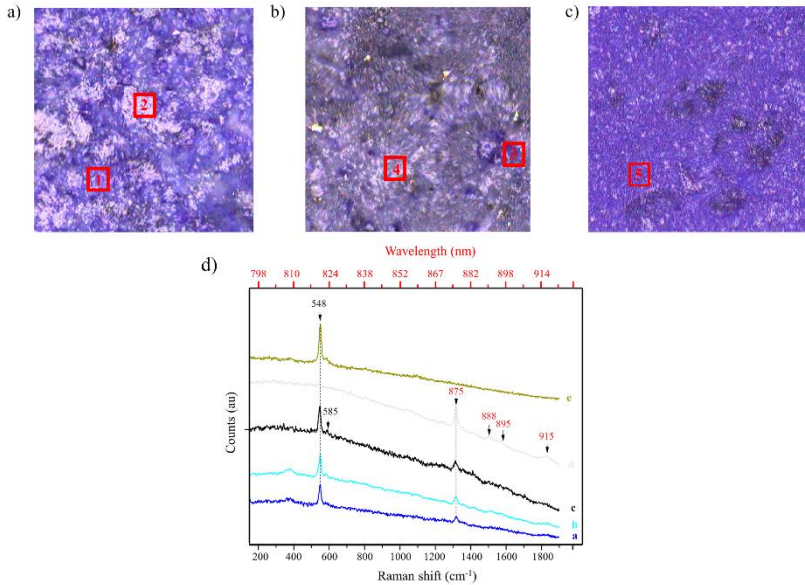


**Figure 4.** SEM image for alignment (calibration) of NU-2 sample (up) and spatial distribution of a)  $P^+$ , b)  $Y^+$  and c)  $^{49}Ti^+$  spectral descriptors

Finally, Raman hyperspectral microimages can add molecular information in order to analyse spectral differences between synthetic and natural ultramarine blue pigments. In Figure 5, single spectra of pure (NU-1), ash (NU-A) and synthetic (SU) samples are shown. They belong to the acquired individual Raman mappings and they were chosen considering distinct zones of their visible images (clear blue and white areas for the natural pigments and homogeneous blue for the synthetic one).

In all samples, the most prominent band of their Raman spectra is located at  $548\text{ cm}^{-1}$ , which is attributed to the symmetric stretching vibration of  $S^{3-}$  radical trapped in lazurite mineral composition. A small shoulder at  $585\text{ cm}^{-1}$  is also noticed, especially in the spectra of natural samples, which has been historically associated with both asymmetric stretching of  $S^{3-}$  radical<sup>39</sup> and symmetric stretching of  $S^{2-}$  radical<sup>40</sup>. For natural pigments, several luminescence bands can

be seen in the range between 1200-1900  $\text{cm}^{-1}$  (867-922 nm), being particularly intense in pixels corresponding to white areas.



**Figure 5.** Visible images of NU-1 (a), NU-A (b) and SU (c) ultramarine blue pigments and single Raman/luminescence spectra (d) acquired in both blue and white areas of samples. Spectra were stacked for better visualization

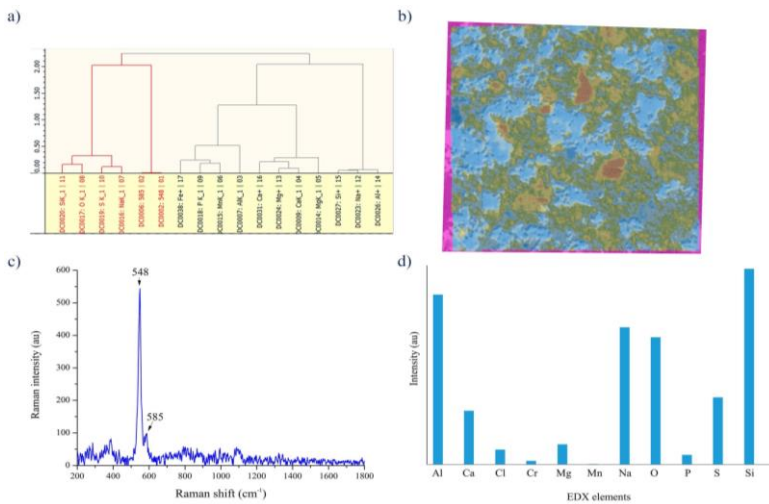
### 3.2. Multisensor analysis

Based on the exploratory analysis results, the multisensor hypercube was built. We checked firstly the feasibility of identifying different mineral phases by combining Raman, EDX and SIMS spectral descriptors in a single file. PCA analysis of the multisensor hyperspectral data revealed that the first 5 PCs described almost 60% of the total variance (PC1, 24.39%; PC2 11.14%; PC3, 10.36%; PC4, 7.33% and, PC5, 6.02%).

Figure 6 shows the results obtained applying HCA to the loadings of the first five principal components of the PCA model for NU-1 sample. As it can be

## Discusión conjunta de resultados

seen, the created model can clearly differentiate between two main clusters (Figure 6a). The first of them, selected in red, contains the Raman band and the shoulder located at 548 and 585  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, and the elemental contributions of Si, O, S and Na. As explained before, those Raman features are attributed to stretching vibrations of  $\text{S}^{3-}$  and  $\text{S}^{2-}$  radicals trapped in lazurite  $\beta$ -cages. It is, therefore, reasonable to assume that the red cluster is indicating the distribution of this mineral ( $\text{Na}_8\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_n$ ) in the samples (Figure 6b).



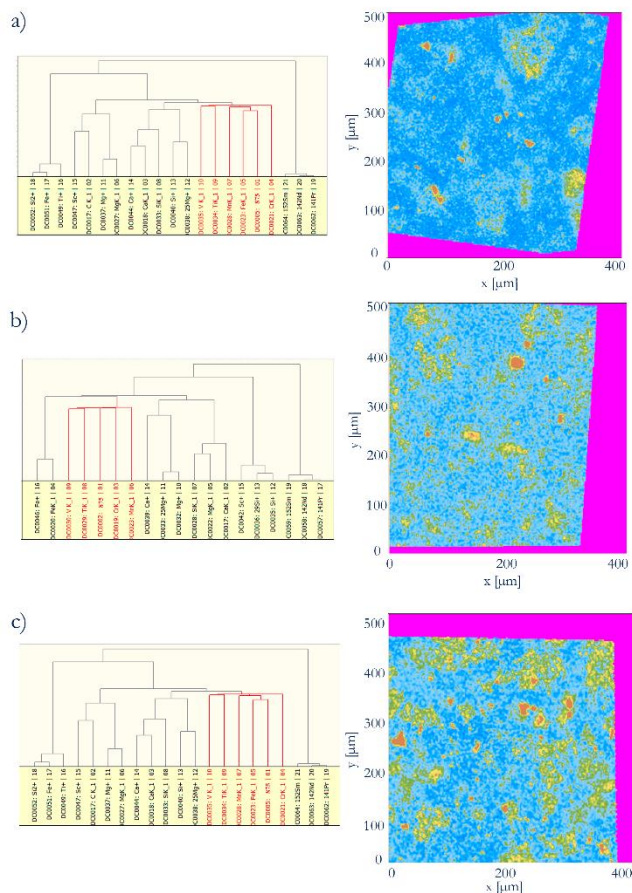
**Figure 6.** a) Dendrogram cluster of the first five principal components of PCA model, b) superposition of red selected cluster spatial distribution and SEM image, and individual spectra of c) Raman spectroscopy and d) EDX of a very intense zone of the distribution in NU-1 sample

In order to prove this observation, Raman and EDX single spectra were extracted (Figure 6c and 6d) for one of the pixels in which lazurite exhibits the highest intensity in the false-colour image. It is clear that high relative intensities of Na, Al, Si, O and S elements in this area correlate well to the pronounced 548  $\text{cm}^{-1}$  band, which dominates the Raman spectrum of lazurite. Similar results were obtained in the case of NU-2 and SU samples. However, when analysing low

quality natural pigments (NU-3 and NU-A), no clear grouping between the Raman features characteristic of lazurite and these elements could be found. This is consistent with the fact that these low-quality pigments macroscopically do not display a bright blue tone and few blue areas can be detected when observing at microscopic scale. The presence of accessory minerals in the chemical composition of the natural pigment is very common, as it has been previously reported by some authors<sup>20</sup>. Thus, apart from the already mentioned pyrite, lazurite can be found (depending on its geographical origin) in the company of diopside ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ), calcite ( $\text{CaCO}_3$ ), forsterite ( $\text{Mg}_2\text{SiO}_4$ ), phlogopite ( $\text{K}(\text{Mg,Fe,Mn})_3\text{Si}_3\text{AlO}_{16}(\text{F}(\text{OH})_2)$ )<sup>38</sup>, nosean ( $\text{Na}_8\text{Si}_6\text{Al}_6\text{O}_{24}(\text{SO}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}$ )<sup>41</sup> or haüyne ( $\text{Na}_3\text{CaSi}_3\text{Al}_3\text{O}_{12}(\text{SO}_4)$ )<sup>42</sup>, among others. Most of aforementioned impurities own an aluminosilicate base, together with other few elements, such as Na, Ca, O, S, Mg, Fe or Cl. For this reason, the association of several of these elements in clusters is expected and the identification of different mineral phases based on the elemental composition is challenging.

The most interesting feature observed in low quality natural samples is the luminescence pattern that appears in the Raman spectra. As exposed before, its origin is still unclear and the attribution to certain transition metals made by Schmidt<sup>20</sup> was based only on quantitative analysis of bulk samples. The investigation of the spatial distribution of trace elements, like transition metals and rare earth elements (REE) can aid to elucidate it. Thus, different PCA models combining Raman, EDX, SIMS and LA-ICP-MS descriptors have been considered. Results obtained for NU-2, NU-3 and NU-A samples are depicted in Figure 7.

## Discusión conjunta de resultados



**Figure 7.** Dendrograms obtained in the HCA of the loadings of the PCA models and spatial distribution of cluster marked in red for a) NU-2, b) NU-3 and c) NU-A samples

As it can be observed, in this analysis some elemental SPDCs like Na, S, K or Al have been removed, since their presence influences the clustering of the rest of Raman and EDX descriptors due to the common chemical base of most impurities appearing in the composition of ultramarine blue. Therefore, and always selecting the number of loadings representing the most variance contained within the PCA models, a clear grouping arises between 875 nm

luminescence band and transition metals. Ti, V, Cr, Mn and Fe elements appear to always cluster along with this band in the lowest quality studied pigments. The spatial chemical image associated with said clusters exhibit a heterogeneous distribution and it seems to increase its abundance in NU-A sample, the least pure of the pigments. Furthermore, the proximity of this cluster with the one formed by Ca, Mg and Si, support the hypothesis of the association of these trace metals with diopside ( $\text{CaMgSiO}_3$ ) impurities. On the contrary, no correlation between the distribution of luminescence bands and rare earth elements can be found.

#### 4.- Conclusions

In the presented study, the feasibility of using a multisensor hyperspectral imaging approach for characterization of natural and synthetic ultramarine pigments has been demonstrated. By combining hyperspectral data acquired using four different analytical techniques, elemental and molecular information have been obtained. In this respect, MSHSI has been proved to be a versatile methodology to better understand samples as complex as historical pigments of complex mineral composition. We have confirmed the presence of impurities as pyrite mineral in natural pigments with the appearance of a Fe-S cluster in the analysis of low quality samples. Luminescence spectral patterns arising between  $1200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  have been successfully grouped with transition metal traces, being especially remarkable the contribution of Fe, Ti, V, Cr and Mn elements. Further analysis is needed to find a more specific association between these elements and the mineral phases where they are located, but unfortunately, silicates are weak Raman scatterers and no additional Raman bands apart from those of lazurite and luminescence were clearly detected.

## Acknowledgements

Authors thank Hans Lohninger (Epina ImageLab) for technical support and the Research project BIA2017-87131-R from the Ministry of Economy and Competitiveness for financial support. M. Gonzalez-Cabrera also acknowledges the Ministry of Education, Culture and Sports for a mobility grant during her doctorate studies (FPU15/03119 fellowship).

## References

- [1] M. Clarke, C. Krekel, The Art of All Colours. Medieval Recipe Books for Painters and Illuminators, *Stud. Conserv.* 46 (2001) 304.
- [2] G. Frison, G. Brun, Lapis lazuli, lazurite, ultramarine “blue”, and the colour term “azure” up to the 13 th century, *J. Int. Colour Assoc.* 16 (2016) 41–55.
- [3] A.A. Finch, H. Friis, M. Maghrabi, Defects in sodalite-group minerals determined from X-ray-induced luminescence, *Phys. Chem. Miner.* 43 (2016) 481–491.
- [4] J.A. Mandarino, M.E. Back, *Fleischer’s Glossary of Mineral Species*, Mineralogical Association of Canada, 2004.
- [5] I. Hassan, R.C. Peterson, H.D. Grundy, The structure of lazurite, ideally  $\text{Na}_6\text{Ca}_2(\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24})\text{S}_2$ , a member of the sodalite group, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 41 (1985) 827–832.
- [6] I. Hassan, H.D. Grundy, The crystal structures of sodalite-group minerals, *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* 40 (1984) 6–13.

- [7] P. Ballirano, A. Maras, Mineralogical characterization of the blue pigment of Michelangelo's fresco "The Last Judgment", *Am. Mineral.* 91 (2006) 997–1005.
- [8] D. Arieli, A. D. E. W. Vaughan, D. Goldfarb, New Synthesis and Insight into the Structure of Blue Ultramarine Pigments, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5776–5788.
- [9] D.G. Booth, S.E. Dann, M.T. Weller, The effect of the cation composition on the synthesis and properties of ultramarine blue, *Dye. Pigment.* 58 (2003) 73–82.
- [10] N. Gobeltz-Hautecoeur, A. Demortier, B. Lede, J.P. Lelieur, C. Duhayon, Occupancy of the sodalite cages in the blue ultramarine pigments, *Inorg. Chem.* 41 (2002) 2848–2854.
- [11] S. Kowalak, A. Jankowska, S. Zeidler, A.B. Więckowski, Sulfur radicals embedded in various cages of ultramarine analogs prepared from zeolites, *J. Solid State Chem.* 180 (2007) 1119–1124.
- [12] D. Reinen, G.-G. Lindner, The nature of the chalcogen colour centres in ultramarine-type solids, *Chem. Soc. Rev.* 28 (1999) 75–84.
- [13] J. Mertens, The History of Artificial Ultramarine (1787–1844): Science, Industry and Secrecy, *Ambix.* 51 (2004) 219–244.
- [14] E. Climent-Pascual, R. Sáez-Puche, A. Gómez-Herrero, J.R. de Paz, Cluster ordering in synthetic ultramarine pigments, *Microporous Mesoporous Mater.* 116 (2008) 344–351.

- [15] A.R. De Torres, S. Ruiz-Moreno, A. López-Gil, P. Ferrer, M.C. Chillón, Differentiation with Raman spectroscopy among several natural ultramarine blues and the synthetic ultramarine blue used by the Catalanian modernist painter Ramon Casas i Carbó, *J. Raman Spectrosc.* 45 (2014) 1279–1284.
- [16] E.M.A. Ali, H.G.M. Edwards, Analytical Raman spectroscopy in a forensic art context: the non-destructive discrimination of genuine and fake lapis lazuli., *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 121 (2014) 415–419.
- [17] C.E. Silva, L.P. Silva, H.G.M. Edwards, L.F.C. de Oliveira, Diffuse reflection FTIR spectral database of dyes and pigments, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 2183–2191.
- [18] Q.G. Zeng, G.X. Zhang, C.W. Leung, J. Zuo, Studies of wall painting fragments from Kaiping Diaolou by SEM/EDX, micro Raman and FT-IR spectroscopy, *Microchem. J.* 96 (2010) 330–336.
- [19] C. Pelosi, A. Lo Monaco, M. Bernabei, G. Agresti, C. Colantonio, A. Perri, D. Comelli, G. Valentini, C. Manzoni, Beyond the visible: The Viterbo Crucifixion panel painting attributed to Michelangelo Buonarroti, *Microchem. J.* 154 (2020) 104636.
- [20] M. González-Cabrera, P. Arjonilla, A. Domínguez-Vidal, M.J. Ayora-Cañada, Natural or synthetic? Simultaneous Raman/luminescence hyperspectral microimaging for the fast distinction of ultramarine pigments, *Dye. Pigment.* 178 (2020) 108349.
- [21] R. Salzer, H.W. Siesler, *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging: Second Edition*, Wiley Blackwell, 2014.

- [22] H.F. Grahn, P. Geladi, *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*, Wiley, New York, 2007.
- [23] H. Lohninger, J. Ofner, Multisensor hyperspectral imaging as a versatile tool for image-based chemical structure determination, *Spectrosc. Eur.* 5 (2014) 6–10.
- [24] J.S. Wu, A.M. Kim, R. Bleher, B.D. Myers, R.G. Marvin, H. Inada, K. Nakamura, X.F. Zhang, E. Roth, S.Y. Li, T.K. Woodruff, T. V. O’Halloran, V.P. Dravid, Imaging and elemental mapping of biological specimens with a dual-EDS dedicated scanning transmission electron microscope, *Ultramicroscopy.* 128 (2013) 24–31.
- [25] E.J. Lanni, R.N. Masyuko, C.M. Driscoll, S.J.B. Dunham, J.D. ShROUT, P.W. Bohn, J. V. Sweedler, Correlated imaging with C<sub>60</sub>-SIMS and confocal raman microscopy: Visualization of cell-scale molecular distributions in bacterial biofilms, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10885–10891.
- [26] R. Van De Plas, J. Yang, J. Spraggins, R.M. Caprioli, Image fusion of mass spectrometry and microscopy: A multimodality paradigm for molecular tissue mapping, *Nat. Methods.* 12 (2015) 366–372.
- [27] A. Balbekova, H. Lohninger, G.A.F. van Tilborg, R.M. Dijkhuizen, M. Bonta, A. Limbeck, B. Lendl, K.A. Al-Saad, M. Ali, M. Celikic, J. Ofner, Fourier Transform Infrared (FT-IR) and Laser Ablation Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) Imaging of Cerebral Ischemia: Combined Analysis of Rat Brain Thin Cuts Toward Improved Tissue Classification, *Appl. Spectrosc.* 72 (2018) 241–250.

- [28] M. Holzlechner, M. Bonta, H. Lohninger, A. Limbeck, M. Marchetti-Deschmann, Multisensor Imaging - From Sample Preparation to Integrated Multimodal Interpretation of LA-ICPMS and MALDI MS Imaging Data, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8831–8837.
- [29] A. Balbekova, M. Bonta, S. Török, J. Ofner, B. Döme, A. Limbeck, B. Lendl, FTIR-spectroscopic and LA-ICP-MS imaging for combined hyperspectral image analysis of tumor models, *Anal. Methods.* 9 (2017) 5464–5471.
- [30] M. Bonta, J.J. Gonzalez, C. Derrick Quarles, R.E. Russo, B. Hegedus, A. Limbeck, Elemental mapping of biological samples by the combined use of LIBS and LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 252–258.
- [31] J. Ofner, F. Brenner, K. Wieland, E. Eitenberger, J. Kirschner, C. Eisenmenger-Sittner, S. Török, B. Döme, T. Konegger, A. Kasper-Giebl, H. Hutter, G. Friedbacher, B. Lendl, H. Lohninger, Image-Based Chemical Structure Determination, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–11.
- [32] J. Ofner, J. Kirschner, E. Eitenberger, G. Friedbacher, A. Kasper-Giebl, H. Lohninger, C. Eisenmenger-Sittner, B. Lendl, A novel substrate for multisensor hyperspectral imaging, *J. Microsc.* 265 (2017) 341–348.
- [33] J. Ofner, K.A. Kamilli, E. Eitenberger, G. Friedbacher, B. Lendl, A. Held, H. Lohninger, Chemometric Analysis of Multisensor Hyperspectral Images of Precipitated Atmospheric Particulate Matter, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9413–9420.

- [34] O. Sobol, G. Holzlechner, M. Holzweber, H. Lohninger, T. Boellinghaus, W.E.S. Unger, First use of data fusion and multivariate analysis of ToF-SIMS and SEM image data for studying deuterium-assisted degradation processes in duplex steels, in: Surf. Interface Anal., John Wiley and Sons Ltd, 2016: pp. 474–478.
- [35] Epina Softwareentwicklungs- und Vertriebs-GmbH, Epina Software Labs, (n.d.). [www.epina.at](http://www.epina.at).
- [36] C.M. Schmidt, M.S. Walton, K. Trentelman, Characterization of Lapis Lazuli Pigments Using a Multitechnique Analytical Approach: Implications for Identification and Geological Provenancing, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8513–8518.
- [37] M. Favaro, A. Guastoni, F. Marini, S. Bianchin, A. Gambirasi, Characterization of lapis lazuli and corresponding purified pigments for a provenance study of ultramarine pigments used in works of art, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2195–2208.
- [38] I. Hassan, H.D. Grundy, the structure of nosea, ideally  $\text{Na}_8[\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}]\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - McMaster Experts, *Can Miner.* 27 (1989) 165–172.
- [39] A. Banerjee, T. Häger, On some Crystals of “Lapis Lazuli,” *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. A J. Phys. Sci.* 47 (1992) 1094–1095.
- [40] O. El Jaroudi, E. Picquenard, A. Demortier, J.P. Lelieur, J. Corset, Polysulfide anions II: Structure and vibrational spectra of the  $\text{S}_4^{2-}$  and  $\text{S}_5^{2-}$  anions. Influence of the cations on bond length, valence, and torsion angle, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 2593–2603.

## Discusión conjunta de resultados

[41] P. Colombari, A. Tournié, M.C. Caggiani, C. Paris, Pigments and enamelling/gilding technology of Mamluk mosque lamps and bottle, *J. Raman Spectrosc.* 43 (2012) 1975–1984.

[42] A.S. Marfunin, *Spectroscopy, Luminescence and Radiation Centers in Minerals*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1979.

### 5.3 Mediciones en modo remoto

En este apartado se detallan los trabajos realizados mediante espectroscopía Raman a distancia, incluyendo el análisis de muestras modelo de polímeros y el estudio sobre pigmentos de distinta naturaleza y tonalidad. Ambos estudios fueron llevados a cabo durante la estancia predoctoral realizada en el grupo de investigación liderado por el Dr. Bernhard Lendl, en Viena (Austria).

El empleo de espectroscopía Raman en modo remoto en camino abierto (*stand-off*) aúna las ventajas de la espectroscopía Raman con los beneficios que supone la realización de medidas manteniendo una distancia segura entre el operario y la muestra o el objeto de análisis. Esto la convierte en una potente solución analítica para multitud de aplicaciones, como la detección de materiales peligrosos, sustancias desconocidas, la exploración de elementos situados en superficies planetarias, el análisis de muestras de valor artístico sin riesgo de producir daños o contaminaciones y el análisis en situaciones de difícil acceso. Además, la combinación de esta técnica con la adquisición de imágenes hiperespectrales supone un avance tanto a nivel espacial como espectral, ya que permite el estudio de grandes áreas de interés.

- ***Imágenes hiperespectrales Raman para la identificación remota de materiales: comparación entre el registro a distancia en modo punto a punto y mediante captura directa***

El objetivo de este trabajo es la comparación entre dos configuraciones de espectroscopía Raman de camino abierto (*stand-off*) y construcción manual en relación a su respuesta frente a distintas variables experimentales y características instrumentales. Mientras que la primera de ellas funciona mediante el registro de imágenes en modo puntual, la segunda lo hace a través de un método de escaneo

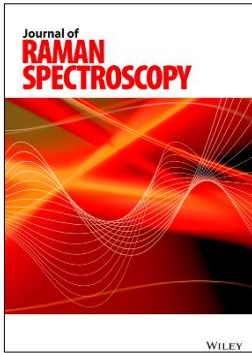
## Discusión conjunta de resultados

espectral. Es decir, la primera recoge un espectro en el rango deseado en cada uno de los píxeles que forman la zona deseada, y la segunda recoge una imagen espacial bidimensional para cada banda de longitud de onda que se mide al mismo tiempo, de forma simultánea. Para ello, y aunque las dos configuraciones están equipadas con la misma fuente de excitación de 532 nm, la primera actúa con el láser en forma colimada (consiguiendo una zona de iluminación de diámetro 6 mm) y la segunda lo hace de manera expandida (diámetro de 100 mm).

Para ambas configuraciones se realizaron las comparaciones instrumentales en términos de características del sistema de iluminación, relación señal-ruido en los espectros adquiridos, resolución espacial y resolución espectral.

La configuración de análisis remoto de escaneo espectral muestra mejores resultados en cuanto al área de medida, obteniendo un mejor perfil de intensidades y un campo de visión de hasta 10 veces mayor, así como una resolución espectral de casi el doble en comparación con la configuración de medida puntual. Además, en el caso del sistema directo, algunos parámetros como la resolución espacial pueden ser modificados tras la medida mediante el uso de herramientas de software y optimizarse en función a las características propias de las muestras. De forma análoga, el uso de métodos quimiométricos como el análisis de componentes de vértice (VCA) mostró el potencial de esta configuración para discernir entre cuatro tipos de materiales poliméricos de distinta naturaleza química a una distancia de 15 m.

## Artículo publicado



### “Comparing mapping and direct hyperspectral imaging in stand-off Raman spectroscopy for remote material identification”

Gasser, C., González-Cabrera, M., Ayora-Cañada, M.J., Domínguez-Vidal, A. y Lendl, B.

Referencia: J.Raman Spectrosc. 2019;50:1034–1043

## Abstract

Stand-off Raman spectroscopy offers a highly selective technique to probe unknown substances from a safe distance. Often, it is necessary to scan large areas of interest. This can be done by pointwise imaging (PI), that is spectra are sequentially acquired from an array of points over the region of interest (point-by-point mapping). Alternatively, in this paper a direct Hyperspectral Raman imager (HSRI) is presented, where a defocused laser beam illuminates a wide area of the sample and the Raman scattered light is collected from the whole field of view (FOV) at once as a spectral snapshot filtered by a liquid crystal tunable filter (LCTF) to select a specific Raman shift.

Both techniques are compared in terms of achievable field of view, spectral resolution, signal to noise performance and time consumption during a measurement at stand-off distance of 15 m. The HSRI showed superior spectral resolution and signal to noise ratio (SNR), while more than doubling the FOV of the PI at laser power densities reduced by a factor of 277 at the target. Further, the output hyperspectral image (HSI) data cube can be processed with state of the art chemometric algorithms like vertex component analysis in order to get a simple deterministic false color image showing the chemical composition of the

target. This is shown for an artificial polymer sample, measured at a distance of 15 m.

### 1. Introduction

Stand-off Raman spectroscopy is a highly versatile remote detection technique, which combines the advantages of Raman spectroscopy with the benefit of separating physically the instrumentation from the sampling point. Illumination via laser light and collection of primarily backscattered Raman photons allow for a remote detection scheme, as long as free propagation of photons is possible. This makes stand-off Raman spectroscopy a potent analytical solution for a variety of applications. The exploration of different materials located on planetary surfaces is one of the most prominent studied application possibilities, given its advantages in terms of accessibility of remote objects also when the rover is stationary <sup>[1]</sup>. A wide range of samples, such as minerals, organics and inorganics have been detected before by using remote Raman instruments <sup>[2-4]</sup>. The possibility of maintaining a distance from the target whilst obtaining relevant analytical information without compromising the safety of the operator or the instrument makes stand-off Raman spectroscopy also the ideal tool for detection of hazardous or harmful materials. This has been demonstrated with different types of explosives <sup>[5,6]</sup> and possible concealed threats in several kinds of containers <sup>[7,8]</sup>. Moreover, art, heritage and restoration applications could also benefit from the use of stand-off instrumentation, due to the considerable reduction of the risk of producing contaminations or alterations in the composition of original works of artistic value and the improved accessibility to hard-to-reach areas such as ceilings or high walls.

Hyperspectral imaging describes a wide range of increasingly used and constantly evolving techniques for chemical and structural analysis, which provides both

spatial and spectral information for a given sample of interest <sup>[9,10]</sup>. The result of these measurements is a three-dimensional dataset, which consists of the two-dimensional spatial information and an additional spectral dimension, thus forming a hyperspectral image (HSI) cube. Generally, two different techniques of obtaining this HSI cube can be differentiated: spatial and spectral methods. Regarding spatial scanning methods, two-different approaches can be distinguished: point-by-point mapping (whiskbroom imaging) and line-scanning (pushbroom imaging) <sup>[11]</sup>. In whiskbroom imaging, a spectrum of a specific spatial position of the sample is obtained and then the area of interest is scanned by moving pointwise to generate a mapping of the sample surface. Most of Raman-based hyperspectral imaging techniques use microscopes and accurate translation stages to move the sample in order to achieve Raman maps <sup>[12]</sup>. If however, a whole line of spectra is recorded at the same time and is scanned laterally over the sample a HSI can be created much faster. This is generally known as pushbroom approach, which utilizes the fact that most detectors used for Raman spectroscopy are two-dimensional arrays with one free dimension, which in turn can be used to image one dimension of the sample surface onto the detector thus considerably increasing the acquisition speed <sup>[9]</sup>. On the other hand, spectral scanning methods collect a two-dimensional spatial image for each wavelength band at a time. Therefore, the HSI cube is built by stacking spectral snapshots on top of each other. This requires the possibility of selecting a certain wavelength and image it onto the detector array, which can be facilitated by tunable bandpass filters. Such filters have multiple prerequisites, they have to provide an adequate width of the bandpass in order to ensure sufficient spectral resolution, good transmission characteristics, large optical aperture for passing the image and fast tuning. Among several possible technologies, acusto-optical tunable filters (AOTF), tunable Fabry-Perot cavities (TFPC) and liquid crystal

tunable filters (LCTF) are the most commonly used <sup>[13]</sup>. AOTFs, which usually consist of a birefringent crystal attached to a piezoelectric transducer, provide a programmable grating, thus acting like a tunable filter. The transmitted light is diffracted by the acoustic wave and the spectral position of the bandpass is selected by changing the frequency of the transducer i.e. the sound wave <sup>[14]</sup>. The main drawbacks of AOTFs are the image degradation due to image shift with tuning, image dispersion in the diffraction direction and the bigger bandwidth compared to LCTFs <sup>[15]</sup>. TFPCs consist of two reflective surfaces, which's transmission characteristics depend on, among others, the distance between the surfaces <sup>[16]</sup>. Piezoelectric crystals can be used to facilitate the spectral tunability of TFPCs with large optical apertures by changing the distance of the reflective surfaces <sup>[17]</sup>. LCTFs are based on Lyot filters, where a filter stage is based upon one birefringent crystal plate sandwiched by orthogonal polarizers <sup>[18]</sup>. Multiple stacks with varying thickness of plate retarders create a narrowband bandpass, which can be tuned by using a liquid crystal panel <sup>[19,20]</sup>. Since LCTFs offer fast and reliable tuning with good spectral bandwidth at a small footprint, they have been used for several HSI applications <sup>[21]</sup>, among them Raman spectroscopic imagers <sup>[22]</sup>.

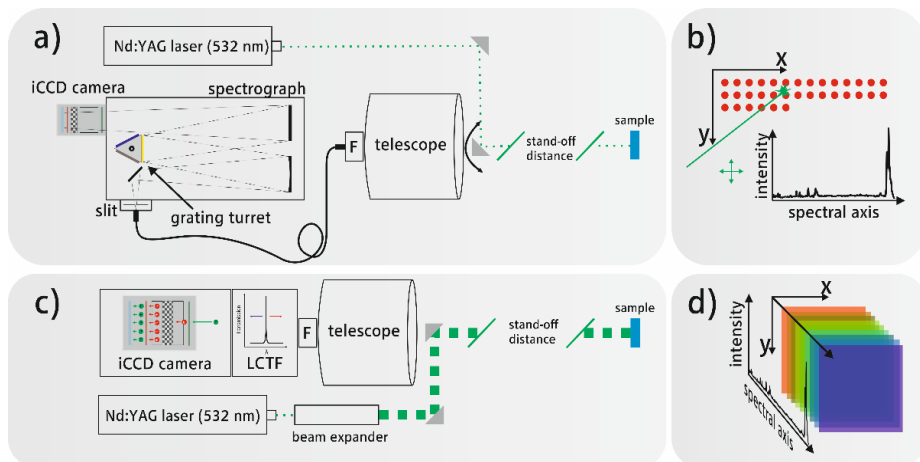
In this study we compare the performance of two different stand-off Raman imaging approaches: a pointwise or whiskbroom imager (PI), where the HSI is created by scanning the laser point over the sample; and a direct HSRI, where the HSI is created by stacking spectral snapshots on top of each other. The PI system employs a classical diffracting spectrometer, coupled to the telescope by an optical fiber with the laser point being scanned over the sample by means of an electronically controlled mirror. The HSRI uses a LCTF to select a specific Raman shift and collect a spectral image, while the laser illuminates the whole field of view (FOV) of the telescope or rather the camera <sup>[23]</sup>. In order to suppress

unspecific light (originating from e.g. daylight) the emission of the laser pulse and the acquisition of the backscattered photons were synchronized. Both configurations are compared in terms of achievable FOV, signal to noise ratio (SNR) and time consumption during a measurement at a stand-off distance of 15 m. Furthermore, the importance of spatial resolution is explored for the purpose of chemical identification of small amounts of substances at stand-off distances.

## 2. Materials and methods

In this study two different optical setups were employed, which are displayed in Figure 1a and c. The first includes a collimated laser beam creating an illuminated point with a diameter of 6 mm, which is mapped over the target area with the help of a motorized mirror. The whole Raman spectrum is collected from each measurement point and then combined into a HSI cube (Figure 1b). The second setup employs a widened and unfocused laser beam, which illuminates an area with an apparent diameter of approximately 100 mm. The scattered Rayleigh light is filtered and directly imaged onto the camera, thus generating the HSI cube, one image at a time, along the spectral axis (Figure 1d).

In both systems, a Q-switched, frequency doubled (532 nm) Nd:YAG NL301HT laser (EKSPLA, Lithuania) with a pulse energy of 50 mJ, a pulse length of 4.4 ns and a repetition rate of 10 Hz was used as an excitation source. The beam profile is specified exhibiting a top-hat beam profile in the near field and a near-Gaussian profile in the far-field with a beam divergence lower than 0.6 mrad.



**Figure 1.** Simplified sketch of the instrumentation used in this study for (a) pointwise stand-off Raman spectroscopy and (c) direct stand-off Raman imaging setup with an illustration of the hyperspectral image generation for both methods respectively in (b) and (d).

### 2.1. Pointwise stand-off Raman imager (PI)

For the pointwise stand-off Raman system the laser was aligned coaxially to a 6" Schmidt-Cassegrain telescope (C6-A-XLT,  $f = 1.5$  m,  $f/9.9$ , Celestron, USA) for the collection of Raman scattered light using a motorized kinematic mirror mount (KS1-Z8, Thorlabs, USA), which allowed for the mapping of the laser onto the sample area. The backscattered Rayleigh light was filtered using a long pass filter (LP03-532RE, Cut-off wavelength 533.3 nm, OD > 6, Semrock, USA) and the Raman photons were guided to an Acton standard series SP-2750 spectrograph (slit 120  $\mu\text{m}$ ,  $f/10$ , 300 grooves/mm, Princeton Instruments, Germany) via a round-to-slit fiber optical bundle cable consisting of nineteen 200- $\mu\text{m}$  diameter optical fibres (FCRL 19UV200, NA 0.22, Avantes, Netherlands). To match the F number of telescope and fiber bundle, a  $f = 50$  mm lens was used. Finally, the backscattered light was detected by a PIMAX 1024RB intensified CCD (iCCD) camera (QE 7.5% @ 600nm, Princeton

Instruments, USA). The outgoing laser pulse and the gate of the iCCD camera were synchronized so that the measurement window coincided with the maximum Raman signal. Data acquisition and mapping was automated using LabVIEW® (National Instruments, USA).

## **2.2. Direct stand-off hyperspectral Raman imager (HSRI)**

The direct stand-off imager (Figure 1c) employed an expanded laser beam, generated using a defocused Galilean type beam expander in order to achieve an apparent beam diameter of approximately 100 mm at the sample. This was done by The backscattered Rayleigh photons were again filtered through a long pass filter (LP03-532RE, Cut-off wavelength 533.3 nm, OD > 6, Semrock, USA). Subsequently, the Raman photons were filtered using a tunable LCTF filter (VariSpec VISR, Perkin-Elmer, USA) with a spectral resolution of 0.25 nm and directly imaged onto an iCCD equipped with a quadratic sensor (PIMAX 4 1024f-HBf iCCD. 1024x1024 pixels, 13  $\mu\text{m}$  pixels, QE 45% @ 600nm, Princeton Instruments, USA). The VariSpec LCTF is of the Evans Split element variety, which requires only half as many polarizers as an equivalent Lyot filter type<sup>[24]</sup>. The LCTF has a clear aperture of 20 mm, a free spectral range of 480-720 nm, an angle of acceptance of 7° and a response time of 150 ms. The transmission of the LCTF varies over the whole spectral range, with a mean transmission of 22.5 % in the area of interest. Each acquired spectral image was stacked in order to build the hyperspectral data cube. This process was automated using LabVIEW® (National Instruments, USA).

## **2.3. Chemometric methods**

Vertex component analysis (VCA) was used for the evaluation of the generated HSI data cubes. VCA is a technique for unsupervised endmember extraction assuming the data is a linear mixture of pure components, also called

endmembers <sup>[25]</sup>. For the analysis, the commercial software ImageLab (Epina GmbH, Austria) was used.

## **2.4. Chemicals**

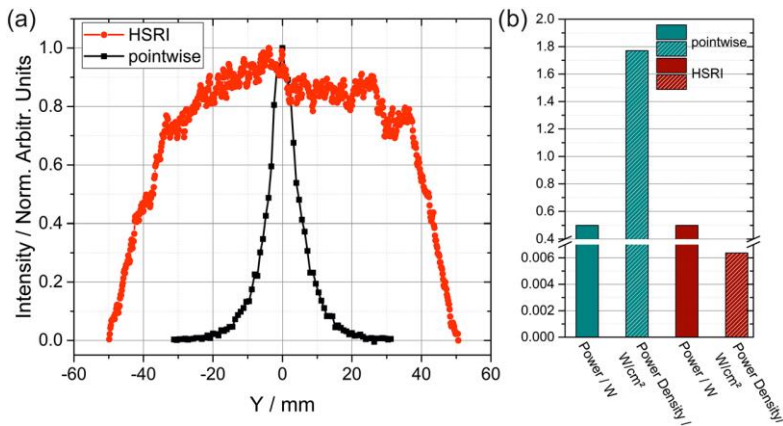
Plates of different chemical composition and thickness were acquired from RS Components (United Kingdom), namely polypropylene (PP, 2 mm), polyethylene (PE, 4 mm), polytetrafluoroethylene (PTFE or Teflon, 6 mm) and Nylon (N6, 4 mm). Pieces were cut out and glued together using small amounts of cyanoacrylate on the edges of the cut pieces. Sulfur (>99.98%) was obtained from Sigma-Aldrich and for the spatial resolution experiments, polylactic acid (PLA) plates were designed as samples containers on the computer and 3D printed afterwards.

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Illumination system**

Illumination and FOV differ greatly between the two systems. Figure 2a depicts the FOV of both configurations over the horizontal axis Y, measured on a PP plate of 2 mm thickness at a distance of 15 m. For the PI setup this was done by scanning the laser point laterally step by step away from the center and recording a spectrum at every point. Afterwards, the intensity of the band at  $2890\text{ cm}^{-1}$  was assessed in dependence of the horizontal position of the illumination point. The resulting curve (black) shows a distinct fall off with increasing offset from the central point, reaching the 10 % mark at a diameter of approximately 24 mm. To assess the field of view of the HSRI prototype, the same PP plate was used at 15 m distance as a target. A spectral image at  $2890\text{ cm}^{-1}$  was acquired and the intensity was evaluated along the same horizontal axis Y as before. The HSRI configuration shows a broader intensity profile, mainly influenced by the emission characteristics of the laser beam. Normally, the FOV of a telescope and

CCD chip combination is influenced by the focal length of the telescope, the stand-off distance and the size of the CCD chip itself. For the employed HSRI system, this surmounts to a theoretical FOV of approximately 110 m. Ideally, for the HSRI the laser beam has an ideal top-hat structure also in the far-field, which means the energy density within the beam is uniform. This leads to a uniform intensity distribution in aberration-free optical systems, which enables the usage of the whole image without loss of SNR in less illuminated border regions. For the HSRI presented in this study the effective FOV with adequate Raman intensity amounts to a diameter of approximately 70 mm.

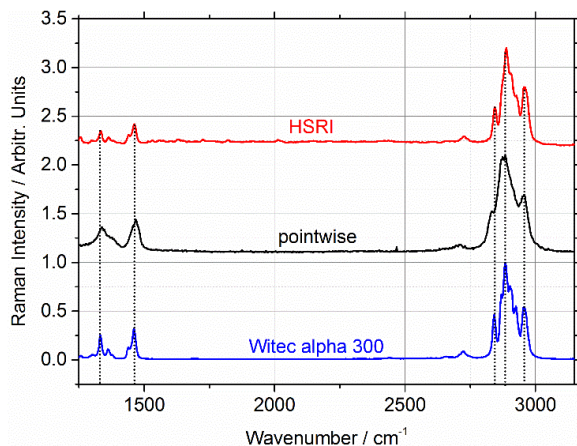


**Figure 2.** a) Measured field of view for both configurations on the horizontal axis Y. b) Laser power and power density used in this study for both configurations.

In the PI system the numerical aperture and the diameter of the fiber bundle limit the FOV. In contrast to the HSRI, the PI system with its fiber bundle with a numerical aperture of 0.22 and a diameter of 1.5 mm, the effective FOV is reduced to an area with a diameter of 24 mm. This means that the maximal useful area that can be illuminated for the PI is 452 mm<sup>2</sup> and for the HSRI it is 3848 mm<sup>2</sup>, a less than tenfold increase.

### 3.2. Spectral investigations

Spectra obtained with both systems were compared to spectra taken with a commercially available Raman microscope (alpha300rsa, Witec, Germany) with the same excitation wavelength of 532 nm used throughout this study. Again, a PP plate was the target of choice and Figure 3 shows the obtained spectra.



**Figure 3.** Exemplary spectra of PP obtained with the HSRI system (red) and with the pointwise stand-off imager (black) at 15 m distance. Reference PP spectrum (blue) taken with a commercial instrument (Witec alpha300rsa).

On the high Raman shift range from 2840 to 2950  $\text{cm}^{-1}$  typical bands arising from the symmetric and asymmetric stretch vibrations of the methyl and methylene group can be found. Additionally, the bands attributed to the symmetric and asymmetric bending of the methyl and methylene group present in PP are visible between 1260 and 1500  $\text{cm}^{-1}$  in the chosen spectral range. Both configurations of stand-off Raman imagers show the same bands as the reference taken by the Raman microscope and the spectral positions are in good agreement. The biggest difference in the shown spectra is their respective resolution. The Raman microscope uses a 600  $\text{gr/mm}$  grating, which results in a spectral resolution of approximately 4  $\text{cm}^{-1}$  with the spectrograph and camera

built into the instrument. The PI system with a 300 gr/mm grating and a 750 mm focal length  $f/10$  spectrograph has the lowest spectral resolution of the compared systems with approximately  $15 \text{ cm}^{-1}$ . The HSRI imager does not use a classical spectrograph as the dispersive element, but the LCTF. Hence, the spectral resolution is a function of the width of the transmission curve, which is specified by the manufacturer to be constant over the complete visible range at 0.25 nm. This amounts to a mean spectral resolution of  $7.4 \text{ cm}^{-1}$  in the observed spectral range. Additionally, the relative intensities vary between spectrograph and filter systems. The tunable filter has lower throughput at shorter wavelengths, which becomes apparent when comparing bands at higher Raman shifts with bands at lower Raman shifts for the spectrograph and the filter configuration in Figure 3. Nevertheless, the resolution is sufficient for most common applications, even exceeding the PI setup, which already showed its usefulness in previous works <sup>[4]</sup>.

The tunable filter in the HSRI is mainly used because of the ability to perform direct imaging. Hence, in this system it is important to evaluate the uniformity of the transmission window in terms of spectral position and spectral resolution over the field of view.

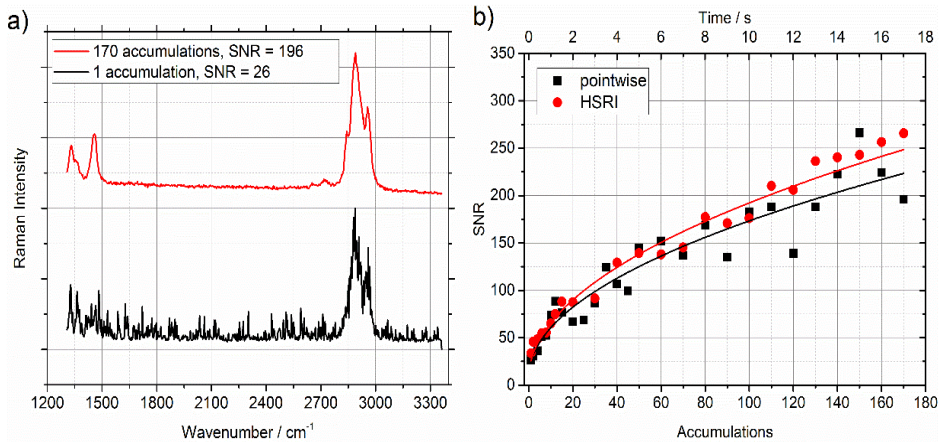
To do this, a PTFE plate with an appropriate size was measured using the HSRI prototype. The region from 700 to 1500  $\text{cm}^{-1}$  with spectral steps of  $2 \text{ cm}^{-1}$  was acquired, thereby oversampling the theoretical resolution of the HSRI of approximately  $7 \text{ cm}^{-1}$ . PTFE shows several bands in this region, the two most important ones are the skeletal stretching at approximately  $746 \text{ cm}^{-1}$  and the symmetric  $\text{CF}_2$  stretching modes at approximately  $1380 \text{ cm}^{-1}$  <sup>[26]</sup>. Since the band at  $746 \text{ cm}^{-1}$  shows higher intensity and narrow linewidth, it was chosen to be the indicator for spectral resolution and position accuracy of the filter. To assess these parameters, a fit of the band using a pseudo-Voigt profile <sup>[27]</sup> was

performed and the full width at half maximum (FWHM) and the center of the fitted function were determined. Figure S3b displays an exemplary fit. This was done for the whole HSI cube, the distribution of the center position and FWHM over the imaged surface are represented in Figure S3c and d, respectively. In the central circle with a diameter of 70 mm the center position varies around  $746\text{ cm}^{-1}$  by no more than  $2\text{ cm}^{-1}$  with a standard deviation of  $0.28\text{ cm}^{-1}$ . An aggregation of extreme values at the edges of the image is observed. Similarly, the calculated FWHM ranges from 10 to  $14\text{ cm}^{-1}$  in the inner circle, with considerable outliers at the edges of the image. These extreme values are due to the lower intensity of the exciting laser at the edges of the imaged area, reducing the SNR of the resulting spectra and preventing a regular fit for center position and especially for FWHM evaluation. Overall, the reported deviations of both center position and FWHM are within the expected error margin, given that the spectral resolution of the filter is specified to be around  $7.5\text{ cm}^{-1}$ . This means that adequate Raman spectra collection using the tunable filter is viable for the whole aperture given a strong enough laser excitation

### 3.3. Signal to noise

To investigate the signal to noise performance of PI and HSRI, a PP plate was mounted at 15 m and measured with the systems. Both instrumentations work in a pulsed and time-gated mode, meaning that after a laser pulse is emitted, a trigger signal is sent to the camera. After a set time delay of typical a few hundreds of nanoseconds (depending on the sample-telescope distance), the gate of the intensifier is opened for 5 ns. This way, otherwise interfering light sources can be suppressed and the Raman signal from the sample can be maximized. The SNR in this study was calculated by using the mean intensity between  $2890$  and  $2905\text{ cm}^{-1}$  (at the center of the C-H stretch vibrational band) divided by the standard deviation between  $3090$  and  $3200\text{ cm}^{-1}$  (baseline noise).

When only one-shot measurements are performed, spectra tend to be of low quality as can be observed in Figure 4a. Therefore, usually more than one pulse is accumulated on the CCD in order to increase the SNR. With increasing number of accumulations the quality of the spectra improves considerably.



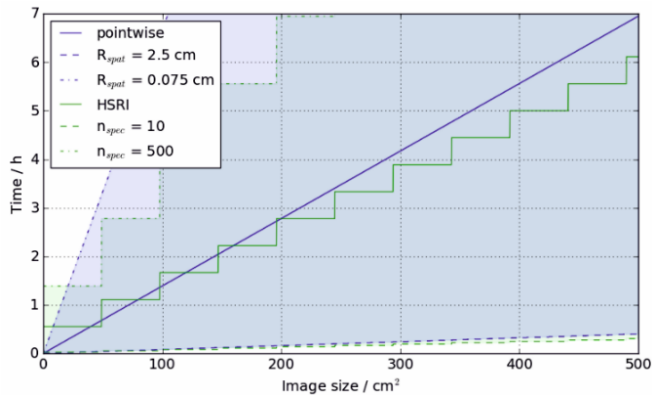
**Figure 4.** a) Spectra of polypropilene acquired with the pointwise imaging system for two different number of accumulations with calculated SNRs. b) Signal to noise for both setups over the number of accumulations, i.e. acquisition time.

Figure 4b shows the increase of SNR with increasing numbers of accumulation in the expected way of the square root of accumulations (fitted curves). For the HSRI, an area of pixels equaling the excitation area of the PI imager was averaged (28 mm<sup>2</sup>) in order to calculate the SNR. As visualized in Figure 4b the PI imager and the HSRI show similar results in SNR. This favors the HSRI setup, when comparing the laser power impinging onto the sample. The laser sends out an energy of 50.8 mJ/pulse, which yields an averaged power of 0.5 W and considering a beam diameter of 6 mm results in power density of 1.77 W/cm<sup>2</sup> for the PI system. The HSRI uses an expanded beam to an effective diameter of approximately 100 mm, which leads to a power density 6.4 mW/cm<sup>2</sup>, a 277-fold decrease compared to the PI system. The possibility of

using lower laser power densities is beneficial for practical use of such stand-off Raman systems, where moderate power density levels are sought after due to eye-safety concerns in civil and also military applications. Since the intensity of scattered Raman photons is directly proportional to the input of laser power onto the sample, the much lower power density for the HSRI should cause a significant drop-off in SNR. Instead, a comparable SNR performance of both systems was observed. This can be explained by the higher optical throughput of the optical system, e.g. higher throughput of the LCTF compared to the spectrograph, on one side and a difference in detection efficiency of the iCCD cameras. The PIMAX 1024 RB used in the PI imager has a quantum efficiency of about 7.5 %, whereas the GenIII intensifier of the PIMAX4 1024HBF used in the HSRI has one of 45 %, six times more. Additionally, the étendue, a measure for the gathering power of an optical system, which is equal to the source emitting area multiplied by the solid angle from which the light is collected, is different. Due to the small diameter of the single fibers used in the bundle, the PI has an étendue of 0.27 mm<sup>2</sup>sr, whereas the HSRI can use up to the full sensor size of the CCD camera, amounting to an étendue of 1.09 mm<sup>2</sup>sr. This is an increase of a factor of 4 and shows one of the downsides of fiber coupled stand-off Raman instruments <sup>[28]</sup>. The throughput of the PI system could however be optimized by using a spectrograph with a F-number more suitable to the used fiber bundle. Launching the f/2.2 fiber bundle into the f/10 spectrograph approximately 40 % of the light are lost.

Additionally, it is especially useful if larger potentially contaminated or hazardous areas have to be scanned. The studied instrumentations behave differently for this task. The time consuming step for the PI is to move from point to point in order to map the area of interest. So the total measurement time scales with size of the investigated area and the spatial resolution defined by the excitation laser

beam diameter. The time consuming step for HSRI is to collect spectral images at each desired Raman shift in order to build up the HSI cube. Here, the total measurement time scales with the number of spectral images necessary for spectroscopic determination of the analytes of interest that is the extension of the spectral range. Additionally, if the area under investigation is bigger than the FOV of the HSRI, further images have to be taken. Figure S1 shows a comparison of the total measurement time for both setups. It assumes a FOV for the HSRI of 70x70 mm<sup>2</sup> at 15 m, the green and blue solid lines are the calculated time values for the respective prototype with the configuration used in this study. The dashed lines are calculated for a low spatial resolution for the PI and for a small number of spectral images for the HSRI. The dashed-dotted lines represent the opposite situation, where high spatial resolution is needed for the PI system and a high number of spectral images are needed for the HSRI system. The semi-transparent areas represent the possible or working span of both techniques (Figure S1).

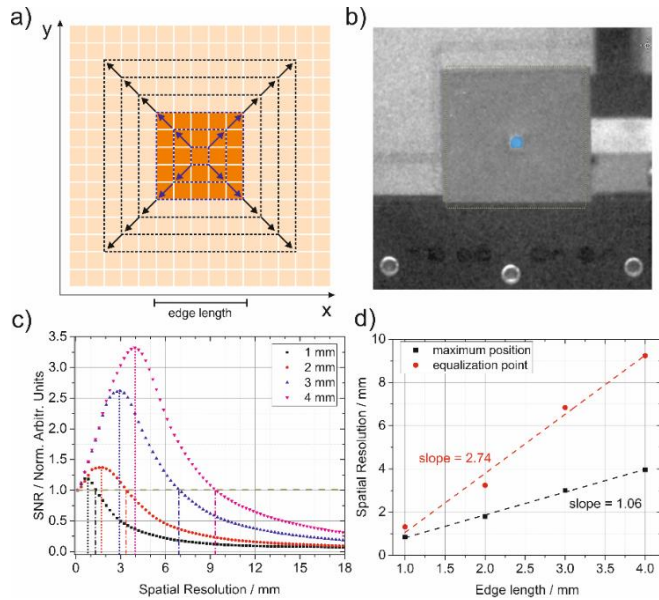


**Figure S1.** Total measurement time over image size at a target distance of 15 m. Rspat means spatial resolution of the PI, nspec is the number of spectral images for the HSRI.

## Discusión conjunta de resultados

Generally, the PI instrument will outperform the HSRI for small areas of interest, since only a few or, in the best case, a single measurement will suffice to complete the assessment of the target. For areas greater than 45 cm<sup>2</sup> the HSRI starts to be faster than the pointwise acquisition, however after reaching areas over 49 cm<sup>2</sup> the HSRI has to retake another image outside its FOV, which creates a massive increase in time consumption reflected in the step of graph. Finally, for greater image sizes than approximately 200 cm<sup>2</sup> the HSRI will always be faster than the PI. Overall, looking at the span stretched over the maxima of both techniques, the HSRI imaging speed scales more advantageously with time.

In order to highlight the importance of spatial resolution, samples with a sulfur feature of different sizes have been prepared by 3D printing polymer plates holding different sizes of cavities filled with sulfur powder. Square cavities with an edge length in the range of 1 to 4 mm and a thickness of 0.3 mm were measured at a distance of 15 m by employing 2 s acquisition time per spectral snapshot (20 accumulations), 140 ns gate delay and 5 ns gate width using the HSRI system.



**Figure 5.** a) Simplified drawing of the charge-coupled device (CCD) chip with an arbitrary feature on top of it. The dashed squares indicate different spatial resolutions. b) Greyscale image of the sample at  $15\text{ m}$  with a blue overlay of the intensity of the sulfur band at  $480\text{ cm}^{-1}$ . c) Signal-to-noise ratios (SNRs) calculated for the sulfur for different spatial averaging (simulating different spatial resolutions) and different feature sizes. The pointed lines are the position of the maximum SNR. d) Spatial resolution for which the maximum of the SNR and the equalization point can be observed for different feature sizes i.e. edge lengths.

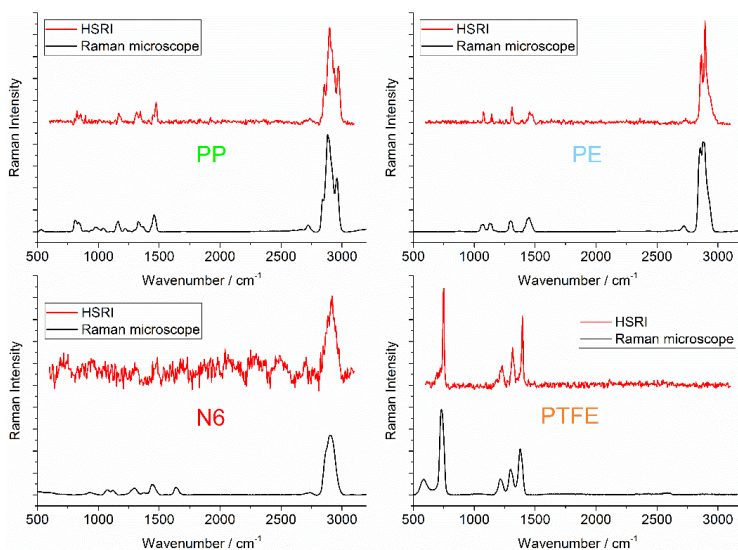
The influence of spatial resolution was explored post-measurement by choosing a central pixel inside the feature and averaging adjacent pixel spectra to decrease the spatial resolution. Then, the SNR was calculated through the maximum band intensity between  $478$  and  $482\text{ cm}^{-1}$  (at the center of the sulfur band) divided by the standard deviation of the baseline between  $510$  and  $580\text{ cm}^{-1}$  (baseline noise). The concept of this study is depicted in Figure 5a, where the reproduction of an arbitrary sample feature (dark orange) on an array detector (light orange) through the imaging optics is indicated. The stepwise variation of the spatial resolution

is achieved by spatially averaging spectra of adjacent pixels. As long as the sample feature is bigger than the spatial resolution, spatial averaging (blue arrows in Figure 5a) will result in an increase of SNR following a square root function, since the noise in the baseline is reduced with every averaging step, but the signal level stays constant. In Figure 5c the SNRs for different feature sizes are depicted in dependence of the spatial resolution, normalized to the first value for each series. In the beginning the SNR increases according to the previous stated decrease of noise. When the spatial resolution surpasses the feature size, the situation changes dramatically (indicated by the black arrows in Figure 5a), as new pixels containing solely noise are added and the signal is diluted over the whole pixel area. This still leads to a reduction of noise, however the signal intensity is also heavily reduced, which results in a significant reduction of SNR. The tipping point should coincide with the spatial resolution being of the same size as the sample feature, which was also observed in the experiments (Figure 5d, black curve). Another interesting point is the equalization point, the spatial resolution where the SNR of the different sized features drops down to the original value observed at the highest spatial resolution possible and after which a decrease in spatial resolution always results in lesser quality spectra. It is more than double the value of the feature size in the studied cases (Figure 5d, red curve). This shows in general the importance of having adequate spatial resolution, especially when small amounts of sample are to be detected on large background materials. The concept is also valid for other HSI techniques, but whiskbroom systems are more prone to difficulties, since the time-consuming step is the measurement with adequate spatial resolution. The stand-off HSRI shows its strength here, since producing adequate spatial resolution is not the time-consuming task and can even be changed during the measurement and in post-processing on a software basis.

### 3.4. Chemometric image analysis

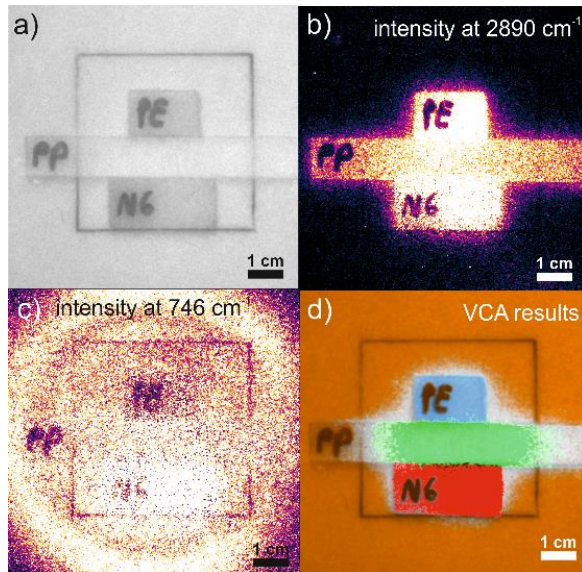
The HSRI approach usually leads to large datasets, which in most cases is not informative for the user nor required to solve the given analytical problem. Hence, efforts are made to simplify data interpretation by using a variety of algorithms to deconvolute and classify the recorded data in order to facilitate the extraction of the required information needed to provide a meaningful result. Linear unmixing algorithms are commonly used for hyperspectral datasets, when the presence of pure pixels can be assumed. Among these methods, VCA is advantageous because the VCA algorithm competes with state-of-the-art methods whilst exhibiting a computational complexity between one and two orders of magnitude lower than the best available method [25]. It additionally involves noise characterization in order to reduce the sensitivity to noise by applying a singular value decomposition. VCA calculates endmembers of the vertices of a simplex spanned by the spectral differences within the dataset. The endmembers represent the most varying spectra with nonnegative intensities and concentrations and can be assigned to chemical constituents in most cases. An example is given in Figure 6, where a sample consisting of four different polymers (PTFE, PE, PP and nylon) is depicted (Figure 6a). It was placed at a distance of 15 m to the telescope and measured using the HSRI prototype. The intensity images of the bands 746 and 2890  $\text{cm}^{-1}$  are shown. The effects of polymer thickness and reflectivity can then be observed in Figure 6c. Since PTFE is the background material, the intensity at 746  $\text{cm}^{-1}$  reflects the laser beam intensity distribution, except for the area blocked by the PE. In the case of PE, which is thicker and less transparent, a drop-off in intensity can be observed. For the nylon however, which is of the same thickness as the PE, a stronger signal is obtained, which is attributed to the fluorescence of the material, which results in an elevated baseline. The signal at 2850  $\text{cm}^{-1}$  is very intense for all

polymers, except for PTFE, exhibiting the CH stretch vibration at this spectral region. Figure S2 provides a comparison of spectra of selected pixels of the respective polymer measured with the HSRI with a confocal Raman microscope.



**Figure S2.** Comparison of stand-off HSRI spectra and reference spectra collected with a Horiba LabRAM confocal microscope. All spectra were baseline corrected and normalized for better comparability. Nylon showed significant fluorescence during the measurement with the HSRI, so the characteristic of the Rayleigh filter is visible in the spectrum.

The VCA is able to find most pixels associated with the respective polymers, except towards some boundary regions between them, where because of mixed spectra the algorithm does not correlate correctly. Nevertheless, as shown in 6d, VCA finds PE (marked in blue), PP (marked in green), Nylon (marked in red) and PTFE (marked in orange). This fast classification of the image can prove useful to a variety of applications.



**Figure 6.** a) Monochrome image of the sample consisting of the 4 polymers. b) Intensity distribution at 2850  $\text{cm}^{-1}$  (polyethylene [PE]). c) Intensity distribution at 746  $\text{cm}^{-1}$  (polytetrafluoroethylene [PTFE]). d) Overlay for vertex component analysis (VCA) endmembers correlation to the different polymers in different colors.

#### 4. Conclusion

In this study, a comparison of a pointwise stand-off Raman imager and a direct hyperspectral Raman imager in terms of achievable field of view, signal to noise, spectral and spatial resolution and total measurement time is reported. The investigated prototypes differ in maximal possible FOV, which for the PI is limited by the numerical aperture of the optical fiber coupling the telescope with the spectrograph and for the HSRI by the FOV of the telescope and CCD size. The HSRI exhibits a FOV of roughly 70x70 mm, which is nearly ten times more than the FOV of the PI. The stability of the spectral resolution of the tunable filter over the open aperture was investigated and determined to be better than 2  $\text{cm}^{-1}$  for the central position and better than 4  $\text{cm}^{-1}$  for the FWHM of the PTFE band at 746  $\text{cm}^{-1}$ . This proves the viability of the filter as a dispersive

element for direct Raman imaging. The excitation beam has to be expanded in order to illuminate the whole scene for the HSRI, which leads to significantly lower power density at the sample. For the tested scenario the difference in power density amounts close to 277 fold increase with the PI imager. Nevertheless, the HSRI setup shows similar SNR values over the same measurement time, although the PI system would benefit substantially from a better matched fiber bundle-spectrograph matching.

A significant contributor to the time needed for data acquisition is the size of the area to be investigated. A bigger FOV helps with screening larger areas faster. Inversely, the higher the spatial resolution of the imager has to be, the more time a mapping instrument would need, since the diameter of the excitation laser beam would need to be small and the number of mapping points would substantially increase. Spatial resolution is better suited for the HSRI, since the whole FOV of the collection optics can be used with a spatial resolution defined by the pixel size of the CCD chip. In time-gated configuration like stand-off applications, the required time is proportional to the repetition rate of the laser and inversely proportional to the number of accumulations, which holds true for both configurations.

In summary, two stand-off Raman imagers were constructed and compared, one relying on mapping of the excitation laser beam, the other directly imaging the scene for single Raman shifts in order to create a HSI cube. The HSRI instrument showed better suitability for large area scanning, especially if a small number of spectral snapshots are required and offers a smaller electric and mechanic footprint, making it the better choice for mobile applications in the field.

## Acknowledgements

Financial support was provided by the Austrian Science Fund (FWF) under the scope of the Translational-Research programme within the research project “Advanced stand-off Raman spectroscopy for chemical identification from safe distances” (TRP-265). M. González-Cabrera acknowledged the Ministry of Education, Culture and Sports (FPU15/03119 fellowship) for a mobility grant during her doctorate studies.

## References

- [1] S.M. Angel, N.R. Gomer, S.K. Sharma, C. McKay, Remote Raman Spectroscopy for Planetary Exploration: A Review, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 137–150.
- [2] T.E. Acosta-Maeda, A.K. Misra, L.G. Muzangwa, G. Berlanga, D. Muchow, J. Porter, S.K. Sharma, Remote Raman measurements of minerals, organics, and inorganics at 430 m range., *Appl. Opt.* 55 (2016) 10283–10289.
- [3] A.K. Misra, S.K. Sharma, T.E. Acosta, J.N. Porter, D.E. Bates, Single-Pulse Standoff Raman Detection of Chemicals from 120 m Distance during Daytime, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 1279–1285.
- [4] B. Zachhuber, G. Ramer, A. Hobro, E. t. H. Chrysostom, B. Lendl, Stand-off Raman spectroscopy: a powerful technique for qualitative and quantitative analysis of inorganic and organic compounds including explosives., *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2439–47.
- [5] K.L. Gares, K.T. Hufziger, S. V Bykov, S.A. Asher, Review of explosive detection methodologies and the emergence of standoff deep UV resonance Raman, (n.d.).

- [6] S. Wallin, A. Pettersson, H. Ostmark, A. Hobro, Laser-based standoff detection of explosives: a critical review., *Anal. Bio. Chem.* 395 (2009) 259–74..
- [7] B. Zachhuber, C. Gasser, E. t. H. Chrysostom, B. Lendl, Stand-Off Spatial Offset Raman Spectroscopy for the Detection of Concealed Content in Distant Objects, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9438–9442.
- [8] M.L. Ramírez-Cedeño, W. Ortiz-Rivera, L.C. Pacheco-Londoño, S.P. Hernández-Rivera, Remote Detection of Hazardous Liquids Concealed in Glass and Plastic Containers, *IEEE Sens. J.* 10 (2010).
- [9] A.A. Gowen, Y. Feng, E. Gaston, V. Valdramidis, Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology, *Talanta.* 137 (2015) 43–54.
- [10] A.A. Gowen, C.P. O'Donnell, P.J. Cullen, G. Downey, J.M. Frias, Hyperspectral imaging – an emerging process analytical tool for food quality and safety control, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 590–598.
- [11] Y.J. Hsu, C.-C. Chen, C.-H. Huang, C.-H. Yeh, L.-Y. Liu, S.-Y. Chen, Line-scanning hyperspectral imaging based on structured illumination optical sectioning., *Biomed. Opt. Express.* 8 (2017) 3005–3016.
- [12] T. Dieing, O. Hollricher, J. Toporski, *Confocal Raman Microscopy*, 2010.
- [13] P.J. Lapray, X. Wang, J.B. Thomas, P. Gouton, Multispectral filter arrays: Recent advances and practical implementation, *Sensors (Switzerland).* 14 (2014) 21626–21659.
- [14] S.E. Harris, R.W. Wallace, Acousto-Optic Tunable Filter\*, *J. Opt. Soc. Am.* 59 (1969) 744.

- [15] H.R. Morris, C.C. Hoyt, P.J. Treado, Imaging Spectrometers for Fluorescence and Raman Microscopy: Acousto-Optic and Liquid Crystal Tunable Filters, *Appl. Spectrosc.* 48 (1994) 857–866.
- [16] C. Calaza, L. Fonseca, M. Moreno, S. Marco, C. Cané, I. Gracia, A surface micromachining process for the development of a medium-infrared tuneable Fabry–Perot interferometer, *Sensors Actuators A Phys.* 113 (2004) 39–47.
- [17] M. Kaarre, S. Kivi, P.E. Panouillot, H. Saari, J. Mäkynen, I. Sorri, M. Juuti, J. Mäkynen, M. Juuti, Development of tunable Fabry-Perot spectral camera and light source for medical applications, *AIP Conf. Proc.* 1537 (2013) 231–237.
- [18] J.W. Evans, The birefringent filter; a correction., *J. Opt. Soc. Am.* 39 (1949) 412.
- [19] G. Shabtay, E. Eidinger, Z. Zalevsky, D. Mendlovic, E. Marom, Tunable birefringent filters - optimal iterative design, *Opt. Express.* 10 (2002) 1534–1541.
- [20] J. Staromlynska, S.M. Rees, M.P. Gillyon, High-performance tunable filter., *Appl. Opt.* 37 (1998) 1081–8.
- [21] N. Gat, Imaging spectroscopy using tunable filters: a review, in: H.H. Szu, M. Vetterli, W.J. Campbell, J.R. Buss (Eds.), *Proc. SPIE*, 2000: pp. 50–64.
- [22] H.R. Morris, C.C. Hoyt, P. Miller, P.J. Treado, Liquid crystal tunable filter Raman chemical imaging, *Appl. Spectrosc.* 50 (1996) 805–811.
- [23] H. Östmark, M. Nordberg, T.E. Carlsson, Stand-off detection of explosives particles by multispectral imaging Raman spectroscopy., *Appl. Opt.* 50 (2011) 5592–9.

- [24] J.W. Evans, The Birefringent Filter, *J. Opt. Soc. Am.* 39 (1949) 229.
- [25] J.M.P. Nascimento, J.M.B. Dias, Vertex component analysis: A fast algorithm to unmix hyperspectral data, *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* 43 (2005) 898–910.
- [26] C.J. Peacock, P.J. Hendra, H.A. Willis, M.E.A. Cudby, Raman spectrum and vibrational assignment for poly(tetrafluoroethylene), *J. Chem. Soc. A Inorganic, Phys. Theor.* (1970) 2943.
- [27] F. Sánchez-Bajo, F.L. Cumbreira, The Use of the Pseudo-Voigt Function in the Variance Method of X-ray Line-Broadening Analysis, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 427–430.
- [28] A.K. Misra, S.K. Sharma, C.H. Chio, P.G. Lucey, B. Lienert, Pulsed remote Raman system for daytime measurements of mineral spectra, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 61 (2005) 2281–2287.

• ***Identificación de pigmentos históricos mediante espectroscopía Raman a distancia***

**Resultados no publicados**

El uso de las medidas en remoto es de gran interés porque permite acceder a espacios y muestras que de otra forma serían inalcanzables. Tal es el caso de algunos objetos del patrimonio histórico-artístico. El grupo de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral tiene mucha experiencia en medidas en espacios especiales como la Alhambra y la excavación en Qubbet el Hawa (Egipto), donde es imprescindible acceder con equipamiento portátil que permita realizar análisis *in situ*. En estos casos, se han estudiado o bien objetos que no se pueden extraer de la zona protegida, o bien bienes inmuebles que no son muestreables. Sin embargo, el acceso a determinadas obras es, en ocasiones, imposible por su localización en techos o paredes muy elevadas. La potencialidad del uso de medidas en remoto se justifica ampliamente en estos contextos.

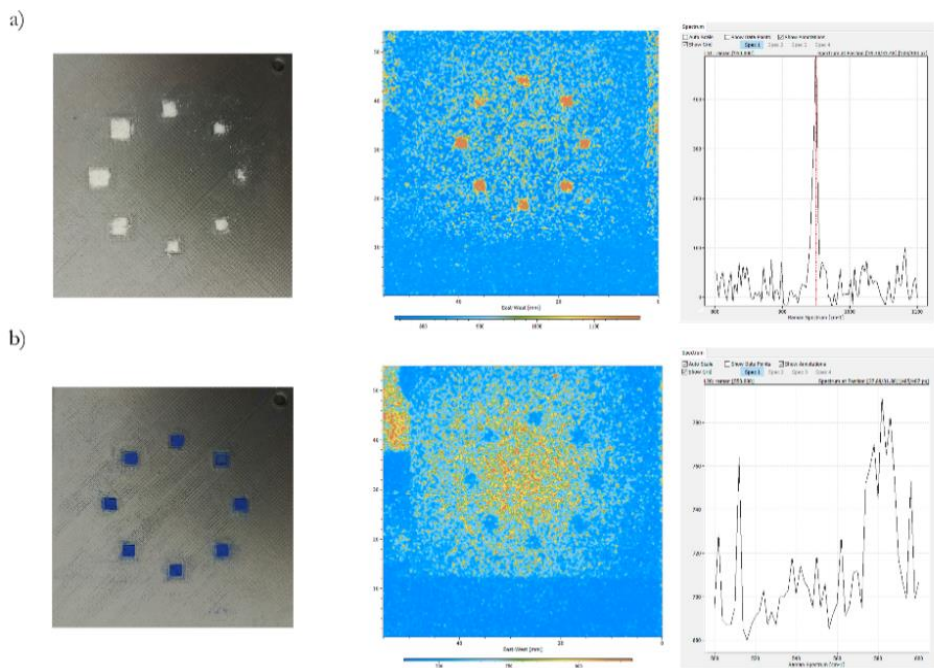
Así, durante la estancia predoctoral llevada a cabo, se propuso la optimización de este tipo de medidas para su aplicación en entornos del patrimonio. Para ello, se empleó la configuración directa de escaneo espectral equipada con una fuente de radiación de 532 nm.

Los estudios se realizaron empleando muestras puras de los pigmentos más usuales y muestras modelo de pinturas (pigmento-aglutinante-yeso) preparadas de forma análoga a como se ha descrito anteriormente.

Para optimizar las condiciones de medida y contrastar el funcionamiento del equipo, junto con los pigmentos puros, se empleó un patrón de  $\text{NaClO}_3$  (sustancia que había sido previamente testada por el grupo de Viena en trabajos anteriores<sup>1</sup>). Debe tenerse en cuenta que la profundidad de enfoque en esta configuración es grande, por lo que es necesario conocer el comportamiento a

## Discusión conjunta de resultados

diferentes espesores de muestra. Para ello, y utilizando una impresora 3D, se prepararon moldes de ácido poliláctico (PLA) con ocho huecos de espesores desde 0,1 hasta 0,8 mm, donde se colocaron las muestras. Los resultados extraídos pueden observarse en la Figura 1.



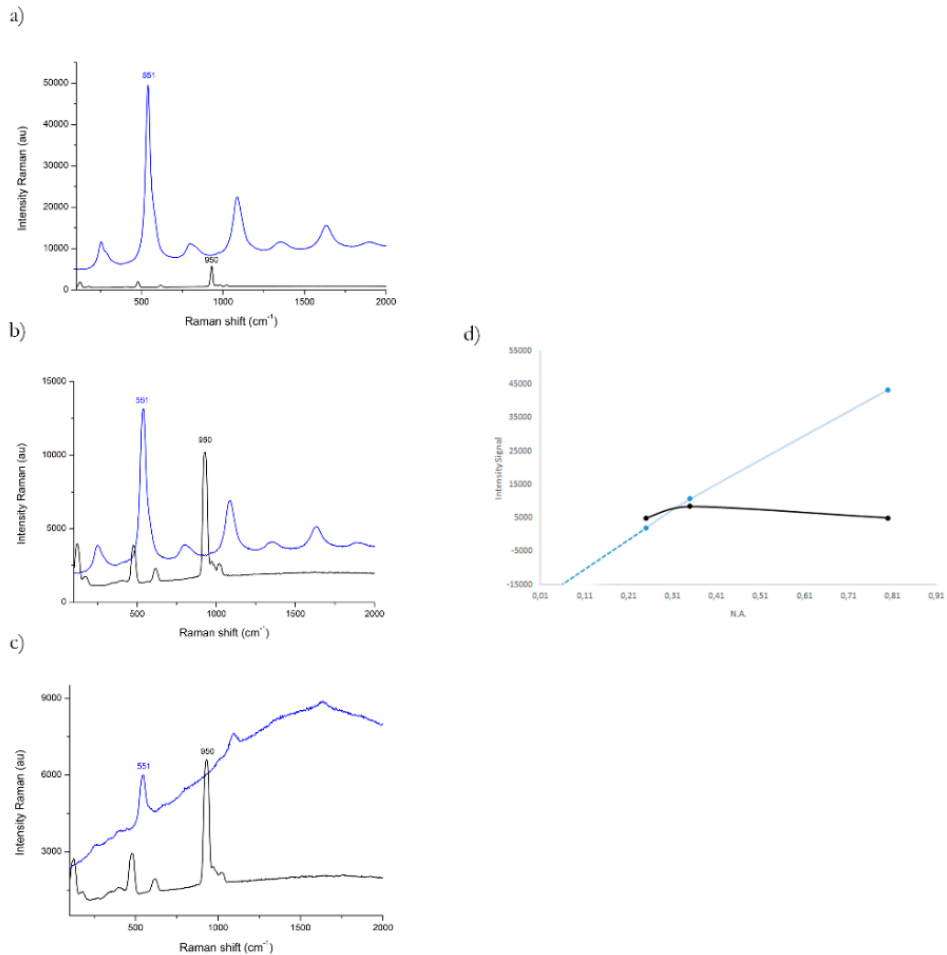
**Figura 1.** Moldes con cavidades de diferentes espesores (izquierda) y distribuciones espaciales obtenidas para las bandas espectrales señaladas en rojo (derecha) para las muestras de a) NaClO<sub>3</sub> y b) azul ultramar

Como puede observarse, la banda Raman característica del NaClO<sub>3</sub>, situada a 950 cm<sup>-1</sup>, es claramente visible y muestra una distribución espacial uniforme en cada una de las cavidades donde se aloja dicha sustancia. Sin embargo, la banda Raman esperable para el azul ultramar a 548 cm<sup>-1</sup> no puede distinguirse del ruido y, por tanto, no es posible identificar el pigmento en la imagen.

Se trató de mejorar estos resultados reduciendo la distancia de medida (desde 15 m a 10 m y luego a 5 m, distancia mínima a la que es posible enfocar la muestra con el telescopio). De este modo, se pretendía aumentar la cantidad de fotones recogidos tras la interacción, pero no se consiguió una mejora sustancial de los resultados. El aumento de la densidad de potencia de láser que incidía en la muestra (mediante la variación de la distancia entre las lentes del expansor de haz), provocó la aparición de pequeñas áreas con quemaduras en las muestras, por lo que se descartó.

El azul ultramar es un pigmento que da un espectro Raman muy intenso, como se ha descrito anteriormente, especialmente para la banda de  $548\text{ cm}^{-1}$ , por lo que resulta extraño este comportamiento. Para tratar de entender la diferencia de las medidas en remoto del patrón y del pigmento, se procedió al registro de espectros de las dos sustancias mediante microscopía Raman Confocal (ver Figura 2). Para ello, se emplearon las muestras sólidas en formato polvo y diferentes objetivos (10X, 20X y 100X).

## Discusión conjunta de resultados

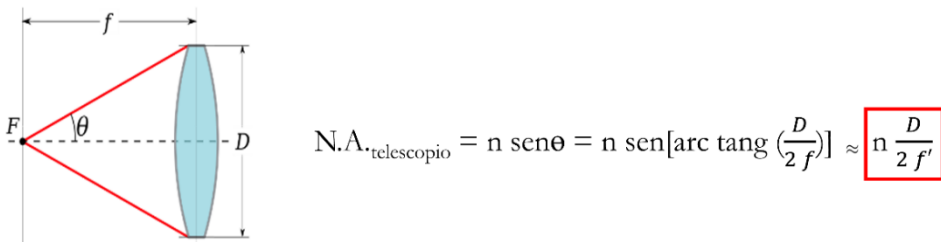


**Figura 2.** Espectros micro-Raman puntuales registrados para las muestras de azul ultramar (azul) y  $\text{NaClO}_3$  (negro) usando los objetivos de a) 100X, b) 20X y c) 10X; d) Gráfico comparación entre la relación de la Intensidad Raman y la apertura numérica (N.A.) para los tres casos descritos

Resulta llamativo que, mientras que la intensidad de la banda principal del espectro Raman del  $\text{NaClO}_3$  permanece prácticamente constante con todos los objetivos utilizados, la banda a  $548 \text{ cm}^{-1}$  propia del estiramiento simétrico del radical  $\text{S}^{3-}$  en la composición del azul ultramar, disminuye drásticamente su intensidad conforme lo hace la magnificación del objetivo empleado. Así, en la

Figura 2 d) se compara la intensidad de las dos bandas en función de la apertura numérica del objetivo ( $N.A. = n \sin \theta$ ). Como, en este caso  $n=1$  (aire), se obtienen valores de N.A. de 0,25, 0,35 y 0,80 para los objetivos de 10X, 20X y 100X, respectivamente.

De forma análoga, y mediante el uso de la misma ecuación aplicada al telescopio que se emplea para las medidas de camino abierto (Figura 3), podría determinarse la intensidad teórica de la señal de la banda Raman más intensa del azul ultramar.



**Figura 3.** Fórmula y demostración gráfica para calcular la apertura numérica (N.A.) en el caso del telescopio en la configuración de Raman de camino abierto

En los experimentos llevados a cabo, con condiciones de  $n=1$  (aire),  $D=150$  mm y  $f=5$  m (distancia de enfoque), el valor de N.A. calculado es de 0,015. La extrapolación de este dato en la gráfica de la Figura 2 d) (ver zona punteada) demostraría que la intensidad relativa teórica de la banda Raman más característica del azul ultramar sería mucho más baja que aquella que se obtiene usando el objetivo de 10X. Por lo tanto, ésta podría ser una de las causas principales de las dificultades a la hora de caracterizar este pigmento mediante el uso de la espectroscopía Raman de camino abierto.

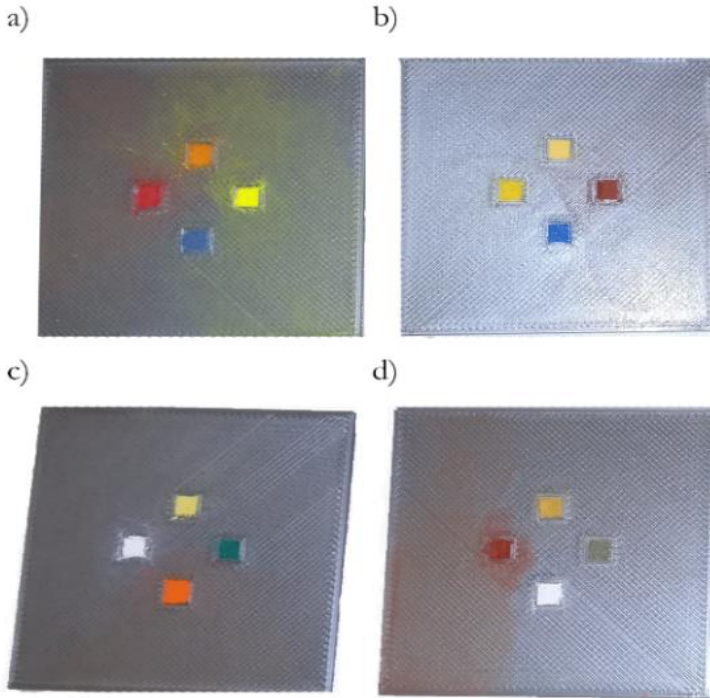
Para comprobar si esta dificultad es común a los pigmentos de interés, se probó una selección de pigmentos de distintos colores y composición química (ver Tabla 1).

## Discusión conjunta de resultados

**Tabla 1.** Principales características de los pigmentos históricos empleados en el análisis de espectroscopía Raman a distancia

Pigmento	Composición química	Color
Azurita	$\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$	Azul intenso
Azul egipcio	$\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$	Azul verdoso
Cinabrio	$\text{HgS}$	Rojo bermellón
Ocre rojo	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	Rojo marrón
Hematite	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	Rojo óxido
Rejalgar	$\text{As}_4\text{S}_4$	Rojo anaranjado
Minio	$(\text{Pb}^{2+})_2\text{Pb}^{4+}\text{O}_4$	Naranja brillante
Oropimente	$\text{As}_2\text{S}_3$	Amarillo intenso
Amarillo de Cadmio	$\text{CdS}$	Amarillo brillante
Amarillo de Nápoles	$\text{Pb}_3(\text{SbO}_4)_2$	Amarillo claro
Masicote	$\text{PbO}$	Amarillo anaranjado
Ocre amarillo	$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Marrón claro
Verde de Egipto	$\text{CaSiO}_3$ y $\text{Cu}$ disuelto	Verde turquesa
Verde de Verona	$\text{Cu}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Verde terroso
Blanco de zinc	$\text{ZnO}$	Blanco nieve
Blanco de Kremer	$2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$	Blanco

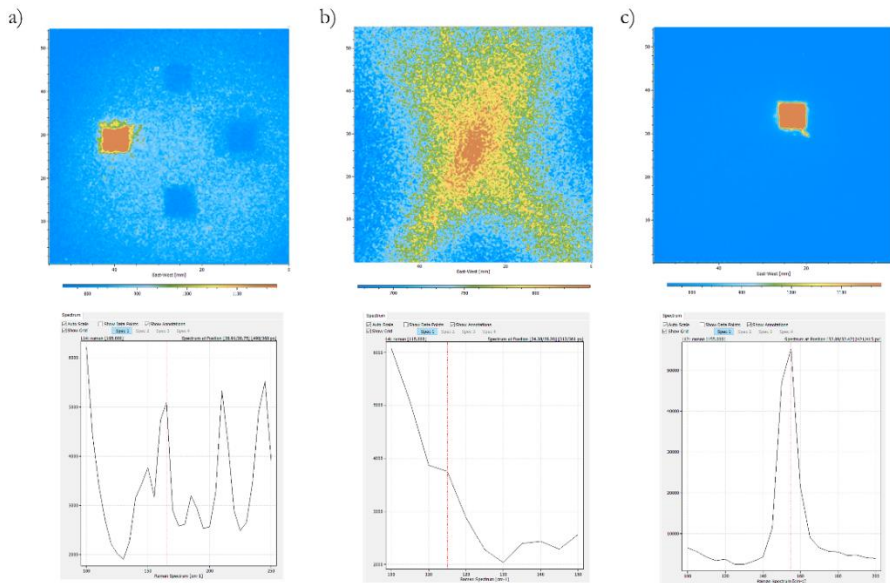
Para ello se imprimieron varios soportes equivalentes de PLA con cavidades para alojar cuatro muestras de forma simultánea (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de las muestras preparadas sobre soporte de PLA para los pigmentos a) rejalgar, amarillo de cadmio, azurita y cinabrio, b) amarillo de Nápoles, ocre rojo, azul egipcio y oropimente, c) masicote, verde de Egipto, minio y blanco de zinc y d) ocre amarillo, verde de Verona, blanco de Kremer y hematite

En la siguiente figura (Figura 5) se ilustran algunos de los resultados obtenidos para las medidas de cada pigmento en el rango espectral en el que se encuentra su banda Raman más intensa.

## Discusión conjunta de resultados

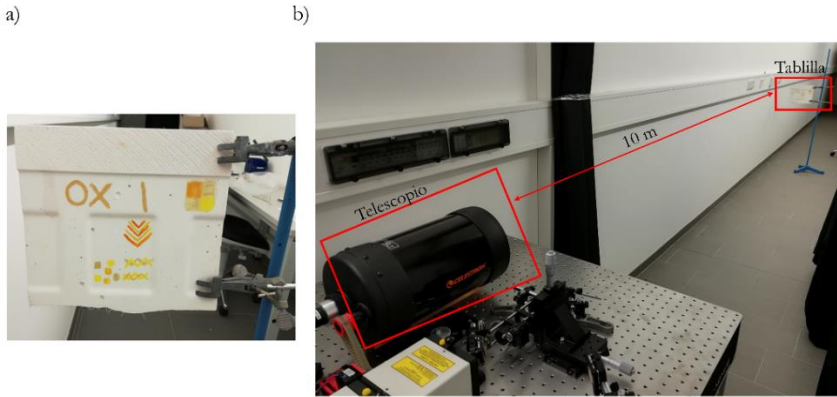


**Figura 5.** Distribuciones espaciales (arriba) de la intensidad de la banda Raman señalada en rojo (abajo) para las muestras de a) oropimente, b) hematite y c) masicote

Como puede observarse, en algunos de los pigmentos se obtuvieron distribuciones espaciales claramente reconocibles, mientras que, en otros muchos, la identificación inequívoca no fue posible.

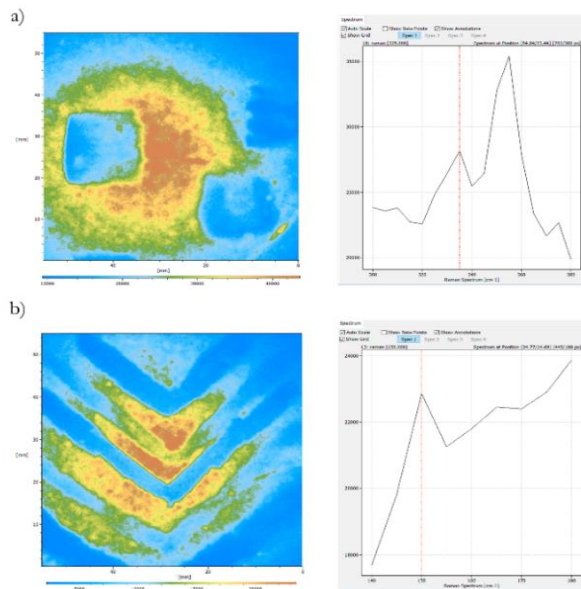
Se optimizaron nuevamente las medidas modificando rango espectral, tiempo de adquisición o distancia de enfoque de la muestra (15 m, 10 m y 5 m). Los mejores resultados se obtuvieron en el caso de los siguientes pigmentos amarillos y anaranjados: masicote, oropimente, amarillo de cadmio y rejalgar.

Para simular condiciones de medida semejantes a una pintura mural, se prepararon muestras de varios de estos pigmentos sobre soporte de yeso. En la Figura 6 puede observarse el proceso llevado a cabo en dichos experimentos.



**Figura 6.** a) Soporte de yeso pintado con masicote, oropimente, rejalgar y amarillo de cadmio en distintas formas geométricas para su identificación y b) recreación de la medida a 10 m en el laboratorio.

A continuación, se muestran algunos de los resultados registrados, usando el Software ImageLab para su tratamiento (Figura 7).



**Figura 7.** Ejemplo de las distribuciones espaciales (izquierda) y espectros Raman (derecha) obtenidos para las muestras de a) cuadrados superpuestos pintados con

## Discusión conjunta de resultados

masicote, oropimente, rejalgar y amarillo de cadmio y b) líneas oblicuas pintadas con oropimente y rejalgar

Como puede observarse en la figura anterior, aunque se aprecian algunas pautas de las formas geométricas dibujadas, no se logró obtener una identificación inequívoca y una diferenciación suficientemente clara del soporte de yeso. Esto puede deberse a la profundidad del enfoque con el telescopio, que hace que sea difícil diferenciar una fina capa de pigmento (generalmente menor de 100  $\mu\text{m}$ ) sobre el yeso.

A esto hay que añadir, que la fluorescencia debida a los aglutinantes empleados para aplicar los pigmentos, es especialmente intensa cuando se emplea excitación en la región visible, como es el caso del láser de 532 nm. A pesar de que la configuración instrumental utilizada (láser pulsado) está indicada para eliminar este efecto, no es suficiente en este caso. Además, según la experiencia del grupo de investigación de la Universidad de Jaén, así como de la bibliografía consultada, tanto en análisis de laboratorio<sup>2</sup> como de instrumentos portátiles<sup>3</sup>, el láser de 532 nm resulta menos eficaz para la identificación de pigmentos que otros como 632 nm o 785 nm. El empleo de excitación en la región infrarroja puede representar una posibilidad de mejora de estas medidas, en el aspecto de reducción de la fluorescencia, aunque el espesor de muestra seguirá siendo muy bajo lo que resulta una dificultad intrínseca a esta aplicación.

Este trabajo supone un análisis preliminar que demuestra las limitaciones y la dificultad de la detección Raman en remoto aplicada a la investigación de objetos de interés pictórico.

## **Bibliografía**

- [1] Zachhuber B, Ramer G, Hobro A, Chrysostom ETH, Lendl B. Stand-off Raman spectroscopy: A powerful technique for qualitative and quantitative analysis of inorganic and organic compounds including explosives. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400:2439-2447.
- [2] Marucci G, Beeby A, Parker AW, Nicholson CE. Raman spectroscopic library of medieval pigments collected with five different wavelengths for investigation of illuminated manuscripts. *Anal Methods.* 2018;10:1219-1236.
- [3] Rousaki A, Costa M, Saelens D, et al. A comparative mobile Raman study for the on field analysis of the Mosaico de los Amores of the Cástulo Archaeological Site (Linares, Spain). *J Raman Spectrosc.* 2020;51:1913-1923.



## 6. CONCLUSIONES

---



## Conclusiones

A continuación, se presentan las principales conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral en relación con los objetivos propuestos:

- La adquisición de imágenes hiperespectrales de espectroscopía vibracional ha demostrado ser eficaz, versátil y de gran aplicabilidad frente a las medidas puntuales de espectroscopía convencional. El registro de características espectrales en relación con coordenadas espaciales en cada píxel ha aportado información analítica valiosa y robusta para su empleo en la caracterización y análisis de muestras complejas y naturaleza heterogénea. Por lo tanto, ha podido ser empleada con éxito en el estudio de materiales variados con interés en diversos campos científicos.
- El empleo de herramientas de análisis quimiométrico se ha mostrado como una etapa esencial en el tratamiento de la elevada cantidad de datos generados al registrar una imagen hiperespectral. En relación con los datos originales, ha sido primordial la etapa de pretratamiento espacial y espectral, habiéndose llevado a cabo la eliminación de píxeles dañados, el truncado de variables para eliminar saturaciones o datos inservibles y agilizar los cálculos matemáticos y metodologías como el suavizado o la corrección de línea base. Una vez obtenidos los datos procesados, el uso de técnicas análisis de exploración, segmentación o clasificación ha permitido detectar tendencias espectrales relevantes y, consecuentemente, seleccionar regiones de interés espacialmente diferenciadas, agrupar contribuciones y llevar a cabo estudios en términos de temporalización, demostrar las variaciones entre bandas, hombros o la aparición de nuevas características espectrales a lo largo de procesos químicos complejos o

incluso clasificar muestras históricas en base a parámetros o umbrales hiperespectrales previamente establecidos.

- El registro de imágenes hiperespectrales de microespectroscopía infrarroja (FTIR) para el estudio de procesos químicos complejos en evolución ha permitido profundizar en el conocimiento de los cambios espectrales que tienen lugar en la maduración natural de la aceituna y el envejecimiento artificial de pinturas.

- Durante el proceso de maduración de la aceituna, ha sido posible monitorizar las transformaciones producidas en los distintos tejidos que forman el fruto en base a la distribución espacial de las diferentes contribuciones espectrales, observándose, por ejemplo, la acumulación de aceite de oliva. El uso de PLS-DA permitió, además, determinar el estado de maduración en el mesocarpio gracias a la detección de la disminución de polisacáridos y el aumento de bandas propias de carboxilatos. Esto indica que dicha metodología podría implementarse en el futuro para la detección del índice madurativo del fruto e inspección de la calidad del mismo.

- El empleo del análisis hiperespectral ha permitido un mayor conocimiento acerca de las interacciones químicas y la degradación producidas en mezclas pigmento-aglutinante de diferente naturaleza cuando son sometidas a condiciones controladas de envejecimiento acelerado. De esta forma, se ha confirmado el rol protector de algunas capas de pigmentos, la oxidación de grupos funcionales predominantes en la composición de aglutinantes proteicos y la evaporación de aglutinantes lipídicos, así como su interacción con el medio de soporte.

- En relación a los análisis de tipo multimodal llevados a cabo, el registro de microimágenes hiperespectrales Raman ha demostrado su utilidad para caracterizar muestras naturales y sintéticas del pigmento azul ultramar y para extraer información espacial acerca de su heterogeneidad. Tanto el empleo de la adquisición simultánea de patrones espectrales Raman y luminiscentes, como la combinación de información hiperespectral obtenida de técnicas complementarias en un único archivo multisensor, ha permitido estudiar la distribución espacial de las impurezas minerales en su composición. Además, se ha podido relacionar la presencia de dichos minerales con la calidad decreciente de muestras naturales en base a su proceso de extracción. Las características espectrales que emergen en la región entre  $1200$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$  en los espectros Raman de las muestras naturales cuando se emplea un láser de  $785\text{ nm}$  como fuente de radiación ha sido, igualmente, espacialmente atribuida a muestras de baja calidad y cuyo contenido en los minerales diópsido y flogopita y en elementos metálicos de transición como Ti, V, Cr o Mn es mayor que en el caso de pigmentos puros o sintéticos.
- En los estudios realizados, se han comparado distintos modos de adquisición de imágenes hiperespectrales, basados en el escaneo de tipo espacial, como el método punto a punto y el escaneo de tipo espectral, como la captura de área. Mientras que el escaneo puntual se ha empleado para las adquisiciones a nivel microscópico, recogiendo todo el rango espectral determinado para cada píxel bidimensional de la zona de muestra, el escaneo espectral recoge toda la imagen de distribución espacial relacionada con la intensidad a una cierta longitud de onda o variable espectral. Éste último ha sido explorado mediante la adquisición

de imágenes Raman en modo remoto o de camino abierto; es decir, manteniendo una distancia física de varios metros entre el telescopio y la muestra de análisis. De esta forma, no sólo se han caracterizado sustancias plásticas de diferente composición química, sino que se han llevado a cabo distintos experimentos con pigmentos históricos, poniéndose de manifiesto las limitaciones de la técnica para la caracterización de muestras pictóricas en modo remoto.

## Conclusions

The main conclusions obtained in this Ph.D. Dissertation are presented below:

- The acquisition of vibrational spectroscopy hyperspectral images has proven to be efficient, versatile, and highly applicable in comparison to conventional spectroscopy single point measurements. The recording of spectral features in relation to spatial coordinates at each sample pixel has provided valuable and robust analytical information. Therefore, this methodology has been successfully employed in the study of complex and heterogeneous materials with interest in diverse scientific fields.
- The use of chemometric analysis tools has proven to be an essential step in the treatment of the large amount of data generated when recording a hyperspectral image. In relation to the original data, spatial and spectral pre-treatments become crucial, for example to eliminate damaged pixels, truncate variables to eliminate saturation or useless information and accelerate mathematical calculations. Methodologies for smoothing and baseline correction were also used. Then, the use of exploration, segmentation and classification analysis techniques allows the detection of relevant spectral trends and, consequently, the selection of spatially differentiated regions of interest. Furthermore, it has been possible to group chemical contributions and to explain changes in spectral features through complex chemical processes, and even to classify historical samples based on previously established hyperspectral parameters and thresholds.

- The recording of hyperspectral FTIR images for the study of complex evolving chemical processes was applied to the investigation of the spectral changes happening in the natural ripening of olive fruits and the artificial ageing of paints.

- During the olive fruit ripening process, it has been possible to monitor biological transformations produced in the different tissues of the fruit, based on the spatial distribution of different spectral contributions, having observed, for example, the accumulation of olive oil. The use of PLS-DA also made it possible to determine the state of maturation in the mesocarp, thanks to the detection of the decrease in polysaccharides content and the increase of infrared bands related to carboxylates. This indicates that this methodology could be implemented for future detection of the ripening index of the fruit and the inspection of its quality.

- The use of hyperspectral analysis has allowed a better understanding of the chemical interactions and degradation produced in pigment-binder mixtures of different nature under controlled conditions of accelerated ageing. In this way, the protective role of some pigment layers, the oxidation of predominant functional groups in the composition of protein binders and the evaporation of lipidic binders, as well as their interaction with the support, has been confirmed.

- The recording of multimodal hyperspectral Raman micro-images has shown its usefulness in order to characterize natural and synthetic ultramarine samples and to extract spatial information about their heterogeneity. Both the use of simultaneous acquisition of Raman and

luminescence spectral patterns, and the combination of hyperspectral information obtained from complementary techniques in a single multisensor file, have revealed the heterogeneous spatial distribution of mineral impurities in their chemical composition. Moreover, it has been possible to relate the presence of such minerals with the decreasing quality of natural pigments based on their extraction process. The spectral features that emerge in the region between  $1200\text{ cm}^{-1}$  and  $1800\text{ cm}^{-1}$  in the Raman spectra of natural samples (when  $785\text{ nm}$  laser is used as excitation source) have also been spatially attributed to low quality samples. These samples showed a higher content in diopside and phlogopite minerals and in transition metals such as Ti, V, Cr, Fe or Mn than in the case of pure and synthetic pigments.

- The comparison of different hyperspectral images acquisition modes has been accomplished, including spatial point-to-point scanning and spectral staring scanning. While point scanning has been used for acquisitions at the microscopic level, collecting the entire spectral range determined for each two-dimensional pixel in the desired sample area, spectral scanning collects the entire intensity-related spatial distribution image at a certain wavelength or spectral variable. The latter has been explored by acquiring Raman images in remote mode; that is, maintaining a physical distance of several meters between the telescope and the test sample. In this way, not only have some plastics materials of different chemical composition been characterized, but different experiments with historical pigments were also carried out, highlighting the limitations of the technique for the remote Raman characterization of pictorial samples.



ANEXO 1:  
CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

---



## **Anexo 1: Contribuciones científicas generadas durante el desarrollo de la tesis doctoral**

En este apartado se detallan todas las publicaciones científicas englobadas en el transcurso de esta Tesis Doctoral, así como la lista de contribuciones a congresos (nacionales e internacionales) y actividades de carácter divulgativo realizadas.

### **Publicaciones científicas**

**1.- Título:** Hyperspectral FTIR Imaging of olive oil fruit for understanding ripening processes

**Autores:** M. González-Cabrera, A. Domínguez-Vidal, M.J. Ayora-Cañada

**Referencia:** Postharvest Biology and Technology (2018), 145, 74-82, doi: 10.1016/j.postharvbio.2018.06.008

**Indicadores de calidad JCR:** Q1 Agronomy (5/89), Q1 Food Science and Technology (18/135), Q1 Horticulture (1/36). Número de citas: 9

**2.- Título:** Comparing mapping and direct hyperspectral imaging in stand-off Raman spectroscopy for remote material identification

**Autores:** Christoph Gasser, María González-Cabrera, María José Ayora-Cañada, Ana Domínguez-Vidal, Bernhard Lendl

**Referencia:** Journal of Raman Spectroscopy (2019), 50, 1034-1043, doi: 10.1002/jrs.5607

**Indicadores de calidad JCR:** Q2 Spectroscopy (19/42). Número de citas: 1  
Artículo perteneciente al 10% de artículos más leídos y descargados de la revista en 2019

**3.- Título:** Natural or synthetic? Simultaneous Raman/luminescence hyperspectral microimaging for the fast distinction of ultramarine pigments

**Autores:** González-Cabrera, M., Arjonilla, P., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J.

**Referencia:** Dyes and Pigments (2020), 178, 108349, doi: 10.1016/j.dyepig.2020.108349

**Indicadores de calidad JCR:** Q1 Chemistry (12/71) Q1 Engineering (26/143) Q1 Material Sciences (1/24). Número de citas: 3

**4.- Título:** Monitoring UV-accelerated alteration processes of paintings by means of hyperspectral micro-FTIR imaging and chemometrics

**Autores:** González-Cabrera, M., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J.

**Referencia:** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, In Press (Journal Pre-proof, Available online 9 February 2021) doi: 10.1016/j.saa.2021.119568

**5.- Título:** Multisensor hyperspectral imaging approach for the microchemical analysis of ultramarine blue pigments

**Autores:** González-Cabrera, M., Wieland, K., Haisch, C., Brunnbauer, L., Bleier, A., Eitenberger, E., Lendl, B., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J.

**Referencia:** Pendiente de publicación, en redacción

## **Publicaciones no incluidas en esta tesis doctoral**

**1.- Título:** External Cavity Quantum Cascade Laser-Based Mid-Infrared Dispersion Spectroscopy for Qualitative and Quantitative Analysis of Liquid-Phase Samples

**Autores:** Stefan Lindner, Jakob Hayden, Andreas Schwaighofer, Tobias Wolflehner, María González-Cabrera, Christian Kristament, Stefan Zlabinger and Bernhard Lendl

**Referencia:** Applied Spectroscopy (2020), 74, 452-459, doi: 10.1177/0003702819892646

**Indicadores de calidad JCR:** Q2 Spectroscopy (17/42), Q2 Instruments (28/64) Número de citas: 2

## **Contribuciones en congresos nacionales e internacionales**

**1.- Título:** Evolución cromática de pigmentos históricos sometidos a envejecimiento acelerado con radiación UV

**Autores:** María González-Cabrera, Julia Torres-López, Ana Domínguez-Vidal, María José Ayora-Cañada

**Congreso:** XII Congreso Nacional del Color

Tipo de comunicación: Póster

Lugar de celebración: Linares, España

**Fecha:** 25-27/09/2019

**2.- Título:** Imágenes hiperespectrales de Espectroscopía Infrarroja y Raman para la caracterización bioquímica de células y tejidos

**Autores:** María González-Cabrera

**Jornada:** I Jornadas Doctorales en Química

Tipo de comunicación: Presentación oral

Lugar de celebración: Jaén, España

**Fecha:** 29-30/05/2019

**3.- Título:** Natural or synthetic? Ultramarine blue under the view of several analytical techniques

**Autores:** María González-Cabrera, Paz Arjonilla, Ana Domínguez-Vidal, María José Ayora-Cañada

**Congreso:** TECHNART 2019 International Conference. Non-destructive and microanalytical techniques in art and cultural heritage

Tipo de comunicación: Póster

Lugar de celebración: Brujas, Bélgica

**Fecha:** 06-10/05/2019

**4.- Título:** Caracterización de pigmentos azul ultramar mediante imagen hiperespectral Raman

**Autores:** Ana Domínguez-Vidal, Paz Arjonilla, María González-Cabrera, María José Ayora-Cañada

**Congreso:** XVI Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA)

Tipo de comunicación: Póster

Lugar de celebración: Granada, España

**Fecha:** 04-05/10/2018

**5.- Título:** Imágenes Hiperespectrales Raman en modo remoto

**Autores:** María González-Cabrera, Christoph Gasser, Ana Domínguez-Vidal, María José Ayora-Cañada, Bernhard Lendl

**Congreso:** XVI Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA)

Tipo de comunicación: Presentación Flash

Lugar de celebración: Granada, España

**Fecha:** 04-05/10/2018

**6.- Título:** Study of olive fruit ripening process by means of principal component analysis of hyperspectral FTIR images

**Autores:** González-Cabrera, M., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J.

**Congreso:** XL Colloquium Spectroscopicum Internationale and IX Euro-Mediterranean Symposium on LIBS 2017 (CSI XL & EMSLIBS IX)

Tipo de comunicación: Oral

Lugar de celebración: Pisa, Italia

**Fecha:** 11-16/06/2017

**7.- Título:** Raman spectroscopy for the characterization of a polychromed marble decorative revetment from the Alhambra

**Autores:** González-Cabrera, M., Arjonilla, P., De la Torre- López, M.J., Correa-Gómez, E., Rubio-Domene, R., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J.

**Congreso:** XL Colloquium Spectroscopicum Internationale and IX Euro-Mediterranean Symposium on LIBS 2017 (CSI XL & EMSLIBS IX)

Tipo de comunicación: Póster

Lugar de celebración: Pisa, Italia

**Fecha:** 11-16/06/2017

**8.- Título:** Infrared Microspectroscopy for characterization of olive fruit changes during maturation

**Autores:** Ayora-Cañada, M.J., González-Cabrera, M., Domínguez-Vidal, A.

**Congreso:** XXV National Spectroscopy Meeting (XXV RNE) IX Iberian Spectroscopy Conference (IX CIE)

Tipo de comunicación: Póster

Lugar de celebración: Alicante, España

**Fecha:** 20-22/07/2016

### **Actividades de divulgación científica**

**1.- Tipo de actividad:** Conferencia-Taller

**Título:** ¿De qué está hecho? Descúbrelo con nuestro laboratorio móvil. Día internacional de la mujer y la niña en la ciencia

**Lugar de celebración:** Universidad de Jaén.

**Fecha:** 11/02/2020

**2.- Tipo de actividad:** Conferencia- Taller

**Título:** Elementos químicos en la vida cotidiana. 150 años de la Tabla periódica

**Lugar de celebración:** Carpa de la Feria de la Ciencia, Noche Europea de los Investigadores, Jaén.

**Fecha:** 27/09/2019

**3.- Tipo de actividad:** Conferencia- Taller

**Título:** Auténtica o no. La química es la respuesta

**Lugar de celebración:** Carpa de la Feria de la Ciencia, Noche Europea de los Investigadores, Jaén.

**Fecha:** 29/09/2017

**4.- Tipo de actividad:** Conferencia-debate

**Título:** ¿Y ahora qué...? Conferencia dirigida a alumnos de 3º y 4º del Grado en Química

**Lugar de celebración:** Universidad de Jaén

**Fecha:** 14/03/2016

ANEXO 2:  
ESTANCIAS EN CENTROS DE  
INVESTIGACIÓN I+D

---



## **Anexo 2: Estancias breves en centros de investigación I+D**

### **Estancia internacional**

**Centro de realización:** Institute of Chemical Technologies and Analytics Environmental and Process Analytical Chemistry (Technische Universität Wien), Viena, Austria, dirigido por el profesor (Full Professor) Bernhard Lendl

**Fecha:** del 01-marzo-2018 al 31-mayo-2018

**Duración:** 3 meses

**Objetivo:** Profundizar en el estudio de generación de imágenes hiperespectrales mediante la tecnología *stand-off* Raman, aprovechando la avanzada instrumentación disponible en la TU Wien y la experiencia previa de uno de los grupos de investigación pioneros y más reputados en este campo. Además, se estudia el desarrollo de un sistema de imágenes combinando el potencial de cuatro técnicas espectroscópicas diferentes y su posterior análisis espectral

