

# EXAMINATION OF LUMINESCENCE OF CROSS SECTIONS (FLUORESCENCE MICROSCOPY)

## EXAMEN DE LA LUMINISCENCIA DE SECCIONES TRANSVERSALES (MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA)

Barbara H. Berrie<sup>a</sup>, Mathieu Thoury<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*National Gallery of Art, USA.*

<sup>b</sup>*Institut Photonique d'Analyse Non-Destructive Européen des Matériaux Anciens (IPANEMA),  
CNRS, Ministère de la Culture, UVSQ, USR3461, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.*

*b-berrie@nga.gov*

### Introduction

Since the mid-twentieth century, analysis of paint layering and materials in artworks has been accomplished routinely using small samples examined in cross section (Plesters, 1956). This approach has been applied to paintings and to samples from stone, paper and other works. Most often, a sample is embedded in a block of plastic resin that is cut and polished perpendicular to its surface, revealing the stratigraphy and allowing analysis using a variety of microscopic techniques. Optical microscopy (OM) remains the analytical technique most frequently used in the museum setting to study cross-section samples; bright field and dark field reflected light are used to observe the number of layers, the color, shape, size and distribution of particles, and in many instances to identify the pigments or minerals in samples. Photoluminescence (PL) microscopy, often called fluorescence microscopy, is an important method that improves the visualization of contrast

### Introducción

Desde mediados del siglo XX, el análisis de los estratos pictóricos y de los materiales en obras de arte se ha logrado de forma rutinaria utilizando pequeñas muestras examinadas en sección transversal (Plesters, 1956). Este modo se ha aplicado a pinturas y muestras de piedra, papel y otras obras. A menudo, una muestra se engloba en un bloque de resina plástica que se corta y se pule perpendicular a su superficie, revelando la estratigrafía y permitiendo el análisis utilizando una variedad de técnicas microscópicas. La microscopía óptica (OM, de sus siglas en inglés) sigue siendo la técnica analítica más utilizada en el entorno del museo para estudiar muestras de corte transversal; el campo brillante y la luz reflejada del campo oscuro se utilizan para observar la cantidad de capas, el color, la forma, el tamaño y la distribución de partículas y, en muchos casos, para identificar los pigmentos o minerales en las muestras. La microscopía de fotoluminiscencia, a menudo llamada microscopía de fluorescencia, es un método importante

between materials that may be nonexistent using white light illumination to allow discrimination among phases and improve their characterization. Since the early 1940's, developments of photoluminescence micro-imaging approaches, sometimes driven by other fields of application, have brought new capabilities to the method, such as gathering information on materials' chemistry or revealing weak physico-chemical variation of pure compounds at the microscale. This chapter gives a brief overview of the development of methodologies and techniques for photoluminescence microscopy (PL) and their general application to the classical study of cross sections from cultural heritage objects using luminescence microscopy, including recently developed imaging and staining methods.

## Micro-Sample Preparation

**Preparation of cross sections.** Photoluminescence microscopy is a standard method that has been applied to the study of cross-sections for many decades to investigate the layer structure of paint and coatings on cultural heritage objects. Samples obtained from art and artefacts, rarely larger than a few 1000s  $\mu\text{m}^3$  and most often smaller, are obtained using a scalpel or needle. For ease of examination they are embedded in a fluid resin that hardens on curing (Derrick et al., 1994; Khandekar, 2002). This is followed by grinding or cutting part of mounting resin in order to expose the surface of the sample in a direction that shows the stratigraphy of applied layers, after which the sample is polished. The choice of embedding medium is usually based on mechanical properties, such as its hardness, or the curing processes (exothermic or time required) but generally not on the luminescence properties of the resin. Methods not readily available, such as microtomy and Focused Ion Beam (FIB) milling, can improve the results obtained through optimal preparation of samples.

que mejora la visualización del contraste entre materiales que pueden no existir utilizando iluminación de luz blanca para permitir la discriminación entre fases y mejorar su caracterización. Desde principios de la década de 1940, los avances en el enfoque de la micro-imagen de fotoluminiscencia, a veces impulsado por otros campos de aplicación, han aportado nuevas capacidades al método tales como recopilar información sobre la química de los materiales o revelar la variación de luminiscencia de compuestos puros a micro-escala. Este capítulo ofrece una breve descripción del desarrollo de metodologías y técnicas para la microscopía de fotoluminiscencia (PL) y su aplicación general al estudio clásico de secciones transversales de objetos del patrimonio cultural utilizando microscopía de luminiscencia, incluidos los métodos de imagen y tinción recientemente desarrollados.

## Preparación de micro-muestras

**Preparación de secciones transversales.** La microscopía de fotoluminiscencia es un método estándar que se ha aplicado al estudio de secciones transversales durante muchas décadas para investigar la estructura de las capas pictóricas y recubrimientos en objetos del patrimonio cultural. Las muestras obtenidas de obras de arte y objetos raramente más grandes de 1000  $\mu\text{m}^3$  y a menudo más pequeñas, se obtienen usando un bisturí o una aguja. Para facilitar el examen, se engloban en una resina fluida que endurece al curar (Derrick et al., 1994; Khandekar, 2002). A continuación, se tritura o corta parte de la resina de montaje para exponer la superficie de la muestra en una dirección que muestre la estratigrafía de las capas aplicadas, tras lo cual se pule la muestra. La elección del medio de inclusión generalmente se basa en propiedades mecánicas, como su dureza o los procesos de curado (exotérmicos o de tiempo requerido), pero generalmente no en las propiedades de luminiscencia de la resina. Algunos métodos que no están fácilmente disponibles, como la microtomía y la molienda con haz de iones enfocado (FIB), pueden mejorar los resultados

**Mounting/embedding material.** The choice of medium used to mount the paint cross section has consequences for the measurement of luminescence since it may exhibit inherent luminescence that can interfere with measurement of that emitted from the sample. The fluidity of the embedding medium prior to curing means that it can infiltrate into samples, especially porous ones, thereby contributing to emission from the sample (Derrick et al., 1994). Thermoplastic resins, such as Bio-Plastic™ or Technovit®, which are used often, can leave a thin smear of resin over the surface following grinding and polishing. Depending on the thickness of this layer, the mounting medium can contribute to the luminescence signal. Such a layer can also inhibit reaction with stains and antibodies by being impermeable to the reaction solutions. Wet polishing, keeping the sample cold, or using microtomy can be helpful to reduce or eliminate surface smearing and improve results. Some mounting media develop luminescence on aging, which may be related to the extent of curing at an early stage or subsequent photochemical changes or both. This may add to the luminescence signal in cross sections that have been stored for a long period of time. Since some media are sensitive to radiation damage and develop luminescence on exposure to electron beams or X-rays, it may be important to consider the order in which experiments are undertaken (Bertrand et al., 2015).

**UV-vis illumination (mercury lamps, xenon lamps, lasers, synchrotron radiation, etc).** High-pressure mercury arc (HBO) lamps and xenon arc (XBO) lamps are frequently used on microscopes. Mercury lamps have high light intensity at sharp emission lines at 365 nm (UV), 405 nm (UV-violet), 436 nm (blue), 546 nm (green), and a pair at 577 nm and 579 nm (yellow-orange). For a good signal to noise ratio, the luminophore of interest should absorb near one of these emission lines. Several

obtenidos a través de la preparación óptima de las muestras.

**Material de montaje / englobado.** La elección del medio utilizado para montar la sección transversal de pintura tiene consecuencias en la medición de la luminiscencia, ya que puede exhibir una luminiscencia inherente que puede interferir con la medición de la emisión de la muestra. La fluidez del medio de inclusión antes del curado significa que puede infiltrarse en muestras, especialmente porosas, contribuyendo así a la emisión de la muestra (Derrick et al., 1994). Las resinas termoplásticas, como Bio-Plastic™ o Technovit®, que se usan con frecuencia, pueden dejar una fina capa de resina sobre la superficie después del esmerilado y pulido. Dependiendo del grosor de esta capa, el medio de montaje puede contribuir a la señal de luminiscencia. Dicha capa también puede inhibir la reacción con manchas y anticuerpos al ser impermeable a las soluciones de reacción. Pulir en húmedo, mantener fría la muestra o usar microtomos puede ser útil para reducir o eliminar las manchas en la superficie y mejorar los resultados. Algunos medios de montaje desarrollan luminiscencia al envejecer, lo que puede estar relacionado con el grado de curado en una etapa temprana o cambios fotoquímicos posteriores o ambos. Esto puede incrementar la señal de luminiscencia en secciones transversales que se han almacenado durante un largo período de tiempo. Dado que algunos medios son sensibles al daño por radiación y desarrollan luminiscencia al exponerse a haces de electrones o rayos X, puede ser importante considerar el orden en que se realizan los experimentos (Bertrand et al., 2015).

**Iluminación UV (lámparas de mercurio, lámparas de xenón, láseres, radiación sincrotrón, etc.).** Las lámparas de arco de mercurio de alta presión (HBO) y las lámparas de arco de xenón (XBO) se usan con frecuencia en los microscopios. Las lámparas de mercurio tienen alta intensidad de luz en líneas de emisión nítidas a 365 nm (UV), 405 nm (UV-violeta), 436 nm (azul), 546 nm (verde) y un par a 577 nm y 579 nm (amarillo-naranja). Para una

stains and dyes meet this criterion making them useful for characterization of materials in paint cross sections (see Table 1). High pressure xenon lamps have a broad emission from the near-UV to the near-IR, providing flexibility in the choice of fluorophores for staining. As the technology to produce light emitting diodes (LEDs) of more colors develops, LED light engines are becoming more widely used but they remain less common in cultural heritage applications, though there has been a study of their use for macroscopic fluorescence imaging of paintings (*as it is shown elsewhere in this volume*). Lasers are employed for certain luminescence imaging techniques. The laser beam can be shaped to a small spot size and provides high power, allowing fast raster scanning over a sample. This and the fast switching that is possible for lasers (and LEDs)

buena relación señal / ruido, el fluoróforo de interés debería absorber cerca de una de estas líneas de emisión. Varias tinciones y colorantes cumplen con este criterio, lo que los hace útiles para la caracterización de materiales en secciones de pintura (véase Tabla 1). Las lámparas de xenón de alta presión tienen una amplia emisión desde el UV cercano al IR cercano, lo que proporciona flexibilidad en la elección de fluoróforos para la tinción. A medida que se desarrolla la tecnología para producir diodos emisores de luz (LED) de más colores, los motores de luz LED se utilizan cada vez más, pero siguen siendo menos comunes en las aplicaciones del patrimonio cultural, aunque se ha estudiado su uso para la obtención de imágenes de fluorescencia macroscópica de pinturas. (tal y como se muestra en este volumen). Los láseres se emplean en ciertas técnicas de imágenes de fluorescencia. El rayo láser se puede conformar a un tamaño

**Table 1** | Fluorescent Stains Used Frequently for Identification of Materials in Cross Sections from Cultural Heritage.

**Tabla 1** | Tinciones fluorescentes usadas comúnmente para la identificación de materiales en estratigrafías del patrimonio cultural.

Fluorescent stain / Tinción fluorescente	Class of analyte / Sustancia identificada	Excitation wavelength / Longitud de onda de excitación, nm	Emission wavelength / Longitud de onda de emisión, nm	Reference / Referencia
Rhodamine B	lipids	540	625	
Rhodamine 2	metal ions			
Fluorescamine (FLUR)	proteins	390	460	
Lissamine Rhodamine B sulfonyl chloride (LISSA)	proteins	575	595	
Dylight 488	proteins	493	518	Arslanoglu <i>et al.</i> 2011
BODIPY 493/503	lipids			
SPYRO Ruby	proteins	250-350	610	Sandu <i>et al.</i> 2011
SPYRO Orange	proteins			
FITC	proteins	490	525	
TRITC	organic	540	570	Sandu <i>et al.</i> 2011
Nile red	lipids	515-530	525-605	
Dansyl chloride β-cyclodextrin	proteins	310-350	515	Messinger <i>et al.</i> 1992

allows advanced imaging methods to be employed, including confocal microscopy, luminescence lifetime imaging spectroscopy and the development of other techniques of examining cross sections including 2-photon fluorescence spectroscopy and pump-probe microscopy (Saminemi et al., 2014). Synchrotron radiation can be exploited as a continuously tunable source from the deep UV to the visible that can be used in the characterization of specific amino acids, such as tyrosine or tryptophan or to perform excitation imaging (Thoury et al., 2011).

### Microscope Configurations

The preferred configuration for luminescence microscopes is epi-illumination (also called *incident light illumination* or *reflectance microscopy*) where the microscope objective, in addition to being the magnifying lens used to image the sample, acts as the condenser that illuminates the specimen. The main advantage of epi-illumination (i.e., reflected) over diasopic (i.e., transmitted) mode for performing luminescence measurements lies in the fact that only a small percentage of the exciting light is reflected off the sample and which can be easily blocked in the detection light path.

Optical filters are used to select specific excitation and emission wavelength ranges. These are chosen to match the sample, a stain—if used, and the light source. Since most microscopes used for cross-section analysis are composed of up to 20 different single convex and concave lenses with different radii of curvature within their objectives and lens tube, transmission in the UVB and UVC is hampered. As a result, UVB and UVC radiation are not often used for PL observation in cultural heritage applications. However, UVA (365- 400 nm), violet, blue, and green light stimulate emission from paint cross-section samples. Standard upright microscopes are equipped with filter blocks or cubes for fluorescence microscopy, diagrammed

de punto pequeño y proporciona alta potencia, lo que permite un escaneo rápido de trama sobre una muestra. Esto y el cambio rápido que es posible para los láseres (y LED) permite emplear métodos de imagen avanzados, incluida la microscopía confocal, la espectroscopía de imagen de fluorescencia y el desarrollo de otras técnicas para examinar secciones transversales, incluida la espectroscopía de fluorescencia de 2 fotones y la microscopía de bomba-sonda (Saminemi et al., 2014). La radiación sincrotrón puede explotarse como un sintonizador continuo proveniente de los rayos UV profundos a lo visible que puede usarse en la caracterización de aminoácidos específicos, como tirosina o triptófano o para realizar imágenes de excitación (Thoury et al., 2011).

### Configuraciones del microscopio

La configuración preferida para los microscopios de fluorescencia es la epi-iluminación (también llamada iluminación de luz incidente o microscopía de reflectancia) donde el objetivo del microscopio, además de ser la lente de aumento utilizada para obtener imágenes de la muestra, actúa como el condensador que ilumina la muestra. La principal ventaja de la epi-iluminación (es decir, reflejada) sobre el modo diascópico (es decir, transmitido) para realizar mediciones de luminiscencia radica en el hecho de que solo un pequeño porcentaje de la luz excitante se refleja en la muestra y debe bloquearse en la detección del camino de luz.

Los filtros se utilizan para seleccionar rangos de longitud de onda de excitación y emisión específicos. Estos se eligen para que coincidan con la muestra, una tinción (si se usa) y la fuente de luz. Dado que la mayoría de los microscopios utilizados para el análisis de la sección transversal se componen de hasta 20 lentes convexas y cóncavas individuales diferentes con diferentes radios de curvatura dentro de sus objetivos y tubo de lente, la transmisión en UVB y UVC resulta obstaculizada. Como resultado, la radiación UVB y UVC no se usa a menudo para la observación de PL en aplicaciones de patrimonio cultural. Sin embargo, los rayos UVA (365-400 nm), violeta, azul y verde

in Fig. 1. These consist of an excitation filter, a dichroic mirror used as a beamsplitter, and a long pass emission filter. The emission filter is usually an interference filter, designed to transmit a specific wavelength range. A dichroic filter reflects excitation radiation through the objective to the sample and allows longer wavelength emission to pass up through to the detector. Many standard filter cubes are available, each designed to match specific light sources and fluorophore combinations. Narrow band pass filters that have sharp cut-on and cut-off transmission edges are chosen if the Stoke's shift of the fluorophore is small. Typically, filter blocks that align with intense emission lines of mercury at 365 nm (UV), 405 nm (UV-violet), 436 nm (blue), 546 nm (green) are used. Custom filter blocks can be assembled to improve signal to noise ratios in application of specific fluorophores. When using a LED source, the components of the filter block should be considered carefully in order to maintain good signal to noise and a low, even background.

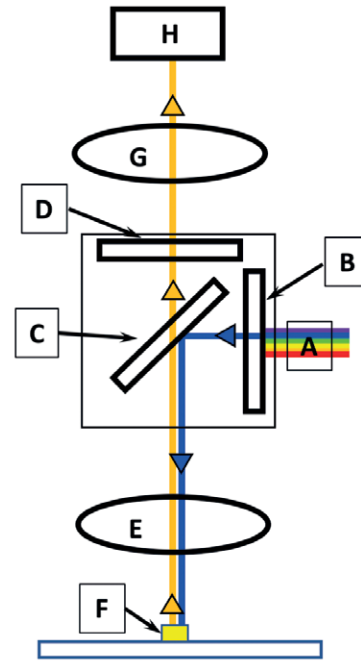
**Wide-field imaging.** In most applications in cultural heritage, wide-field imaging is used. In this set up the whole area that is imaged on the detector is illuminated by the excitation radiation. To obtain adequate signal to noise ratios, microscopes are configured in Köhler illumination to reduce scatter and glare. High magnification objectives having large numerical aperture provide better spatial resolution images at the cost of more limited field of view. The resolution limit of optical imaging is given by the diffraction phenomenon at the aperture of a lens system, which is itself driven by the fact that a lens represents an aperture of finite size that limits the angle to a value  $\alpha$  incoming to the system and by the wavelength  $\lambda$  of the incoming photons. The consequence of this phenomenon is that the image of a luminous infinitely small point object corresponds to an intensity distribution,

estimulan la emisión de muestras de secciones de pintura. Los microscopios verticales estándar están equipados con bloques de filtro o cubos para microscopía de fluorescencia, diagramados en la Figura 1. Estos consisten en un filtro de excitación, un espejo dicroico utilizado como divisor de haz y un filtro de emisión de paso largo. El filtro de emisión suele ser un filtro de interferencia, diseñado para transmitir un rango de longitud de onda específico. Un filtro dicroico refleja la radiación de excitación a través del objetivo a la muestra y permite que la emisión de longitud de onda más larga pase al detector. Están disponibles muchos cubos de filtro estándar, cada uno diseñado para combinar fuentes de luz específicas y combinaciones de fluoróforos. Los filtros de paso de banda estrechos que tienen bordes de transmisión de corte y corte agudos se eligen si el desplazamiento del fluoróforo de Stoke es pequeño. Habitualmente, se usan bloques de filtro que se alinean con líneas de emisión intensas de mercurio a 365 nm (UV), 405 nm (UV-violeta), 436 nm (azul), 546 nm (verde). Se pueden ensamblar bloques de filtro personalizados para mejorar la relación señal / ruido en la aplicación de fluoróforos específicos. Cuando se usa una fuente LED, los componentes del bloque de filtro deben considerarse cuidadosamente para mantener una buena señal de ruido y un fondo bajo y uniforme.

**Imágenes de campo amplio.** En la mayoría de las aplicaciones en el patrimonio cultural, se utilizan imágenes de campo amplio. En esta configuración, toda el área que se muestra en el detector está iluminada por la radiación de excitación. Para obtener una buena relación señal/ruido, los microscopios se configuran en iluminación Köhler para reducir la dispersión y el deslumbramiento. Los objetivos de gran aumento proporcionan mejores imágenes de resolución espacial a costa de un campo de visión más limitado. El límite de resolución de las imágenes ópticas viene dado por el fenómeno de difracción en la apertura de un sistema de lentes, que en sí mismo es impulsado por el hecho de que una lente representa una apertura del tamaño finito que limita el ángulo a un valor  $\alpha$  entrante al sistema y por la longitud de onda  $\lambda$  de los fotones entrantes. La

**Figure 1** | Block diagram of the standard set up for photoluminescence microscopy. A: light source; B: excitation (exciter) filter; C: dichroic mirror (dichromatic filter/ beamsplitter); D: emission filter (barrier or long-pass filter); E: objective and condenser lens; F: cross section; G: collection objective; H detector.

**Figura 1** | Diagrama de bloques de la configuración estándar para microscopía de fluorescencia. A: fuente de luz; B: filtro de excitación (excitador); C: espejo dicróico (filtro dicromático / divisor de haz); D: filtro de emisión (barrera o filtro de paso largo); E: objetivo y lente condensadora; F: sección transversal; G: objetivo de recogida; H: Detector.



which is known as the *Airy pattern*. Thus, in the image plane the limit of resolution of a microscope corresponds to the minimum distance,  $r$ , that allows differentiation of an intensity difference of 2 Airy patterns, which in the object plane is equal to:

$$r \approx 0.61 \lambda \div n \sin \alpha$$

In the wide-field configuration, the emitted light that is collected comes not only from the area in focus, but also from illuminated parts of the sample that are out of focus, leading to loss of resolution, haze, and high background. Petty (2007) has discussed practical methods to increase signal to noise ratios, including optical set-up, sample preparation, room darkening and signal averaging.

**Confocal microscopy.** Confocal microscopy offers improved contrast and higher resolution

consecuencia de este fenómeno es que la imagen de un objeto puntual luminoso infinitamente pequeño corresponde a una distribución de intensidad, que se conoce como el *patrón Airy*. Por lo tanto, en el plano de la imagen, el límite de resolución de un microscopio corresponde a la distancia mínima,  $r$ , que permite la diferenciación de una diferencia de intensidad de 2 patrones Airy, que en el plano del objeto es igual a:

$$r \approx 0,61 \lambda \div n \sin \alpha$$

En la configuración de campo amplio, la luz emitida que se recoge no solo proviene del área enfocada, sino también de las partes iluminadas de la muestra que están desenfocadas, lo que conduce a la pérdida de resolución, turbidez y alto fondo. Petty (2007) ha estudiado métodos prácticos para aumentar el ratio de señal a ruido, incluida la configuración óptica, la preparación de la muestra, el oscurecimiento de la sala y el promedio de la señal.

compared to wide field microscopy. In this technique, the sample surface is raster-scanned by micro-focused laser light. In place of a collection lens, the microscope is equipped with pinholes positioned in the excitation and emission pathways to effectively reject light emitted from out-of-focus planes in the sample, allowing only the light from the focal plane to reach the detector. Rastering across the area with the laser and the detector combined with Z-stage control provides much improved specificity for locating fluorophores, helps mitigate artifacts due to incident light scattering, and decreases the effect of collection of the broad emission due to generalized photoexcitation of molecules in and out of focus in a composite material such as paint or even cement.

### Autoluminescence in Cross Sections

Many materials used by artists and artisans to make cultural heritage objects, including proteins, gums, dyes and lakes, semiconductor pigments, and some minerals and inorganic complexes, are inherently luminescent under a variety of excitation and emission spectral ranges. Additionally, luminescence develops in samples as components change on aging, and as degradation products develop, and all new species formed *in situ* can contribute to emission. Thus, layering, individual components, and changes due to degradation that are sometimes not readily observed under reflected light illumination can be visualized using fluorescence microscopy. Luminescence from samples can be observed using various filter cubes, since each one might reveal different behavior of species in the cross section thus allowing their discrimination (Fig. 2). For example, complex layering of different red lakes that are visually indistinct can readily be observed by their different emission colors under visible light excitation. Combination with other techniques,

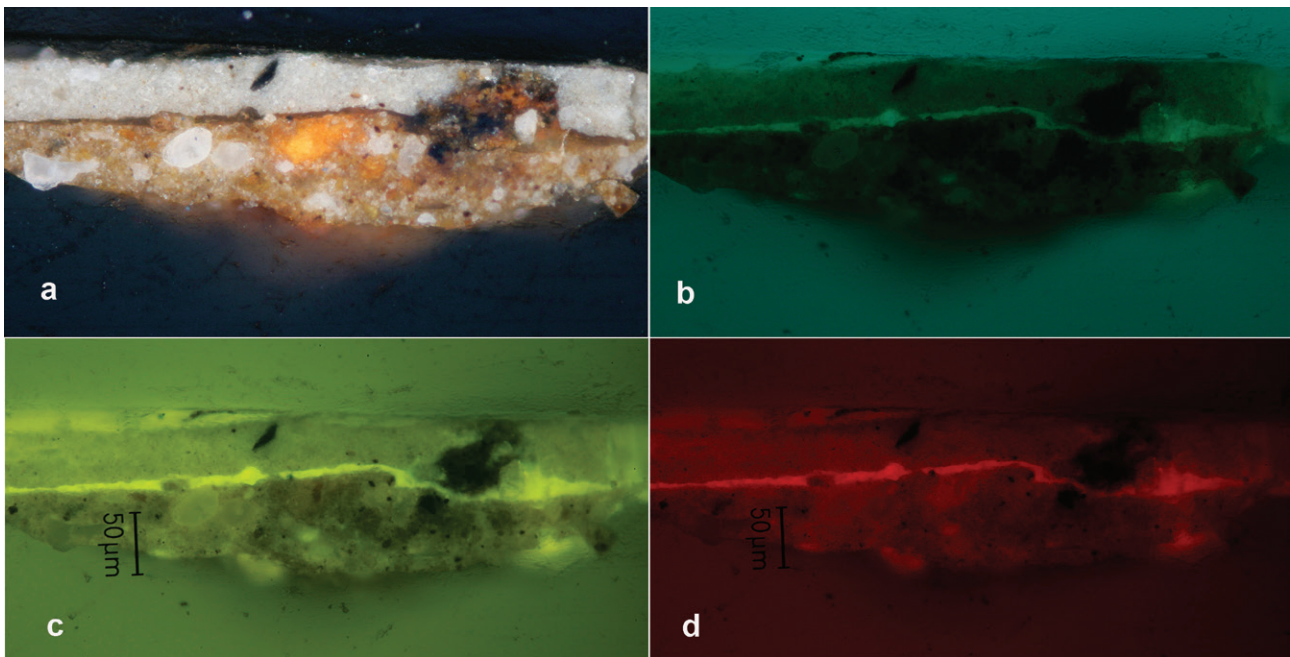
**Microscopía confocal.** La microscopía confocal ofrece un contraste mejorado y una resolución mayor en comparación con la microscopía de campo amplio. En esta técnica, la superficie de la muestra se escanea con trama mediante luz láser. En lugar de una lente colectora, el microscopio está equipado con orificios colocados en las vías de excitación y emisión para rechazar efectivamente la luz emitida desde los planos fuera de foco en la muestra, permitiendo que solo la luz del plano focal llegue al detector. El agrandamiento en el área con el láser y el detector combinados con el control de la etapa Z proporciona una mejor resolución para localizar fluoróforos, ayuda a mitigar los objetos debido a la dispersión de la luz incidente y disminuye el efecto de la recolección de la emisión amplia debido a la fotoexcitación generalizada de moléculas enfocadas y desenfocadas en un material compuesto como la pintura o incluso cemento.

### Autoluminiscencia en secciones transversales

Muchos materiales utilizados por artistas y artesanos para crear objetos culturales, incluidas proteínas, gomas, tintes y lacas, pigmentos semiconductores y algunos minerales y complejos inorgánicos, son inherentemente luminiscentes bajo una variedad de rangos espectrales de excitación y emisión. Además, la luminiscencia se desarrolla en las muestras a medida que los componentes cambian con el envejecimiento, y a medida que se desarrollan los productos de degradación, y las nuevas especies formadas *in situ* pueden contribuir a la emisión. Por lo tanto, las capas, los componentes individuales y los cambios debidos a la degradación que a veces no se observan fácilmente bajo iluminación de luz reflejada se pueden visualizar utilizando microscopía de fluorescencia. La luminiscencia de las muestras se puede observar utilizando varios cubos de filtro, ya que cada uno puede revelar un comportamiento diferente de las especies en la sección transversal, lo que permite su discriminación (Fig. 2). Por ejemplo, las capas complejas de diferentes lacas rojas se pueden visualizar fácilmente por sus

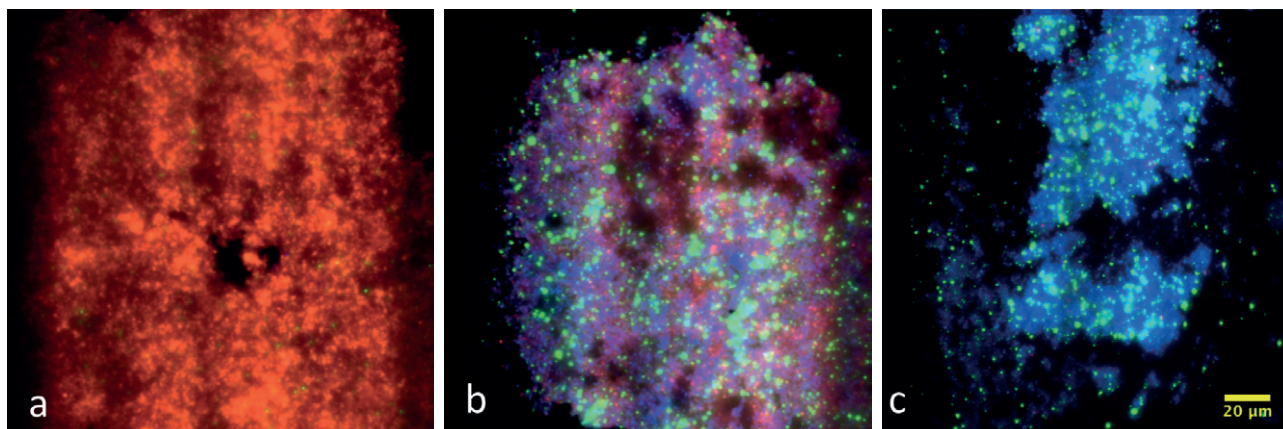
such as energy dispersive X-ray analysis, gives additional information that can provide additional evidence that the pigments are chemically different (Berrie and Matthew, 2005). Semiconductor pigments, (e.g., cadmium sulfoselenide or zinc oxide) emit strongly in the near infrared and visible ranges, on excitation in the visible or UV, and can be readily observed in cross sections (Fig. 3).

diferentes colores de emisión bajo excitación de luz visible y en combinación con otras técnicas, como el análisis de rayos X de dispersión de energía, que proporciona información adicional al hecho de que los pigmentos son moléculas diferentes (Berrie y Matthew, 2005). Los pigmentos semiconductores (por ejemplo, sulfoselenuro de cadmio u óxido de zinc, etc.) emiten fuertemente en los rangos del infrarrojo cercano y visible, en la excitación en el visible o UV, y pueden observarse fácilmente en secciones transversales (Fig.3).



**Figure 2 |** A paint cross section embedded in a polyester/methacrylate medium. Photographed using a 20× nPL objective under a variety of illumination conditions. A tungsten halogen lamp was used for the bright field imaging and an Hg lamp for obtaining fluorescence images. (a) Bright field with crossed polars. (b) Leica filter cube D: excitation band pass 355-425 nm; dichroic filter 455 nm, long pass filter 460 nm; Leica filter cube I2/3 excitation band pass 450-490 nm; dichroic filter 510 nm, long pass filter 4515 nm; Leica filter cube M: excitation band pass 546 (width 14) nm; dichroic filter 4580nm, long pass filter 580 nm. Note that varnish fluoresces under conditions in (b) and (c) and the opaque, bright white agglomerate in only (c).

**Figura 2 |** Sección transversal de pintura englobada en un medio de poliéster/metacrilato. Fotografado usando un objetivo 20 × nPL bajo una variedad de condiciones de iluminación. Se usó una lámpara halógena de tungsteno para las imágenes de campo brillante y una lámpara Hg para obtener imágenes de fluorescencia. (a) Campo brillante con polares cruzados. (b) cubo de filtro Leica D: paso de banda de excitación 355-425 nm; filtro dicróico 455 nm, filtro de paso largo 460 nm; Leica filtro cubo I2 / 3 pasa banda de excitación 450-490 nm; filtro dicróico 510 nm, filtro de paso largo 4515 nm; Leica filtro cubo M: paso de banda de excitación 546 (ancho 14) nm; filtro dicróico de 4580 nm, filtro de paso largo de 580 nm. Hay que tener en cuenta que el barniz es fluorescente en las condiciones de (b) y (c) y blanco opaco brillante aglomerado solo en (c).



**Figure 3 |** Full-field UV-PL images of ZnO dispersions on a common intensity scale. (a-c) Spatially-registered false-color RGB images constructed from the synchrotron full-field multispectral imaging of three different ZnO powders using a 40× objective.

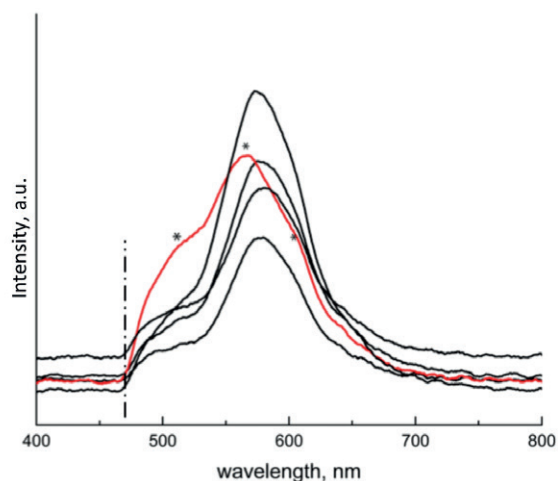
**Figura 3 |** Imágenes UV-PL de campo completo de dispersiones de ZnO en una escala de intensidad común. (a - c) Imágenes RGB de falso color registradas espacialmente construidas a partir de imágenes multispectrales de campo completo sincrotrón de tres polvos de ZnO diferentes utilizando un objetivo de 40 ×.

#### Microspectrofluorimetry and spectral imaging.

A set of detection strategies has been developed to collect emission spectra and use them to image cross sections. Standard set-ups allow recording luminescence images collected in the visible range using an RGB detector, often a CCD or CMOS chip, to provide information on luminescence hues (O'Donoghue et al., 2006). Quite early on in the development of fluorescence microscopy, microscopes were coupled to monochromators in both excitation and detection light paths in order to collect luminescence and excitation spectra with a spectral resolution of a few nanometers at the micrometer range on a spatial scale, and to give more quantitative information on the luminescence behavior of binders and dyes (Bottiroli et al., 1986). This technique has been used to collect spectra from lake pigments in cross sections (Claro et al., 2008) and dyes mordanted on wool fibers (Morales and Berrie, 2015).

#### Microespectrofluorimetría e imagen espectral.

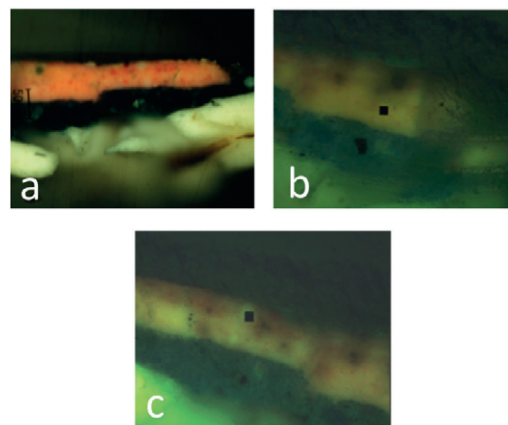
Se ha desarrollado un conjunto de estrategias de detección para recoger espectros de emisión y usarlos para obtener imágenes de secciones transversales. Las configuraciones estándar permiten grabar imágenes de luminescencia recopiladas en el rango visible utilizando un detector RGB, a menudo un chip CCD o CMOS, para proporcionar información sobre los tonos de luminescencia (O'Donoghue et al., 2006). En los primeros desarrollos de la microscopía de fluorescencia, los microscopios se acoplaron a los monocromadores en las rutas de luz de excitación y detección para recolectar espectros de luminescencia y excitación con una resolución espectral de unos pocos nanómetros en el rango de micrómetros a escala espacial, y para dar más información cuantitativa sobre el comportamiento de luminescencia de aglutinantes y colorantes (Bottiroli et al., 1986). Esta técnica se ha utilizado para recoger espectros de pigmentos tipo laca en secciones transversales (Claro et al., 2008) y tintes mordentados en fibras de lana (Morales y Berrie, 2015).



**Figure 4 |** Microfluorescence spectra obtained from a paint cross section using a Craic QDi 100 microspectrophotometer with a Cassegrain 36× objective and Leica filter cube with narrow band excitation at 433 nm and an emission (barrier) filter cut on c. 476 nm. Image (a) bright field with crossed polars on a Leica DMRX microscope with nPL 20× objective; (b) a representative image of the cross section using the Craic QDi 100, where the black square is the 4 μm x 4 μm site for collection of a spectrum, giving spectra in black; (c) as in (b) but giving the spectrum in red, indicating that a different red pigment is included in the paint mixture. The sample was obtained from Vincent van Gogh, *Self-Portrait*, 1889, National Gallery of Art, Washington, D.C.

Depending on the instrumentation, such approaches, also known as microspectrofluorimetry, allow collection of high resolution spectra of small areas of a cross section and enable mapping excitation and/or emission spectra of specific luminophores in a sample, thus providing more information on the chemistry and distribution of compounds such as organic dyes in samples (Melo and Claro, 2010). An example of the spectra that can be obtained using this sort of microspectrophotometer is shown in Fig. 4.

A multi-spectral full-field imaging approach using a synchrotron source coupled to microscopes



**Figure 4 |** Espectros de microfluorescencia obtenidos de una sección transversal de pintura usando un microespectrofotómetro Craic QDi 100 con un objetivo Cassegrain 36 × y un cubo de filtro Leica con excitación de banda estrecha a 433 nm y un filtro de emisión (barrera) cortado en c. 476 nm. Imagen (a) campo claro con polares cruzados en un microscopio Leica DMRX con objetivo nPL 20 ×; (b) una imagen representativa de la sección transversal usando el Craic QDi 100, donde el cuadrado negro es el sitio de 4 μm x 4 μm para la recolección de un espectro, dando espectros en negro; (c) como en (b) pero dando el espectro en rojo, indicando que se incluye un pigmento rojo diferente en la mezcla de pintura. La muestra se obtuvo de Vincent van Gogh, *Self-Portrait*, 1889, National Gallery of Art, Washington, D.C.

Dependiendo de la instrumentación, tales enfoques, también conocidos como microespectrofluorimetría, permiten la obtención de espectros de alta resolución de áreas pequeñas de una sección transversal y permiten el mapeo de espectros de excitación y / o emisión de luminóforos específicos de una muestra, proporcionando así más información sobre la química de compuestos en muestras como tintes orgánicos (Melo y Claro, 2010). La Figura 4 muestra un ejemplo de los espectros que se pueden obtener utilizando este tipo de microespectrofotómetro.

En este estudio se desarrolló un enfoque de imagen de campo completo multispectral utilizando una fuente

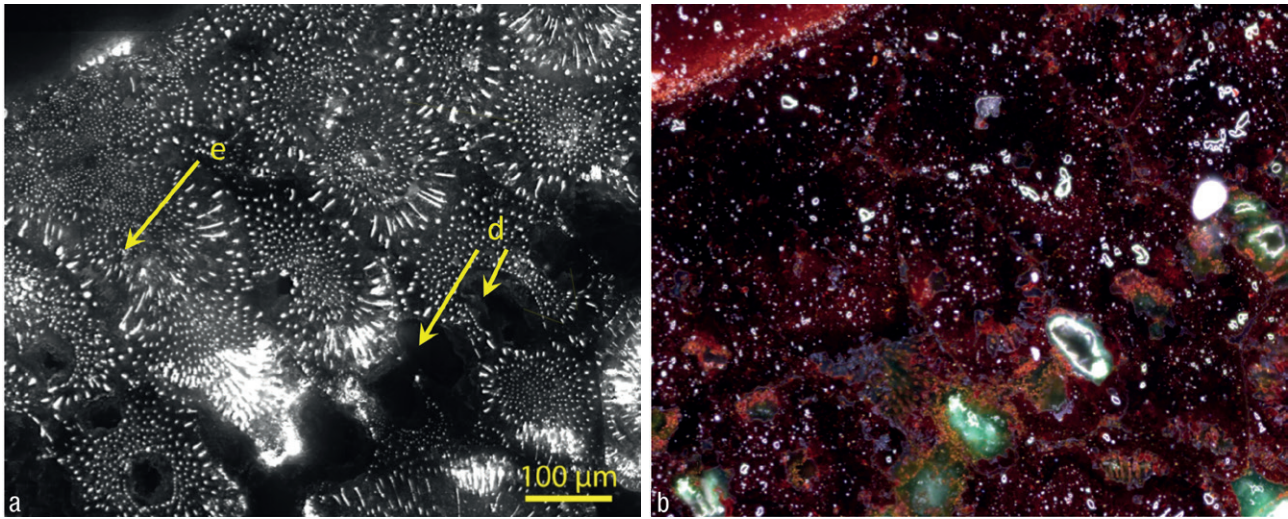
was developed to perform highly sensitive detection of low-level luminescence signals at the sub-micron scale. The concept for the development of this configuration is to improve the correlation between the spatial and spectral information obtained using PL microscopy by using high dynamic imaging (typically hundreds of nanometers (nm) spatial resolution over millimeter-sized fields of view) and decreasing the spectral resolution compared to that obtained using diffraction gratings by placing interference filters in front of the detector to collect emission in dozens of spectral ranges typically of the order of 10 nm wide. This configuration has allowed the detection of weak signals in specific emission ranges and was used to show the potential of measuring the heterogeneity of the intrinsic luminescence of *pure* zinc white pigments as a tool to identify the process used for synthesis of the pigment (Bertrand et al., 2011). Using the same approach, excitation in the visible range and detection of emission in the near infrared revealed the pattern of the distribution of otherwise invisible phases in an archaeological metal object (Fig. 5), that was key to ascertaining the process used in its manufacture (Thoury et al., 2016).

**Time-resolved luminescence imaging.** Luminophores are characterized not only by their excitation/emission spectra, but also by the lifetime of emission, which depends on the rate constants for radiative and non-radiative deactivations (Ishikawa-Ankerhold, Ankerhold and Drummen, 2012). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) takes advantage of this phenomenon to obtain data to distinguish between materials within a cross section that have similar emission spectra but different lifetimes. Although there is currently no consensus on the mathematical description to define the number of exponential functions used to model the decay of the luminescence signal in samples that contain autofluorescent materials, for systems that

de sincrotrón acoplada a microscopios para realizar una detección altamente sensible de señales de luminiscencia de bajo nivel a escala submicrométrica. La idea en la que se basa el desarrollo de esta configuración es mejorar la correlación entre la información espacial y espectral obtenida mediante microscopía PL, utilizando imágenes de alta dinámica (por lo general resolución lateral de cientos de nanómetros (nm) sobre campos de visión de tamaño milimétrico) y disminuyendo la resolución espectral en comparación con la obtenida con rejillas colocando filtros de interferencia delante del detector para recoger la emisión en docenas de rangos espectrales de solo unos pocos nm de ancho. Esta configuración ha permitido la detección de señales débiles en rangos de emisión específicos y se utilizó para mostrar el potencial de medir la heterogeneidad de la luminiscencia intrínseca de los pigmentos blancos de zinc puro como una herramienta para identificar el proceso utilizado para la síntesis del pigmento (Bertrand et al., 2011). Con el mismo enfoque, la excitación en el rango visible y la detección de emisiones en el infrarrojo cercano revelaron el patrón de distribución de fases invisibles en un objeto metálico arqueológico (Fig. 5), que fue clave para determinar el proceso utilizado en su fabricación (Thoury et al., 2016).

#### **Imágenes de luminiscencia con resolución temporal.**

Los fluoróforos se caracterizan no solo por sus espectros de excitación/emisión sino también por la vida útil de la emisión, que depende de las constantes de velocidad para las desactivaciones radiativas y no radiativas (Ishikawa-Ankerhold, Ankerhold y Drummen, 2012). La microscopía de imágenes de por vida de fluorescencia (FLIM, de sus siglas en inglés) aprovecha este fenómeno para obtener datos con los que distinguir entre materiales dentro de una sección transversal que tienen espectros de emisión similares pero diferente vida útil. Aunque actualmente no hay consenso sobre la descripción matemática para definir el número de funciones exponenciales utilizadas para modelar la desintegración de la señal de luminiscencia en muestras que contienen materiales autofluorescentes, en el caso de sistemas que tienen relativamente pocos fluoróforos no



**Figure 5** | Fossilized eutectic microstructure revealed in a 6000-year-old amulet from Mehrgarh. The regular rod-like pattern is observed over millimetres in interdendritic spaces. (a) Photoluminescence image of the amulet (420–480 nm excitation and 850–1020 nm bandpass emission 100× objective, N.A. = 1.25; projected pixel size: 153 nm) e: rod-like eutectic phase in the interdendritic space, d: dendrite. (b) Dark field image of the same area as in (a). Adapted from Thoury et al., 2016.

**Figura 5** | Microestructura eutéctica fosilizada revelada en un amuleto de Mehrgarh de 6000 años de antigüedad. El patrón regular en forma de barra se observa en milímetros en espacios interdendríticos. (a) Imagen de fotoluminiscencia del amuleto (excitación de 420–480 nm y emisión de paso de banda de 850–1020 nm 100× objetivo, NA = 1,25; tamaño de píxel proyectado: 153 nm) e: fase eutéctica en forma de varilla en el espacio interdendrítico, d: dendrita. (b) Imagen de campo oscuro de la misma área que en (a). Adaptado de Thoury et al., 2016.

have relatively few, non-interacting fluorophores, *apparent* lifetimes can be measured, and based on this measurement their distribution can be mapped throughout a cross section. Of the various techniques for time-resolved PL microscopy that have been developed, FLIM has been applied to cross sections. Using nanosecond time gating (a method of acquiring data at specific time intervals to isolate spectra of interest) between collecting spectra, the distribution of fluorophores with similar emission spectra but different lifetimes was imaged throughout paint layers (Fig. 6) (Comelli et al., 2017).

### Enhanced Luminescence Strategies

Fluorescent stains and probes are employed to visualize layers in a cross section and provide

interactivos se pueden medir vidas útiles aparentes, y en base a esta medición, su distribución se puede mapear a lo largo de una sección transversal. De las diversas técnicas para microscopía PL con resolución temporal que se han desarrollado, FLIM se ha aplicado a secciones transversales. Utilizando la sincronización de tiempo en nanosegundos (un método de adquisición de datos a intervalos de tiempo específicos para aislar espectros de interés) entre los espectros obtenidos, se obtuvo una imagen de la distribución de fluoróforos con espectros de emisión similares, pero se tomaron imágenes de diferentes momentos en todas las capas pictóricas (Fig. 6) (Comelli et al., 2017).

### Estrategias de luminiscencia mejoradas

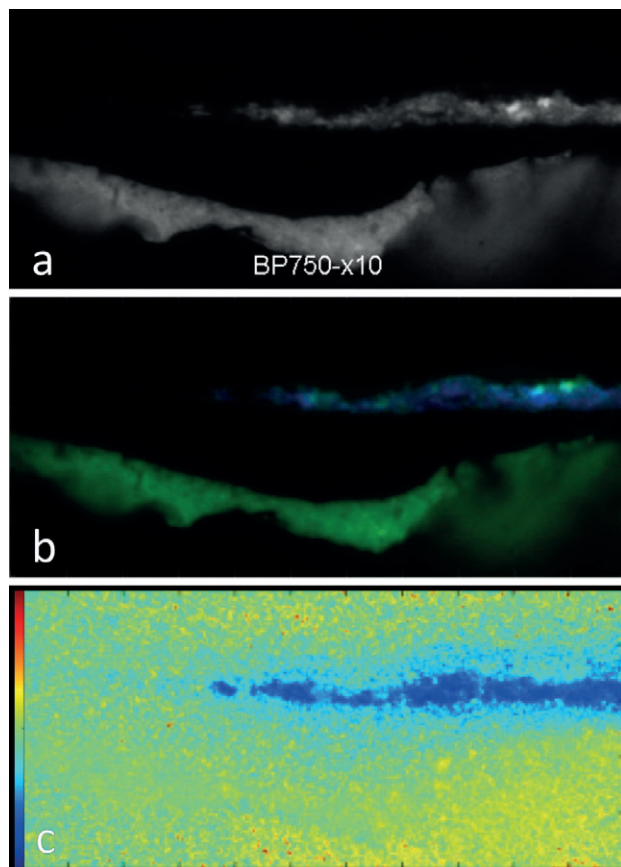
Las tinciones fluorescentes y las sondas se utilizan para visualizar las capas en una sección transversal y

information on the chemical classes of components of the paint, for example identifying lipidic or proteinaceous binders. Fluorescent stains and tags on antibodies increase the sensitivity of detection because of their very high quantum yield at specific excitation wavelengths. Fluorescent stains can be either *direct*, reacting with materials in the cross section, or conjugated to an intermediate probe, such as an antibody, that reacts with the analytes, examples of which are described below.

Both direct staining and antibody reaction protocols can be difficult to implement on paint cross sections. Controls and appropriate samples for

proporcionar información sobre las clases químicas de los componentes de la pintura, por ejemplo, identificando aglutinantes lipídicos o proteicos. En comparación con las sondas no fluorescentes, las tinciones fluorescentes y las etiquetas en los anticuerpos aumentan la sensibilidad de detección debido a su emisión brillante. Las tinciones fluorescentes pueden ser directas, reaccionar con materiales en la sección transversal o conjugarse con una sonda intermedia, como un anticuerpo, que reacciona con los analitos. A continuación se describen algunos ejemplos.

Tanto la tinción directa como los protocolos de reacción de anticuerpos pueden ser difíciles de implementar



**Figure 6 |** Luminescent phases in a cross section distinguished using fluorescence lifetime measurements. (a) Distribution of emission at 730 – 770 nm (excitation 365 nm using a band pass emission filter centered at 750 nm) detected at 0.1  $\mu$ s following the excitation pulse. (b) Phases selected on the basis of intensity thresholding of the PL image in (a) are associated with layers 1 and 3 in the cross section sample. (c) A false colour map combining intensity (brightness) and luminescence lifetime information (hues) reveals the large difference in the lifetime properties of layers 1 and 3 indicating the two paint layers have different chemical compositions. The colour scale shown is from 2  $\mu$ s (blue) to 4  $\mu$ s (red). Adapted from Comelli et al. 2017. Sample obtained from Henri Matisse, *Still Life with Eggplant*, 1911, Musée des Beaux-Arts, Grenoble, France.

**Figura 6 |** Fases luminiscentes en una sección transversal distinguida utilizando mediciones de vida útil de fluorescencia. (a) Distribución de emisión a 730 - 770 nm (excitación 365 nm utilizando un filtro de emisión de paso de banda centrado a 750 nm) detectado a 0,1  $\mu$ s después del pulso de excitación. (b) Las fases seleccionadas en base al umbral de intensidad de la imagen PL en (a) están asociadas con las capas 1 y 3 en la muestra de sección transversal. (c) Un mapa de colores falsos que combina la intensidad (brillo) y la información de vida útil de la luminiscencia (matices) revela la gran diferencia en las propiedades de vida útil de las capas 1 y 3, lo que indica que las dos capas de pintura tienen diferentes composiciones químicas. La escala de colores que se muestra es de 2  $\mu$ s (azul) a 4  $\mu$ s (rojo). Adaptado de Comelli et al. 2017. Una muestra obtenida de Henri Matisse, *Bodegón con berenjenas*, 1911, Musée des Beaux-Arts, Grenoble, Francia.

comparative positives and negatives are not easy to create. Test panels can be helpful, but their adequacy at mimicking ancient samples is not fully known, and it may be impossible to generalize expected responses from their use. In some cases, a low ratio of binder to pigment in a film makes it difficult to obtain a positive response. This has been observed in tests for reactions of animal skin glue in a traditional gesso. Certain mounting materials may not *wet* a sample well or shrink on curing, leaving small gaps around a sample. Thus, solutions of stains can seep in around the edges of the sample, creating the appearance of a reactive layer. Also, light may be scattered at the interface to suggest incorrectly that a fluorescent species is present. For direct staining to give reliable results, samples need to be carefully prepared and protocols followed carefully. Non-specific binding and absorption can be an issue for all staining applications, both direct and indirect methods. The difficulty of interference from infiltration of the mounting resin may cause low signals or false negatives and has been described (Derrick et al., 1994). Nevertheless, staining techniques have been usefully applied, especially to non-porous samples. Table 1 lists the fluorescent stains that have been most commonly used in conservation.

**Direct staining.** Direct staining using fluorophores has been applied for the identification of organic materials in cross sections since the 1980s (Wolbers and Landry, 1987; Messinger, 1992). Stains that have a high absorption near a mercury emission line are useful due to the high intensity from mercury lamps and, as noted above, filter sets have been designed specifically around them. Sandu et al. (2012) published a comprehensive review of stains used to identify organic binders in paint and identified many of the challenges involved in the accurate interpretation of results from staining.

en secciones transversales de pintura. Los controles y las muestras apropiadas para los positivos y negativos comparativos no son fáciles de crear. Los paneles de prueba pueden ser útiles, pero su idoneidad para imitar muestras antiguas no se conoce completamente, y puede ser imposible generalizar las respuestas esperadas de su uso. En algunos casos, una baja proporción de aglutinante respecto al pigmento en una película dificulta la obtención de una respuesta positiva. Esto se ha observado en pruebas de reacciones sobre cola de piel de animales en imprimaciones de gesso tradicionales. Ciertos materiales de englobado pueden no humedecer bien una muestra o contraer al curar, dejando pequeños espacios alrededor de la muestra. Por tanto, las soluciones de las tinciones pueden filtrarse alrededor de los bordes de la muestra, creando la apariencia de una capa reactiva. Además, la luz puede estar dispersa en la interfaz sugiriendo incorrectamente la presencia una especie fluorescente. Para que la tinción directa dé resultados fiables, las muestras deben prepararse cuidadosamente y los protocolos deben seguirse cuidadosamente. La unión y absorción no específicas pueden ser un problema para todas las aplicaciones de tinción, tanto métodos directos como indirectos. Ya se ha mencionado que la dificultad de la interferencia de la infiltración de la resina de montaje puede causar señales bajas o falsos negativos (Derrick et al., 1994). Sin embargo, las técnicas de tinción se han aplicado de manera útil, especialmente en muestras no porosas. La Tabla 1 enumera las tinciones fluorescentes más comúnmente usadas en conservación.

**Tinción directa.** La tinción directa con fluoróforos se ha aplicado para la identificación de materiales orgánicos en secciones transversales desde la década de 1980 (Wolbers y Landry, 1987; Messinger, 1992). Las tinciones con alta absorción cerca de una línea de emisión de mercurio son útiles debido a la alta intensidad de las lámparas de mercurio y, como se señaló anteriormente, los conjuntos de filtros se han diseñado específicamente en torno a ellos. Sandu y col. (2012)

### Immunofluorescence microscopy (IFM).

Intense inherent fluorescence or autofluorescence from some samples obscures observation of a positive reaction of a direct stain, and thus qualitative estimation of emission cannot be used for certain identification of materials in all cases. Immunofluorescence Microscopy (IFM) methods have been developed to improve the ability to locate and identify organic materials in cross sections (Cartechini et al., 2010). The technique relies on the reaction between the antigen (the analyte) and an antibody. The antibody can be conjugated to fluorescent molecules or highly fluorescent quantum dots which serve as probes to observe the antigen-antibody reaction. The method can be challenging to interpret when applied to the paint samples. Several conditions account for this. For example, the concentration of proteinaceous binder may be too low for reactions to be visualized; the antibody-specific reactive site on a protein may have been denatured either during paint making, as a result of a reaction with pigments, or due to chemical degradation over time. Non-specific binding reactions can occur, and rinsing may not be adequate to remove unreacted adsorbed antibodies (Magrini, Bracci and Sandu, 2013). Adequate rinsing may have the negative, unintended effect of washing out water-sensitive binders, for example rabbit-skin glue. IFM is difficult to apply to real samples since the factors that affect nonspecific binding and spurious emission/scatter, noted above, are numerous. Multiple thin sections prepared from cross sections have been used as ideal comparison for control and blank reactions to assess the extent of nonspecific reactions and estimate background signal (Vagnini et al., 2008). Despite some limitations in application, IFM has proven helpful to visualize localization of layers of interest, as shown in Fig. 7. Specificity has been achieved, for example the characterization of a protein as collagen (glue),

publicaron una revisión exhaustiva de las tinciones utilizadas para identificar aglutinantes orgánicos en la pintura e identificaron muchos de los desafíos implicados en la interpretación precisa de los resultados de la tinción.

**Microscopía de inmunofluorescencia (IFM, de sus siglas en inglés).** La fluorescencia inherente intensa o la autofluorescencia de algunas muestras oculta la observación de una reacción positiva de una tinción directa y, por lo tanto, la estimación cualitativa de la emisión no puede usarse en la identificación certera de materiales en todos los casos. Se han desarrollado métodos de microscopía de inmunofluorescencia (IFM) para mejorar la capacidad de localizar e identificar materiales orgánicos en secciones transversales (Cartechini et al., 2010). La técnica se basa en la reacción entre el antígeno (el analito) y un anticuerpo. El anticuerpo puede conjugarse con moléculas fluorescentes o puntos cuánticos altamente fluorescentes que sirven como sondas para observar la reacción antígeno-anticuerpo. El método puede ser difícil de interpretar cuando se aplica a las muestras de pintura. Ello se debe a varias cuestiones. Por ejemplo, la concentración de aglutinante proteico puede ser demasiado baja para visualizar las reacciones; el sitio reactivo específico de anticuerpo en una proteína puede haber sido desnaturalizado durante la fabricación de pintura, como resultado de una reacción con pigmentos, o debido a la degradación química con el tiempo. Pueden ocurrir reacciones de unión no específicas, y el enjuague puede no ser adecuado para eliminar los anticuerpos adsorbidos sin reaccionar (Magrini, Bracci y Sandu, 2013). Un enjuague adecuado puede tener el efecto negativo no deseado de eliminar los aglutinantes sensibles al agua, por ejemplo, la cola de piel de conejo. El IFM es difícil de aplicar a muestras reales, ya que los factores que afectan la unión no específica y la emisión/dispersión espuria, mencionados anteriormente, son numerosos. Para evaluar el alcance de las reacciones inespecíficas y estimar la señal de fondo se han utilizado múltiples secciones delgadas preparadas a partir de secciones transversales como una comparación ideal para el control y las reacciones en blanco (Vagnini et al., 2008). A pesar de algunas limitaciones en la aplicación, IFM ha demostrado

ovalbumin (egg), or caesein (milk) to identify the presence of specific bio-organic materials such as glue, egg and casein (Vagnini et al., 2008) and in a few cases, the species from which the protein was obtained has been identified. Multiplex immunological analysis provides evidence for the presence of several different kinds of bio-materials in a single sample (Sciutto et al., 2016). The improvements achievable in localizing protein-containing layers using confocal microscopy have been demonstrated on test samples with fluorophore-tagged antibodies (Cartechini et al., 2010).

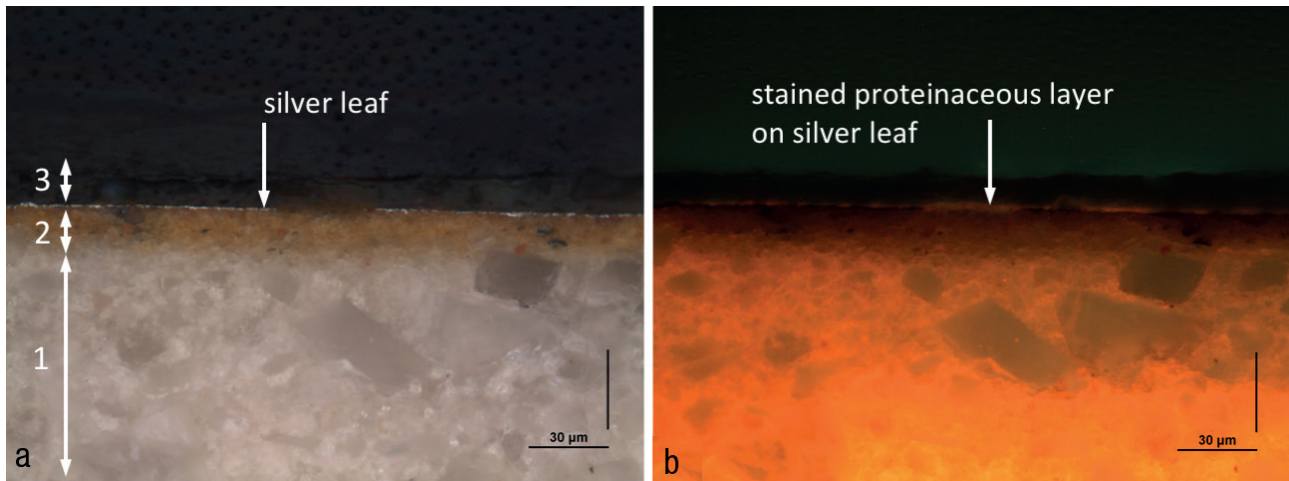
## Conclusion

Photoluminescence microscopy of cross sections, though often applied only in a qualitative manner, is a valuable method for investigation of artists' materials and methods and is improved and augmented by advanced techniques. Microspectrofluorimetry is a useful addition to visual observation, aiding in identifying spectroscopic artifacts, absorption of emission radiation, non-specific adsorption of stains on autofluorescent materials, and other processes that can confuse interpretation of PL. Use of probes, either reactive fluorophores or fluorescent-tagged antibodies, provides more precise information about the chemical identity of materials in samples, but may be difficult to use and the technique requires both expertise to give reliable results and experience to interpret these results. Innovations in accessories, lamps and detectors, such as fast-switching lasers, allow microscopists to obtain data of for instance spectral distribution and lifetimes of luminescence from samples. As one of the tools that entered museum laboratories in the 1930s and has developed over time, PL microscopy, with the addition of tunable and pulsed sources of light and the use of fast and highly sensitive

ser útil para visualizar la localización de capas de interés, como se muestra en la Figura 7. Se ha logrado la especificidad, por ejemplo, en la caracterización de una proteína como colágeno (cola), ovoalbúmina (huevo) o caseína (leche) para identificar la presencia de materiales bio-orgánicos específicos como cola, huevo y caseína (Vagnini et al., 2008) y en algunos casos, se ha identificado la especie de la que se obtuvo la proteína. El análisis inmunológico múltiple proporciona evidencia de la presencia de varios tipos diferentes de bio-materiales en una sola muestra (Sciutto et al., 2016). Las mejoras logrables en la localización de capas que contienen proteínas mediante microscopía confocal se han demostrado en probetas con anticuerpos marcados con fluoróforo (Cartechini et al., 2010).

## Conclusión

La microscopía de fotoluminiscencia de secciones transversales, aún siendo a menudo aplicada solo de manera cualitativa, es un método valioso para la investigación de materiales y métodos artísticos que mejora y aumenta con técnicas avanzadas. La microspectrofluorimetría es una adición útil a la observación visual, que asiste en la identificación de objetos espectroscópicos, absorción de radiación de emisión, adsorción no específica de tinciones en materiales autofluorescentes y otros procesos que pueden confundir la interpretación de PL. El uso de sondas, ya sea fluoróforos reactivos o anticuerpos marcados con fluorescencia, proporciona información más precisa sobre la identidad química de los materiales en las muestras, pero puede ser difícil de usar y la técnica requiere tanto pericia para dar resultados confiables como experiencia para interpretar los resultados. Las innovaciones en accesorios, lámparas y detectores, como los láseres de cambio rápido, permiten a los microscopistas obtener datos de, por ejemplo, la distribución espectral y la vida útil de la luminiscencia de las muestras. La microscopía PL fue una de las herramientas introducidas los laboratorios de los museos en la década de 1930 y se ha desarrollado con el tiempo con la adición de fuentes de luz sintonizables y pulsadas y el uso



**Figure 7** | Cross section before and after staining for protein. The layers numbered 1, 2 and 3 correspond to the ground, bole and a green glaze. Silver foil lies between layers 2 and 3. (a) Dark field illumination before staining. (b) Fluorescence image obtained using Leica filter cube D (excitation band pass 355-425 nm; dichroic filter 455 nm, long pass filter 460 nm) after staining using SYPRO® Ruby. Staining reveals the presence of a thin proteinaceous layer on the silver leaf by its red-orange emission. Adapted from Dallongeville et al. 2013. Sample obtained from The Holy Ghost Altarpiece, late 17th Century, Catholic Parish Church St. Michael of Mondsee, Austria.

**Figura 7** | Sección transversal antes y después de la tinción de proteínas. Las capas numeradas 1, 2 y 3 corresponden al suelo y un esmalte verde. La lámina de plata se encuentra entre las capas 2 y 3. (a) Iluminación de campo oscuro antes de la tinción. (b) Imagen de fluorescencia obtenida usando el filtro de cubo Leica D (paso de banda de excitación 355-425 nm; filtro dicróico 455 nm, filtro de paso largo 460 nm) después de la tinción usando SYPRO® Ruby. La tinción revela la presencia de una delgada capa proteica en la hoja de plata por su emisión rojo-naranja. Adaptado de Dallongeville et al., 2013. Muestra obtenida del Retablo del Espíritu Santo, de finales del siglo XVII, Iglesia parroquial católica San Miguel de Mondsee, Austria.

digital detectors, has provided new capabilities for the characterization and specification of artists' materials. This makes PL microscopy a valuable method for the identification of materials and the study of alteration processes in paint and other materials, including organic/inorganic interaction processes and stoichiometric variation within semiconductor pigments.

de detectores digitales rápidos y altamente sensible proporcionando nuevas capacidades para la caracterización y especificación de materiales de artistas. Esto hace que la microscopía PL sea un método valioso para la identificación de materiales y el estudio de procesos de alteración en pintura y otros materiales, incluidos los procesos de interacción orgánicos / inorgánicos y la variación estequiométrica dentro de los pigmentos semiconductores.

## References | Bibliografía

Berrie, B. H., and Matthew, L. C. (2005). Material innovation and artistic invention: new materials and new colors in Renaissance Venetian paintings. In *Scientific Examination of Art: Modern Techniques in Conservation and Analysis*, pp. 12-26. Washington, DC: The National Academy Press. [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=11413&page=12](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=11413&page=12)

- Bertrand, L., Réfrégiers, M., Berrie, B., Echard, J.-P., and Thoury, M. (2013). A multiscale photoluminescence approach to discriminate among semiconducting historical zinc white pigments. *Analyst*, 138(16), pp. 4463-4469. <https://doi.org/10.1039/c3an36874b>
- Bertrand, L., Schöeder, S., Anglos, D., Breese, M. B. H., Janssens, K., Moini, M., and Simon, A. (2015). Mitigation strategies for radiation damage in the analysis of ancient materials. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, pp. 128-145. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.005>
- Bottiroli, G., Gallone Galassi, A., and Bernacchi, E. (1986). *Microspectrofluorometric techniques applied to the analysis of binding media and varnishes in color samples taken from paintings*. Paper presented at the Scientific Methodologies Applied to Works of Art, Florence, 2-5 May, 1984, pp. 168-172, 241.
- Cartechini, L., Vagnini, M., Palmieri, M., Pitzurra, L., Mello, T., Mazurek, J., and Chiari, G. (2010). Immunodetection of proteins in ancient paint media. *Accounts of Chemical Research*, 43(6), pp. 867-876. <https://doi.org/10.1021/ar900279d>
- Claro, A., Melo, M. J., Schäfer, S., Seixas de Melo, J. S., Pina, F., van den Berg, K. J., and Burnstock, A. (2008). The use of microspectrofluorimetry for the characterization of lake pigments. *Talanta*, 74, pp. 922-929. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.07.036>
- Comelli, D., Artesani, A., Nevin, A., Mosca, S., Gonzalez, V., Eveno, M., and Valentini, G. (2017). Time-resolved photoluminescence microscopy for the analysis of semiconductor-based paint layers. *Materials*, 10(11), p. 1335. <https://doi.org/10.3390/ma10111335>
- Derrick, M. R., Souza, L., Kieslich, T., Florsheim, H., and Stulik, D. (1994). Embedding paint cross-section samples in polyester resins: problems and solutions. *Journal of the American Institute for Conservation*, 33(3), pp. 227-245. <http://cool.conservation-us.org/jaic/articles/jaic33-03-001.html>
- Ishikawa-Ankerhold, H., Ankerhold, R., and Drummen, G. (2012). Advanced fluorescence microscopy techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*, 17(4), pp. 4047-4132. <https://doi.org/10.3390/molecules17044047>
- Khandekar, N. (2003). Preparation of cross-sections from easel paintings. *Studies in Conservation*, 48(suppl. 1), pp. 52-64. <https://doi.org/10.1179/sic.2003.48.Supplement-1.52>
- Magrini, D., Bracci, S., and Sandu, I. C. A. (2013). Fluorescence of organic binders in painting cross-sections. *Procedia Chemistry*, 8, pp. 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2013.03.025>
- Melo, M. J., and Claro, A. (2010). Bright light: microspectrofluorimetry for the characterization of lake pigments and dyes in works of art. *Accounts of Chemical Research*, 43(6), pp. 857-866. <https://doi.org/10.1021/ar9001894>
- Messinger, J. M. (1992). Ultraviolet-fluorescence microscopy of paint cross sections: cycloheptaamylose-dansyl chloride complex as a protein-selective stain. *Journal of the American Institute for Conservation*, 31(3), pp. 267-274. <https://doi.org/10.2307/3179723>
- Morales, K. M., and Berrie, B. H. (2015). A note on characterization of the cochineal dyestuff on wool using microspectrophotometry. *E-PreservationScience*, 12, pp. 8-14. Retrieved from [http://www.morana-rtd.com/e-preservation-science/2015/ePS\\_2015\\_a2\\_Morales.pdf](http://www.morana-rtd.com/e-preservation-science/2015/ePS_2015_a2_Morales.pdf)
- O'Donoghue, E., Johnson, A. M., Mazurek, J., Preusser, F., Schilling, M., and Walton, M. S. (2006). Dictated by media: conservation and technical analysis of a 1938 Joan Miró canvas painting. *Studies in Conservation*, 51(suppl. 2), pp. 62-68. <https://doi.org/10.1179/sic.2006.51.Supplement-2.62>
- Petty, H. R. (2007). Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology. *Microscopy Research and Technique*, 70(8), pp. 687-709. <https://doi.org/10.1002/jemt.20455>
- Plesters, J. (1956). Cross-sections and chemical analysis of paint samples. *Studies in Conservation*, 2(3), pp. 110-157. <https://doi.org/10.2307/1505000>

- Samineni, P., de Cruz, A., Villafaña, T. E., Warren, W. S., and Fischer, M. C. (2012). Pump-probe imaging of historical pigments used in paintings. *Optics Letters*, 37(8), pp. 1310-1312. <https://doi.org/10.1364/OL.37.001310>
- Sandu, I. C. A., Schäfer, S., Magrini, D., Bracci, S., and Roque, C. A. (2012). Cross-section and staining-based techniques for investigating organic materials in painted and polychrome works of art: a review. *Microscopy and Microanalysis*, 18(4), pp. 860-875. <https://doi.org/10.1017/s1431927612000554>
- Sciutto, G., Zangheri, M., Prati, S., Guardigli, M., Mirasoli, M., Mazzeo, R., and Roda, A. (2016). Immunochemical micro imaging analyses for the detection of proteins in artworks. *Topics in Current Chemistry*, 374(3), p. 32. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0033-3>
- Thoury, M., Echard, J.-P., Réfrégiers, M., Berrie, B., Nevin, A., Jamme, F., and Bertrand, L. (2011). Synchrotron UV-visible multispectral luminescence microimaging of historical samples. *Analytical Chemistry*, 83(5), pp. 1737-1745. <https://doi.org/10.1021/ac102986h>
- Thoury, M., Mille, B., Séverin-Fabiani, T., Robbiola, L., Réfrégiers, M., Jarrige, J. F., and Bertrand, L. (2016). High spatial dynamics-photoluminescence imaging reveals the metallurgy of the earliest lost-wax cast object. *Nature Communications*, 7, p. 13356. <https://doi.org/10.1038/ncomms13356>
- Vagnini, M., Pitzurra, L., Cartechini, L., Miliani, C., Brunetti, B. G., and Sgamellotti, A. (2008). Identification of proteins in painting cross-sections by immunofluorescence microscopy. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 395, pp. 57-64. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2041-9>
- Wolbers, R., and Landrey, G. (1987). *The use of direct reactive fluorescent dyes for the characterization of binding media in cross sectional examinations*. Paper presented at the AIC preprints of 15th Annual Meeting, Vancouver, British Columbia. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.1008&rep=rep1&type=pdf>