



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

# Università degli studi di Venezia

Facoltà Di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

---

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche per la  
Conservazione ed il Restauro

Tesi di laurea

—  
Ca' Foscari  
Dorsoduro 3246  
30123 Venezia

*Determinazione degli amminoacidi  
presenti nei leganti di natura proteica  
utilizzati nella pittura a tempera.  
Confronto tra GC-MS e HPLC-MS/MS.*

**Relatore**

Prof. Andrea Gambaro

**Laureanda**

Laura Bellinaso

**Correlatori**

Dott Paolo Cornale

Prof. Rossano Piazza

Dott.ssa Roberta Zangrando

---

Anno accademico 2011-2012

# INDICE

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	1
---------------------------------	---

## Fondamenti teorici

### Capitolo I

<b>I MATERIALI PITTORICI</b>	<b>3</b>
1. I leganti pittorici e le loro proprietà	4
2. Le proteine	5
2.1 Uovo	9
2.2 Latte e caseina	11
2.3 Colle animali	13

### Capitolo II

<b>GAS CROMATOGRAFIA CON DETECTOR A SPETTROMETRIA DI MASSA</b>	<b>16</b>
1. Il sistema integrato GC-MS	17
1.1 Gas cromatografia	18
1.2 La sorgente EI	19
1.3 L'analizzatore di massa a quadrupolo	20
1.4 Il detector	21

### Capitolo III

<b>CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ELEVATE PRESTAZIONI CON DETECTOR A SPETTROMETRIA DI MASSA</b>	<b>22</b>
1. Il sistema integrato HPLC-MS/MS	23
1.1 La cromatografia HILIC	24
1.2 La sorgente ESI	26
1.3 L'analizzatore a triplo quadrupolo	27
1.4 Il detector	28

### Capitolo IV

<b>I CAMPIONI REALI</b>	<b>29</b>
-------------------------	-----------

## Parte sperimentale

### Capitolo V

<b>MATERIALI STRUMENTI E SOLVENTI UTILIZZATI</b>	<b>34</b>
1. Materiali standard di riferimento	35
2. Solventi e reagenti	36
3. Attrezzatura di laboratorio	36

### Capitolo VI

<b>METODOLOGIA ANALITICA</b>	<b>38</b>
1. Interferenze dei pigmenti nella determinazione degli amminoacidi	39
2. Idrolisi del materiale proteico	41
3. Trattamento del campione	42
3.1 Estrazione selettiva delle proteine dal campione e purificazione	43
3.2 Idrolisi acida in fase vapore assistita da microonde	44
3.3 Derivatizzazione degli amminoacidi con MTBSTFA	44
4. Preparazione delle soluzioni impiegate	46

### Capitolo VII

<b>L'ANALISI STRUMENTALE</b>	<b>48</b>
1. La messa a punto e l'ottimizzazione del metodo strumentale GC-MS	49
2. La messa a punto e l'ottimizzazione del metodo strumentale HPLC-MS/MS	52

### Capitolo VIII

<b>RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	<b>54</b>
1. La validazione del metodo	55
2. Risultati e discussioni sull'analisi GC-MS dei campioni reali	58
2.1 L'analisi statistica - fondamenti teorici	61
2.2 L'analisi statistica - analisi dei dati	62
3. Conclusioni	65
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>66</b>

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Le opere di pittura murale costituiscono una parte importante e preziosa del patrimonio artistico italiano, alla cui salvaguardia e conservazione sono stati rivolti, negli ultimi anni, sforzi e risorse sempre maggiori. Nell'affrontare delicati interventi di restauro risulta indispensabile una stretta collaborazione fra storici dell'arte, restauratori ed esperti di discipline scientifiche. In particolare, la caratterizzazione chimica dei materiali costituenti lo strato pittorico rappresenta un'importante fonte di conoscenza delle tecniche pittoriche usate dagli artisti, nonché un punto di partenza per la pianificazione di eventuali interventi di restauro e per la scelta delle condizioni di conservazione più opportune. Dal punto di vista chimico-fisico un dipinto costituisce un sistema eterogeneo complesso, in cui sono presenti in proporzioni variabili materiali organici e inorganici quali proteine, lipidi, idrocarburi, pigmenti inorganici, substrato murale. Questi materiali possono essere originali o aggiunti nel corso di restauri, durante le operazioni di pulitura o consolidamento, o dovuti a contaminazione ambientale. Possono inoltre aver subito nel tempo modificazioni significative a seguito di processi degradativi con eventuale formazione di prodotti di decomposizione di difficile previsione ed identificazione [KARPOWICZ A., 1981].

Tale complessità comporta, dal punto di vista analitico, notevoli difficoltà, ulteriormente aggravate dal fatto che le quantità di campione disponibili per l'analisi sono di dimensione molto ridotte (in genere ca. 1mg) e che generalmente la componente organica è rappresentata da quantità inferiori al 30%.

Fra le varie sostanze organiche comunemente presenti nei dipinti murali, l'interesse di questo lavoro è rivolto alla caratterizzazione dei leganti proteici, di quei materiali cioè, che svolgono le funzioni di agenti disperdenti e fissativi dei pigmenti.

La procedura pre-analitica ha previsto la determinazione della composizione amminoacidica mediante estrazione, purificazione, idrolisi e derivatizzazione del campione al fine di caratterizzarlo sfruttando le potenzialità analitiche degli strumenti GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) [CASOLI A. ET AL., 1995][COLOMBINI M.P. ET AL., 2006] [COLOMBINI M.P. ET AL., 2010] e HPLC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry). Questo procedimento ha permesso di valutare analogie e differenze tra i risultati ottenuti sia nel caso della validazione della metodica analitica che successivamente dall'analisi di campioni reali forniti dal laboratorio d'analisi C.S.G. Palladio.

## **Fondamenti teorici**

## *Capitolo I*

### **I MATERIALI PITTORICI**

## 1. I LEGANTI PITTORICI E LE LORO PROPRIETA'

Il complesso di proprietà richieste ad un materiale per poter essere utilizzato come legante ha limitato la scelta dei possibili medium pittorici nella storia. La funzione specifica di un legante pittorico [MATTEINI M. ET AL., 1989][ROSATI C., 1991] è quella di disperdere in modo omogeneo le particelle del pigmento e farle aderire, in forma di film sottile, alla superficie del supporto. Il legante, per esplicare appieno la sua funzione, deve rispondere a determinati requisiti fisici e chimici:

- proprietà coesive e adesive che garantiscano buona coesione dei grani di pigmento tra loro ed una buona adesione al substrato;
- viscosità idonea a formare con i pigmenti in polvere un impasto stabile ed omogeneo;
- tempi di solidificazione relativamente brevi, con formazione di un film sottile, aderente ed elastico;
- trasparenza ed assenza di colore;
- resistenza all'azione fotolitica della luce;
- resistenza agli agenti chimici atmosferici e all'azione di solubilizzazione dei più comuni solventi;
- compatibilità chimica con i pigmenti;

A seconda del legante utilizzato per la realizzazione di un dipinto, si distinguono principalmente: tecniche "a tempera", tecniche "a olio", tecniche miste e tecniche moderne a base di polimeri sintetici.

I termini "tempera" e "temperare" indicavano originariamente l'azione modificante esercitata sui pigmenti in polvere, pertanto non stendibili, da quelle sostanze liquide che trasformandoli in impasti (tinte) ne consentivano l'applicazione in forma di stesure pittoriche sui supporti. Con lo svilupparsi delle tecniche ad olio, il termine tempera è stato progressivamente circoscritto ad indicare quei soli leganti che venivano utilizzati in dispersione acquosa. A seconda della natura chimica si possono distinguere due tipi principali di tempere:

- a costituzione proteica (uovo, caseina e colle animali)
- di natura polisaccaride (gomme vegetali)

Soltanto i materiali del primo gruppo rientrano nell'ambito di questa tesi. Se ne descrivono di seguito le caratteristiche.

## 2. LE PROTEINE

Le proteine o protidi sono composti azotati ad elevato peso molecolare ( $\geq 5000$  dalton) che rappresentano i costituenti fondamentali degli organismi biologici e dei prodotti da essi derivati [CAMPANELLA ET AL., 2007].

Nella molecola dei composti noti come amminoacidi, sostanze polifunzionali naturali, sono contemporaneamente presenti la funzione amminica (ad es.  $-\text{NH}_2$ ) e quella carbossilica ( $-\text{COOH}$ ). Possono essere schematizzati nel modo seguente:

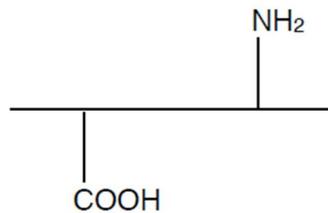


Figura1.1: schematizzazione di una molecola di amminoacido

La funzione amminica, in quanto basica, può essere salificata dalla funzione acida presente nella stessa molecola per cui gli amminoacidi esistono delle due seguenti forme in equilibrio tra loro

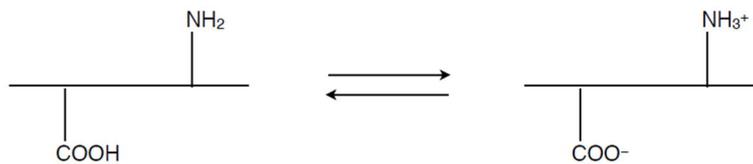
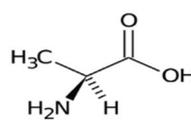
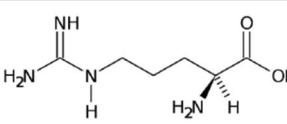
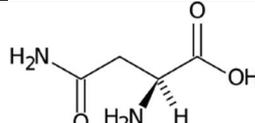
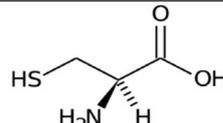
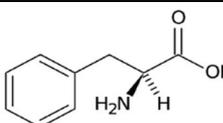
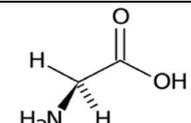
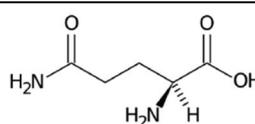
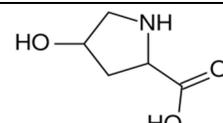
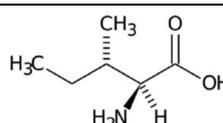
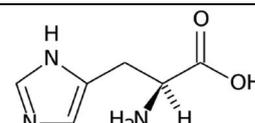
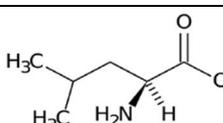
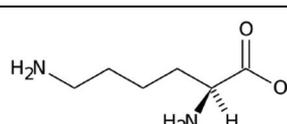
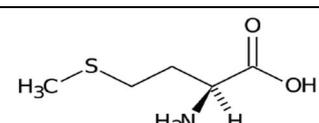
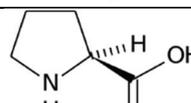


Figura1.2: schematizzazione dell'equilibrio che intercorre tra la forma priva di cariche e quella ionica di un generico amminoacido.

Trattandosi di acidi e basi deboli tale trasferimento avviene solo in maniera parziale, ragion per cui le due forme vengono a determinare un equilibrio.

I principali  $\alpha$ -amminoacidi naturali che si riscontrano nelle proteine sono ventuno:

Amminoacido	Formula bruta	Formula di struttura
acido aspartico (Asp)	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	<p>Struttura chimica dell'acido aspartico. Mostra un gruppo carbossilico (HO-C=O) a sinistra, un gruppo amminico (H<sub>2</sub>N) e un idrogeno (H) legati al carbonio alfa, e un altro gruppo carbossilico (HO-C=O) a destra. Il carbonio alfa è legato anche a un gruppo R (non mostrato).</p>
acido glutammico (Glu)	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	<p>Struttura chimica dell'acido glutammico. Mostra un gruppo carbossilico (HO-C=O) a sinistra, un gruppo amminico (H<sub>2</sub>N) e un idrogeno (H) legati al carbonio alfa, e un altro gruppo carbossilico (HO-C=O) a destra. Il carbonio alfa è legato anche a un gruppo R (non mostrato).</p>

alanina (Ala)	$C_3H_7NO_2$	
arginina (Arg)	$C_6H_{14}N_4O_2$	
asparagina (Asn)	$C_4H_8N_2O_3$	
cisteina (Cys)	$C_3H_7NO_2S$	
fenilalanina (Phe)	$C_9H_{11}NO_2$	
glicina (Gly)	$C_2H_5NO_2$	
glutammina (Gln)	$C_5H_{10}N_2O_3$	
idrossiprolina (Hyp)	$C_5H_9NO_3$	
isoleucina (Ile)	$C_6H_{13}NO_2$	
istidina (His)	$C_6H_9N_3O_2$	
Leucina (Leu)	$C_6H_{13}NO_2$	
Lisina (Lys)	$C_6H_{14}N_2O_2$	
Metionina (Met)	$C_5H_{11}NO_2S$	
Prolina (Pro)	$C_5H_9NO_2$	



numero, il tipo e la sequenza degli amminoacidi in una catena proteica sono tipici e caratteristici di ciascuna proteina e ne determinano la struttura e le proprietà chimiche e fisiche. Per comprendere la struttura delle proteine si suddivide la loro organizzazione molecolare in più livelli con diversa complessità. I quattro livelli sono così definiti:

- la struttura primaria è costituita dall'insieme dei legami covalenti (soprattutto legami peptidici e ponti disolfuro) che uniscono le subunità monomeriche della proteina in una catena polipeptidica. Il principale elemento della struttura primaria è la *sequenza* dei residui amminoacidici;

- la struttura secondaria si riferisce a disposizioni particolarmente stabili dei residui amminoacidici che danno origine a organizzazioni strutturali ricorrenti. E' caratterizzata dalla presenza di ponti idrogeno fra i gruppi del legame peptidico di residui non adiacenti, mentre non sono direttamente coinvolte le catene laterali degli aminoacidi. All'interno della stessa proteina, diversi tratti possono assumere la medesima struttura secondaria o strutture secondarie differenti. Le principali forme di strutture secondarie presenti nelle proteine sono la conformazione a spirale (o ad  $\alpha$ -elica) favorita dai legami a idrogeno, quella del collagene a pieghe (detta anche a foglio ripiegato) o quelle globulari;

- la struttura terziaria descrive tutti gli aspetti del ripiegamento tridimensionale di un polipeptide ed è indispensabile per la sua attività biologica. La struttura terziaria è stabilizzata principalmente da legami non covalenti come ponti idrogeno, interazioni idrofobiche tra amminoacidi non polari e legami ionici. Inoltre, la struttura terziaria può coinvolgere anche legami covalenti, sotto forma di ponti disolfuro fra due cisteine. Le interazioni che si instaurano a livello tridimensionale coinvolgono amminoacidi non necessariamente vicini nella struttura primaria. Quando queste interazioni vengono meno, per esempio in presenza di elevate temperature, di pH non ottimale o di detergenti, la struttura tridimensionale viene persa, e la proteina va incontro a denaturazione, perdendo la sua attività biologica.

- la struttura quaternaria definisce la disposizione nello spazio delle subunità polipeptidiche.

La proteina denaturata, come sopra detto, mantiene intatta la sua struttura primaria e manifesta una diminuzione della propria solubilità. Questo effetto è positivo quando la proteina funge da legante pittorico, negativo quando la sua funzione è di adesivo o consolidante in quanto il materiale non è più reversibile.

Le proteine risultano sostanze affini all'acqua in quanto posseggono molti gruppi capaci di formare legami idrogeno (gruppo peptidico, carbossilico, amminico ecc.). In alcuni casi il carattere idrofilo consente la formazione di soluzioni acquose; in altri casi riesce a provocare solo fenomeni

di rigonfiamento. Tali soluzioni sono di natura colloidale cioè sono costituite da grossi aggregati molecolari chiamati *micelle* disperse in maniera stabile nella fase acquosa grazie ad uno strato elettrico di ioni che circonda ognuna di esse. Le micelle si respingono le une con le altre poiché circondate ognuna da carica elettrica dello stesso segno; ne viene così impedita l'aggregazione. L'effetto opposto ovvero l'aggregazione delle micelle in particellati più grossi che compromettono la stabilità colloidale può essere causato da variazioni di pH; si parla allora di flocculazione o coagulazione.

Dal punto di vista chimico, le proteine sono difficilmente degradabili poiché sia i legami peptidici che i gruppi amminici e quelli carbossilici salificati hanno scarsa reattività. Il legame peptidico infatti viene idrolizzato solo con estrema difficoltà e i gruppi funzionali non hanno caratteristiche ossido-riduttive. Un po' più reattivi sono i legami solfidrici presenti solo in alcuni amminoacidi. Le proteine risultano invece facilmente degradabili per via enzimatica: infatti, se non preservate in maniera opportuna, vengono attaccate con facilità da muffe e batteri.

Si intende descrivere di seguito le caratteristiche dei leganti di natura proteica che sono oggetto di questo lavoro.

## 2.1 Uovo

L'uovo è uno dei componenti più comuni nella pittura antica: il contenuto elevato sia di lipidi che di proteine lo rendono un legante perfetto per la pittura a tempera, come riportato da Cennino Cennini nel *Libro dell'Arte* [CENNINI C., 1932]: *“Due maniere di tempere ti son buone, l'una miglior che l'altra. La prima tempera, toglì la chiara e il rossume dell'uovo, mettidentro alcune tagliature di cime di fico, e ribatti bene insieme. La seconda tempera si è proprio rossume d'uovo, e sappi che questa tempera è universale, in muro, in tavole, in ferro”*.

La tempera a uovo ha costituito la tempera per eccellenza per la pittura su tavola, ed è stata largamente impiegata anche in pittura murale, sia per lavori di integrazione e rifinitura di affreschi (decorazioni, applicazione dei pigmenti non resistenti all'alcalinità della calce), sia, più tardi, come tecnica murale vera e propria; l'uovo è stato inoltre un materiale molto usato in passato in interventi di restauro pittorico e ancora, mescolato con aceto, come fissativo e consolidante superficiale di affreschi.

La composizione proteica dell'uovo è molto complessa e può essere così schematizzata:

- albume: ovalbumina (50%), conalbumina (15%), lisozima (3%)
- tuorlo: fosfovittine;  $\alpha$  e  $\beta$  lipovitelline;  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  livettine

Il tuorlo d'uovo è un'emulsione tra una soluzione acquosa colloidale di alcune proteine (con una composizione percentuale che va dal 16 al 32%, passando da materiale fresco a materiale essiccato) e lipidi (la cui composizione percentuale va dal 33 al 65%), stabilizzata da emulsionanti, tra cui il più abbondante è la lecitina. Il contenuto di fosforo è pari allo 0,5% nel tuorlo. I lipidi del tuorlo sono composti per il 65% da trigliceridi, per il 30% da fosfolipidi, e contengono circa il 5% di colesterolo.

Il bianco d'uovo è essenzialmente una soluzione acquosa colloidale di proteine, con piccole quantità di grassi e di Sali minerali (tabella 1.2).

Tabella 1.2 composizione media percentuale di uovo di gallina

	uovo intero		Tuorlo		Albume	
	Fresco	secco	fresco	Secco	fresco	Secco
Proteine	12	48	16	32	10	83
Lipidi	11	44	33	65	tracce	Tracce
sali, carboidrati, altre sostanze	2	8	2	3	2	17
Acqua	75	-	49	-	88	-

Il paragone tra le composizioni mostra che l'albume allo stato secco è quasi privo di sostanze grasse. Questa proprietà è responsabile della fragilità e della parziale sensibilità all'acqua dei film formati con questo *medium* e ha reso minima la loro utilizzazione nella pittura su tavola, mentre furono impiegati per le miniature di manoscritti, come leganti per inchiostri e nelle preparazioni per le dorature. Al contrario, l'uovo intero e in maggior misura il tuorlo danno luogo alla formazione di un film con eccellenti proprietà meccaniche (coesione, adesione, flessibilità) e ottiche (bassa tendenza all'ingiallimento nel tempo). Infatti, nonostante i lipidi presenti nel tuorlo non presentino caratteristiche di oli siccativi, grazie ad un elevato contenuto di acido oleico, nella formazione del film hanno una funzione plastificante, e allo stato secco rendono il film idrorepellente e irreversibile. Nella pratica della pittura a tempera veniva usato perciò prevalentemente il rosso, accuratamente separato dal bianco, mescolato con poca acqua ma in quantità sufficiente ad ottenere con i pigmenti una pasta stendibile. Venivano aggiunti anche additivi naturali a scopo antifermentativo ma anche per fluidificare la miscela e ritardarne il rapido essiccamento.

Si riportano in tabella 1.3 le quantità relative dei diversi amminoacidi nelle proteine dell'uovo, ricavate prendendo in considerazione diverse fonti di letteratura [MILLS J.S. ET AL., 1987][SHILLING M.R. ET AL., 1996][KENNDLER G. ET AL., 1992].

Tabella 1.3: composizione amminoacidica percentuale delle proteine dell'uovo intero

	uovo intero
Gly	4-6
Ala	7-10
Val	5-10
Leu	8-12
Ile	5-7
Pro	5-6
Phe	4-6
Tyr	3-5
Ser	7-11
Thr	3-5
Cys	1-3
Met	2-3
Arg	6-8
His	2-3
Lys	4-7
Asp	12-18
Glu	12-19
Hyp	0

Le proteine dell'uovo non presentano amminoacidi con un contenuto di spiccata prevalenza; leucina (8-12%), valina (5-10%), acido glutammico (12-19%), acido aspartico (12-18%) sono gli amminoacidi più caratteristici.

## 2.2 Latte e caseina

La tempera a latte ha sempre costituito per gli artisti una valida alternativa alla tempera a uovo dalla quale, se si considera la composizione, non differisce poi molto in quanto si tratta di un'emulsione stabile a base di lipidi e proteine. Sebbene il suo uso non sia documentato così ampiamente quanto quello dell'uovo, il latte è stato impiegato in numerose ricette sia come legante che come fissativo o additivo diluente della tinta.

I costituenti principali del latte, oltre alle proteine e all'acqua, sono grassi, zuccheri e sali minerali. La maggior parte dell'acqua contenuta nella tempera a latte viene persa durante l'essiccamento della tinta.

In tabella 1.4 si riporta la composizione del latte essiccato presente nel film pittorico.

Tabella 1.4: composizione media percentuale del latte essiccato

sostanze presenti	latte intero	latte scremato
proteine	26	36
lipidi	26	1
glucidi	40	53
sodio	0.390	0.547
potassio	1.225	1.674
ferro	0.001	0.001
calcio	0.962	1.250

Ovviamente tali valori sono soggetti a variazioni dipendenti da fattori naturali e geografici, nonché dal grado di essiccamento e di scrematura.

La proteina principale del latte vaccino è la caseina, che costituisce all'incirca l'80% della frazione proteica. Il rimanente 20% è costituito dalle cosiddette *proteine del siero*:  $\beta$ -lattoglobulina (10% del contenuto proteico totale),  $\alpha$ -lattoalbumina (3,4% del contenuto proteico) e altre come sieralbumina (5%), lattoferrina (glicoproteina fosforilata), immunoglobuline, proteosi-proteoni (glicopeptidi), enzimi.

La caseina può essere estratta dal latte scremato riscaldandolo a 35°C e flocculando la proteina per acidificazione con acido cloridrico, acetico o solforico a pH 4,6 (punto isoelettico della caseina). Essa viene poi lavata con lo stesso acido ed essiccata. La caseina così ottenuta non è solubile in acqua, lo diviene a pH maggiore di 9, facendola reagire con gli alcali, formando i caseinati. I più usati in campo artistico sono quelli di ammonio ottenuto da caseina e ammoniaca o ammonio carbonato, e di calcio ottenuto da caseina e calce spenta  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ .

Le tempere a caseina sono generalmente caratterizzate dalla rapidità di essiccamento e dalla formazione di film opachi. La rapidità dei processi degenerativi a carico delle proprietà meccaniche come tendenza del medium a diventare fragile e screpolato ha fatto sì che la caseina fosse scarsamente utilizzata in passato nelle tecniche pittoriche.

Esistono diversi tipi di caseina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\kappa$ ), la cui composizione è però molto simile. Si riporta in tabella 1.5 la composizione amminoacidica percentuale media della caseina.

Tabella 1.5: composizione amminoacidica percentuale delle proteine della caseina

	caseina
Gly	1-4
Ala	2-4
Val	6-10
Leu	8-12
Ile	5-7
Pro	8-16
Phe	4-6
Tyr	2-6
Ser	6-8
Thr	2-4
Cys	0
Met	2-4
Arg	3-5
His	2-5
Lys	6-9
Asp	5-9
Glu	17-26
Hyp	0

La caseina è caratterizzata da un elevato contenuto di amminoacidi dicarbossilici (acido aspartico e acido glutammico, rispettivamente 5-9% e 17-26%), nonché un notevole contenuto di prolina (8-16%) e leucina (8-12%).

### 2.3 Colle animali

Le principali proprietà fisiche che hanno determinato in passato un diffuso utilizzo delle colle animali sono da ricercare soprattutto nelle loro spiccate qualità adesive. Tuttavia, oltre che come adesivi, esse sono state ampiamente utilizzate anche come medium per le preparazioni pittoriche. Il Cennini, nel suo manuale del XV secolo, consiglia come legante pittorico la colla animale per disperdere e fissare i pigmenti blu e verde, indicando per questo uso le qualità più pure. Nel XVIII

secolo H. L. Duhamel du Monceau suggerisce come legante pittorico una colla chiara, preparata con pelli di animali molto giovani.

Le colle animali sono dispersioni acquose colloidali di collagene, il costituente proteico della pelle, del tessuto connettivo e delle ossa di animali. Contengono anche, in piccole quantità (1-2%), sostanze non proteiche sia organiche che inorganiche (Sali, lipidi). Esistono diversi tipi di colle, con diverse caratteristiche chimico-fisiche a seconda della provenienza e dei trattamenti subiti in fase di preparazione e purificazione:

- colla di pelle, estratta da scarti di pelli animali e da altre parti cartilaginee;
- colla di ossa, estratta da ossa di mammiferi;
- colla di pesce, estratta da varie parti di pesci;
- colla di pergamena, ricavata dalla pergamena bollita a lungo.

Le qualità meno purificate sono comunemente chiamate colle forti, quelle più pure, gelatine. Quest'ultime sono costituite quasi esclusivamente da collagene. Le colle animali, in forma granulare o in polvere, sono materiali secchi, duri, inodori, di colore variabile dall'ambra chiaro al bruno.

Tutti i vari tipi di colla vengono ottenuti facendo rigonfiare i pezzi di materiale adatto in acqua a freddo. Una volta rigonfiati vengono riscaldati in modo tale da permetterne la solubilizzazione.

Le colle, a differenza dell'uovo, formano soluzioni colloidali acquose in maniera reversibile ossia una volta seccate per evaporazione dell'acqua riassumono le proprietà originali; possono quindi essere ridissolte e, nel caso, riutilizzate. Tuttavia la colla animale presenta alcuni svantaggi per la sua natura igroscopica che porta, con l'invecchiamento, ad una perdita di coesione (indebolimento delle preparazioni) e di adesione (distacco dal supporto e dagli strati pittorici) nei dipinti. L'acqua inoltre può giocare il ruolo di reattivo o di veicolo per altri reattivi rendendo possibili reazioni idrolitiche o comunque degenerative del materiale proteico. Infine, sempre all'azione dell'umidità sono legati processi di natura microbiologica (muffe e batteri) che trovano nel materiale proteico delle colle un adatto substrato per lo sviluppo.

In tabella 1.6 è riportata la composizione amminoacidica percentuale della colla animale.

Tabella 1.6: composizione amminoacidica percentuale del collagene

	Colla
Gly	10-16
Ala	20-36
Val	2-4
Leu	2-5
Ile	1-3
Pro	9-15
Phe	1-3
Tyr	0-1
Ser	3-6
Thr	2-3
Cys	0
Met	1-2
Arg	7-9
His	1-2
Lys	2-5
Asp	5-8
Glu	6-12
Hyp	8-13

La colla animale contiene idrossiprolina (8-13%), amminoacido assente nelle altre proteine animali, accanto ad alti contenuti di glicina (20-36%) e prolina (9-15%).

**Capitolo II**

**GAS CROMATOGRAFIA CON DETECTOR A  
SPETTROMETRIA DI MASSA**

## 1. IL SISTEMA INTEGRATO GC-MS

L'analisi mediante tecniche di Spettrometria di Massa consente di indagare il rapporto massa su carica ( $m/z$ ) dell'analita e, quindi, di ricavare informazioni riguardanti la composizione elementare e di determinare la struttura della sostanza in esame o procedere ad un'accurata analisi quantitativa. È questa una tecnica sensibile, specifica e di elevata riproducibilità. Inoltre, messo a punto il metodo analitico, la procedura può essere applicata nelle analisi di routine.

La Spettrometria di Massa si basa sulla ionizzazione e frammentazione delle molecole e sulla separazione degli ioni generati in fase gassosa mediante un opportuno analizzatore di massa. Un requisito necessario, quindi, per il funzionamento di uno spettrometro di massa è dato dalla presenza di ioni in fase gassosa della sostanza da esaminare.

Uno spettrometro di massa è uno strumento che lavora sotto vuoto spinto e si compone di un sistema di introduzione, una sorgente di ioni, un analizzatore di ioni e un rivelatore di ioni, collegato ad un sistema di elaborazione dati.

Il sistema di introduzione del campione consente il passaggio dell'analita dalle condizioni di pressione atmosferica alle condizioni di vuoto di funzionamento dello spettrometro di massa senza perturbazione dello stesso. L'introduzione può avvenire, per introduzione e/o infusione diretta o collegando lo spettrometro di massa ad un sistema cromatografico (GC nel caso specifico).

Una miscela, introdotta in un gas cromatografo, viene separata nei suoi componenti che eluiscono lungo una colonna cromatografica capillare e le sostanze eluenti vengono identificate unicamente in base ai relativi tempi di ritenzione (intervallo tra iniezione del campione e punto di massima risposta del rivelatore).

L'utilizzo come sistema di rivelazione di uno spettrometro di massa, direttamente collegato al gas cromatografo, consente, invece, di identificare univocamente ciascuna sostanza non solo in base al tempo di ritenzione, ma anche mediante il relativo spettro di massa.

La spettrometria di massa si basa sulla rivelazione di ioni in fase gassosa in condizioni di vuoto spinto; pertanto, l'accoppiamento con un gas cromatografo (GC/MS), che già prevede campioni in fase gassosa, si realizza facilmente, attraverso l'utilizzo di dispositivi (transfer line) capaci di ridurre il flusso del gas di trasporto prima che venga raggiunta la sorgente di ionizzazione.

Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è un gascromatografo Trace GC Ultra (Thermo Scientific) interfacciato ad uno spettrometro di massa con analizzatore a quadrupolo ISQ (Thermo Scientific) schematizzato in figura 2.1.

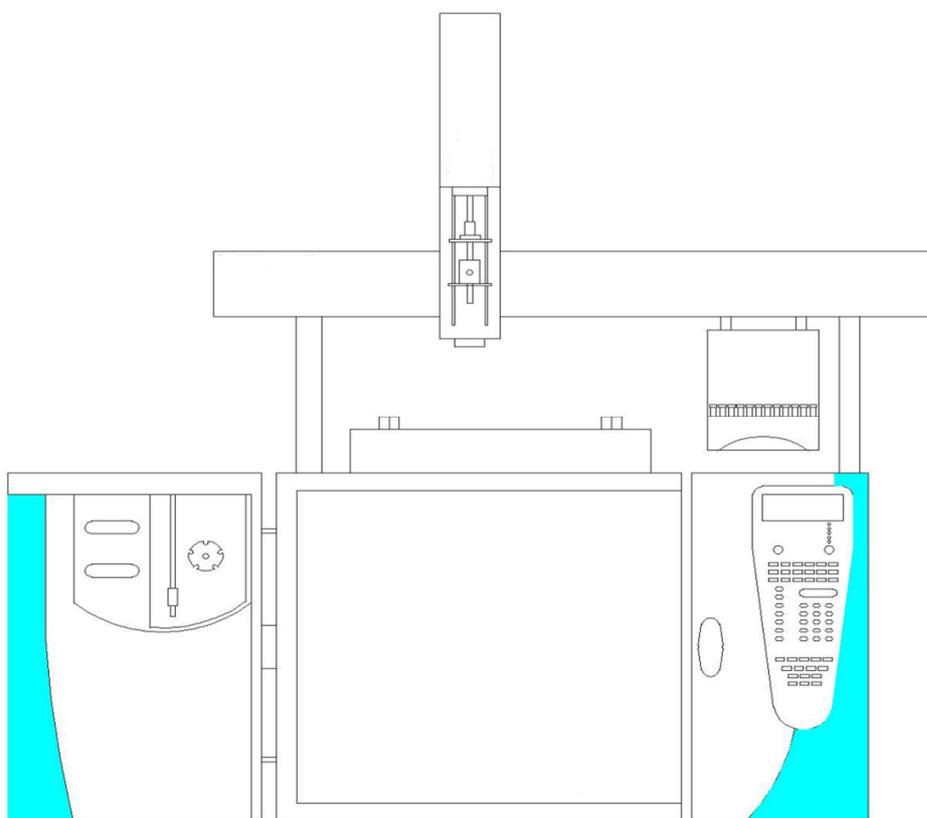


Figura 2.1: rappresentazione dello strumento Trace GC Ultra/ISQ

## 1.1 Gas cromatografia

In gas cromatografia, il gas della fase mobile è chiamato gas di trasporto e deve essere chimicamente inerte. L'elio è il gas più comune per fase mobile, sebbene vengano usati anche argon, azoto e idrogeno [SKOOG D.A ET AL., 2007]. Questi gas sono disponibili in bombole sotto pressione. Per il controllo della velocità di flusso del gas vengono richiesti regolatori di pressione, manometri e flussometri. La pressione di ingresso è generalmente compresa tra 10 e 50 psi (lb/in<sup>2</sup>) oltre la pressione atmosferica e porta a valori di velocità di flusso da 25 a 150ml/min con

colonne impaccate e da 1 a 25 mL/min per colonne capillari. Generalmente si assume che i flussi siano costanti, se la pressione interna rimane costante.

La fase mobile ha come unico compito quello di trasportare i componenti volatilizzati, e non interagisce con essi svolgendo un'azione discriminante. In pratica un gas è completamente solubile in un altro gas, dunque, non si può parlare di separazione basata sulla diversa affinità dei vari componenti nelle due fasi, ma solo rispetto alla fase stazionaria.

Per una buona efficienza della colonna, occorre che il campione sia di dimensione adatta e sia introdotto come un tappo di vapore. Microsiringhe graduate vengono usate per iniettare campioni liquidi attraverso un diaframma o setto di gomma o silicone nella camera riscaldata sistemata in testa alla colonna. La camera viene generalmente tenuta ad una temperatura di circa 50°C oltre il punto di ebollizione del componente meno volatile nel campione. Per le più comuni colonne analitiche impaccate, la dimensione del campione varia da pochi decimi di microlitro a 20 µL. Le colonne capillari richiedono campioni più piccoli di un fattore di 100 o più. In questo caso, spesso, si utilizza un sistema di ripartizione che suddivide il campione iniettato in modo tale da inviarne solo una piccola frazione nota (da 1:100 a 1:500) in testa alla colonna e il rimanente allo scarico.

## 1.2 La Sorgente EI

La tecnica di ionizzazione più utilizzata per molecole che sono facilmente vaporizzabili e sono termostabili è la Ionizzazione Elettronica (EI) (figura 2.2).

Nella Ionizzazione Elettronica, una piccolissima quantità di sostanza portata allo stato vapore e introdotta nella sorgente di ioni, generalmente ad una pressione di  $10^{-6}$  mmHg, interagisce con un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno o di renio riscaldato ed aventi un'energia di 70 eV (caso più frequente). Nell'urto gli elettroni cedono energia alle molecole di analita, che si ionizzano perdendo un elettrone dall'orbitale molecolare più esterno, con formazione di ioni positivi radicalici. Tali ioni, avendo un contenuto di energia interna molto alto, danno luogo ad una estensiva frammentazione, in funzione della natura chimica dell'analita stesso. Da questa frammentazione si generano ioni positivi cationici e/o radicali cationici, che, una volta separati e raccolti, generano uno spettro di massa che è caratteristico dell'analita come un'impronta digitale.

La Ionizzazione Elettronica è una tecnica di ionizzazione hard, che in alcuni casi può portare ad una estesa frammentazione lasciando poco o per niente rappresentato lo ione molecolare nello spettro di massa. Ovviamente in assenza del picco ionico molecolare nello spettro di massa il peso molecolare, che è un elemento distintivo per l'identificazione di una sostanza e che, comunque, è misurabile soltanto mediante tecniche di spettrometria di massa, può risultare difficilmente determinabile.

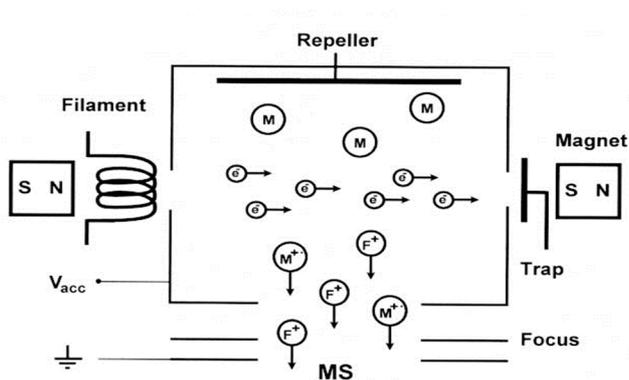


Figura 2.2: rappresentazione schematica di una sorgente EI

### 1.3 L'analizzatore di massa a quadrupolo

L'analizzatore di massa a quadrupolo consiste in quattro barre cilindriche, è fondamentalmente un filtro di massa che permette il passaggio soltanto di ioni con un determinato rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Il movimento degli ioni nel campo elettrico costituisce la base della separazione. Le barre opposte sono collegate ad un potenziale dc e ad uno a radiofrequenza (rf). Regolando opportunamente i potenziali si crea un cammino stabile per gli ioni con un certo rapporto  $m/z$ , in modo tale che essi attraversino l'analizzatore per arrivare al rivelatore. Gli spettri di massa si ottengono mediante la scansione dei potenziali applicati alle barre. I metodi di acquisizione che si possono scegliere nella spettrometria di massa sono diversi:

- *full-scan*: modalità di acquisizione che permette di ottenere l'intero spettro di massa; è resa indispensabile da indagini qualitative, tese all'identificazione e all'individuazione di sostanze incognite. I dati di uno spettro di massa full-scan di una sostanza derivano dall'acquisizione del

segnale relativo a tutti gli ioni generati nella camera di ionizzazione dalla sostanza nel range di valori di  $m/z$  selezionato per l'analisi.

In un'analisi full-scan lo spettrometro esegue in sequenza l'acquisizione di una serie di spettri di massa, opera, cioè, una scansione ripetuta nell'intervallo di valori di  $m/z$  impostato e ogni singola scansione rappresenta uno spettro di massa. Se ad esempio, viene acquisito uno spettro per secondo e la presenza del campione nello spettrometro è di 30 secondi saranno acquisiti 30 spettri di massa. L'abbondanza relativa dei vari ioni in ogni scansione è sommata, la somma dei diversi ioni è riportata in sequenza in un cromatogramma di corrente ionica totale (Total Ion Current, TIC), il cui profilo è simile a quello ottenuto da un qualsiasi rivelatore cromatografico.

- *Scansione di Ioni Selezionati (Selected Ion Monitoring, SIM)*: tecnica di acquisizione preferibile nel caso debbano essere effettuate analisi volte alla determinazione quantitativa di specifiche sostanze. È, infatti, possibile ottenere una maggiore sensibilità quando, nel corso dell'analisi, viene riportato in diagramma solo la corrente ionica dovuta ai ioni specifici che caratterizzano la sostanza in esame.

Si possono, cioè, selezionare ed acquisire soltanto pochi ioni rappresentativi dell'analita d'interesse: ciò comporta una diminuzione del segnale dovuto al rumore di fondo e, di conseguenza, un aumento del rapporto segnale/rumore e, quindi, una migliore sensibilità nella rivelazione degli analiti (specialmente nel caso di matrici complesse). Tale aumento di sensibilità dipende anche dal fatto che la finestra di osservazione dei segnali diventa più stretta e, quindi, nello stesso tempo possono essere misurati più eventi.

## 1.4 Il detector

I rivelatori più comuni nella spettrometria di massa sono i moltiplicatori di elettroni. Il moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo è un dispositivo a forma di corno, in vetro drogato con un elevato tenore di piombo. Un potenziale di 1,8 – 2 kV viene applicato lungo il rivelatore. Gli ioni che colpiscono la superficie determinano l'emissione di elettroni, che a loro volta colpiscono la superficie interna, con un ulteriore aumento di elettroni emessi ad ogni impatto. All'uscita del canale il segnale elettrico è raccolto e convertito in un segnale digitale che fornisce il conteggio degli ioni in relazione alla loro massa. Il numero di elettroni emessi dipende dal tipo di ione, dall'angolo e dall'energia di collisione e dal tipo di superficie con cui vengono a contatto.

## **Capitolo III**

### **CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ELEVATE PRESTAZIONI CON DETECTOR A SPETTROMETRIA DI MASSA**

## 1. IL SISTEMA INTEGRATO HPLC-MS/MS

Lo strumento HPLC Agilent Serie 1100, utilizzato in questo lavoro di tesi, è composto da più unità separate ma indispensabili al corretto funzionamento del cromatografo (figura 3.1).

I 5 moduli principali dai quali è costituito sono rispettivamente [A. VIANELLO, 2008]:

- cabinet per i serbatoi di solvente ed i relativi solventi (solitamente sono due, una dei quali spesso una soluzione acquosa) che costituiscono la fase mobile;
- degaser, sistema impiegato per la rimozione di eventuali bolle d'aria;
- pompa binaria, che può operare fino a 400 bar e che risulta indispensabile per sviluppare la pressione necessaria a spingere gli analiti lungo la colonna;
- autocampionatore, dispositivo per l'introduzione automatizzata del campione;
- colonna cromatografica, alloggiata orizzontalmente su due piastre che possono essere riscaldate per far variare la temperatura dell'analisi.

Il flusso di eluente in uscita dalla colonna è trasportato, attraverso un tubo in peek, all'ingresso del rivelatore a spettrometria di massa. La parte di rivelazione dello strumento utilizzato in questo studio è costituita da uno spettrometro di massa API 4000 con sorgente TURBO V<sup>TM</sup> (sorgente ESI) ed analizzatore a triplo quadrupolo (QqQ). Il principale vantaggio nell'utilizzo di questo "detector", rispetto ad altri sistemi di rivelazione (spettrometro UV, fluorimetro, etc.), risiede nella sensibilità e nella specificità della risposta, poiché ogni analita è riconosciuto in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ) degli ioni che ha generato. Nel caso di composti non completamente risolti per via cromatografica, lo spettrometro di massa porta comunque all'identificazione e alla quantificazione degli analiti, purché non isobarici (ioni con lo stesso rapporto  $m/z$  ma diversa composizione atomica).

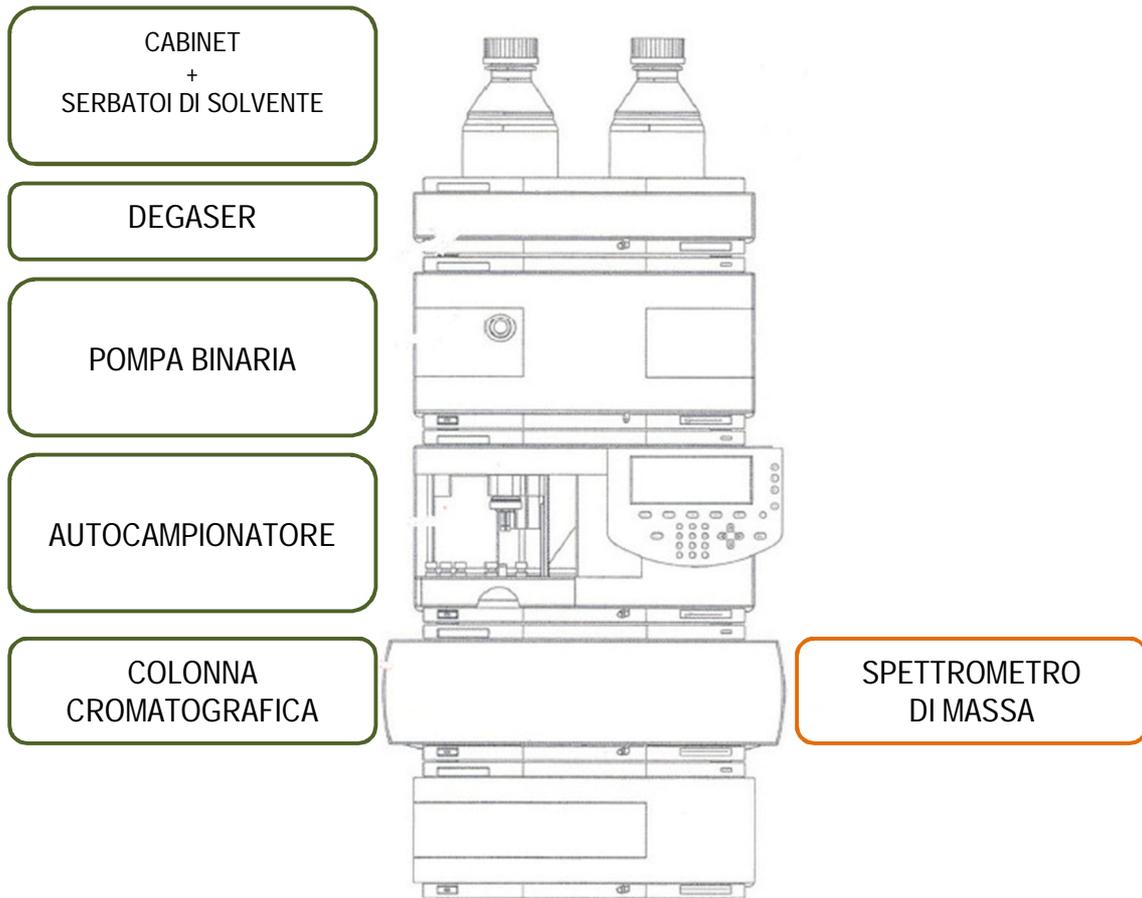


Figura 3.1: rappresentazione dello strumento HPLC Agilent Serie 1100

### 1.1 La cromatografia HILIC

La cromatografia ad interazione idrofilica (HILIC) è una tecnica di cromatografia liquida (LC) che utilizza una fase stazionaria polare (per esempio, silice o una fase polare legata) in accoppiamento con una fase mobile contenente un'apprezzabile quantità di acqua (solitamente minimo il 2,5% in volume) combinata con una proporzione più elevata di un solvente meno polare (spesso acetonitrile). Molto spesso le separazioni sono condotte usando il 5-40% di acqua (o tampone acquoso); la tecnica è anche compatibile con l'eluizione a gradiente.

Nello specifico è disponibile un ampio range di fasi stazionarie polari, che includono la silice "nuda", gli amminopropili, i dioli e le fasi stazionarie zwitterioniche (per esempio,

sulfoalkilbetaina) e le fasi legate possono essere ancorate su silice o su matrici organiche polimeriche.

Le fasi stazionarie a base di zwitterioniche permanenti sono commercializzate da SeQuant (Umeå, Svezia, attualmente parte della Merck, KGaA) specificatamente per la separazione HILIC, e contengono il gruppo funzionale  $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$  legato alla silice o ad una matrice polimerica (figura 3.2).

Per quanto riguarda le fasi mobili, le miscele di acetonitrile ed acqua sono le più utilizzate per la separazione di composti non ionizzabili. Per composti ionizzabili la scelta del tampone si restringe a causa della bassa solubilità dei tamponi inorganici (per esempio, il fosfato utilizzato comunemente in RP-HPLC) nelle fasi mobili che contengono elevate proporzioni di solventi organici. Generalmente si usano additivi acidi come l'acido formico e quello acetico, perché la stabilità delle colonne a base di silice viene compromessa a pH elevati.

Il termine HILIC è stato coniato da Alpert A.J. nel 1990, che ha spiegato i principi di questa tecnica ed alcune sue importanti applicazioni [ALPERT J. A., 1990].

L'HILIC può essere considerata un'estensione della cromatografia in fase normale nell'ambito delle fasi mobili acquose tanto che talvolta è chiamata "cromatografia acquosa in fase normale".

I metodi del gradiente impiegati in modalità HILIC sono esattamente l'opposto di quelli utilizzati in cromatografia liquida in fase inversa (RPLC). Le condizioni iniziali saranno altamente organiche, solitamente al 95%, per poi diventare progressivamente acquose. Per questa ragione, anche il termine "fase inversa inversa" sta diventando comune.

La superficie delle colonne in silice comunemente utilizzate in HILIC è deattivata dalla presenza di una significativa quantità di acqua nella fase mobile rispetto alla regolare cromatografia in fase normale. Come risultato si hanno minori problemi per quanto riguarda la forma dei picchi nel caso di soluti estremamente polari rispetto alla separazione in fase normale.

Il meccanismo di separazione presente nella cromatografia HILIC è indubbiamente complesso, ed è stato discusso in dettaglio in una recente pubblicazione [HEMSTRÖM ET AL., 2006]. Alpert [ALPERT J.A., 1990], ha proposto che uno strato stagnante acquoso sia bloccato nelle vicinanze della fase stazionaria e che la partizione del soluto avvenga tra questo strato e la fase mobile massiva.

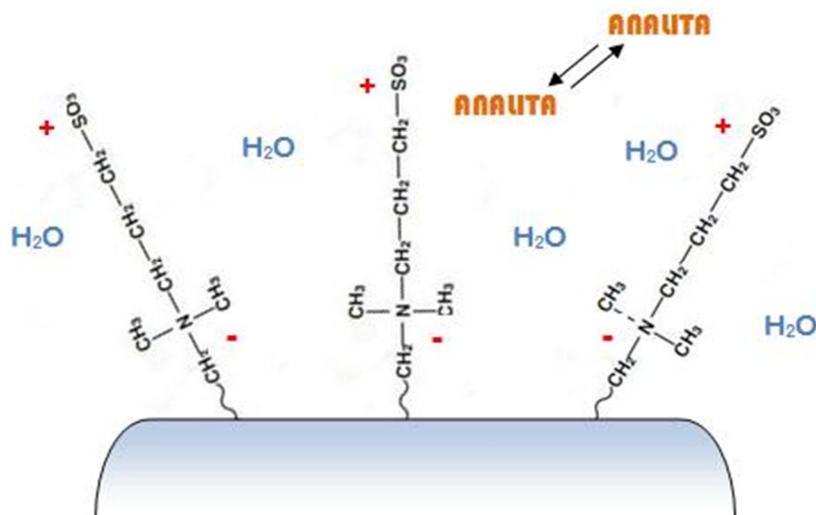


Figura 3.2: il processo di partizione idrofilica in cromatografia HILIC

## 1.2 La sorgente ESI

La Ionizzazione Electrospray si realizza durante il passaggio di fase dell'analita dalla fase condensata liquida alla fase gassosa, attraverso un procedimento di nebulizzazione in uno spazio in cui è presente un campo elettrico di intensità di migliaia di Volt per centimetro. La soluzione dell'analita da ionizzare viene nebulizzata, utilizzando azoto compresso, attraverso un ugello che è posto ad una differenza di potenziale di circa 4kV. L'aerosol che viene a formarsi contiene delle goccioline di soluzione che subiscono una progressiva desolvatazione, in seguito alla quale il loro diametro diminuisce fino ad un valore critico (limite di Rayleigh) oltre il quale si ha la loro esplosione Colombiana (figura 3.3). Questo processo, che avviene a pressione atmosferica, porta alla formazione di ioni molecolari variamente protonati in fase gassosa a partire da una soluzione liquida. In questo modo all'analizzatore arrivano cluster di ioni molecolari protonati o deprotonati desolvatati ottenuti a pressione ordinaria. Poichè lo stato di carica dell'analita in soluzione è influenzato dal pH, la ionizzazione electrospray produce uno spettro di massa in cui per un singolo analita possono essere registrati più ioni quasi molecolari del tipo  $[M+Hn]^{+n}$  o  $[M-Hn]^{-n}$ . A differenza della Ionizzazione Elettronica (capitolo II – paragrafo 1.2) la tecnica di Ionizzazione Electrospray, non trasferendo un eccesso di energia nel processo di ionizzazione, non produce frammentazioni significative ed è considerata per questo una tecnica di ionizzazione soft.

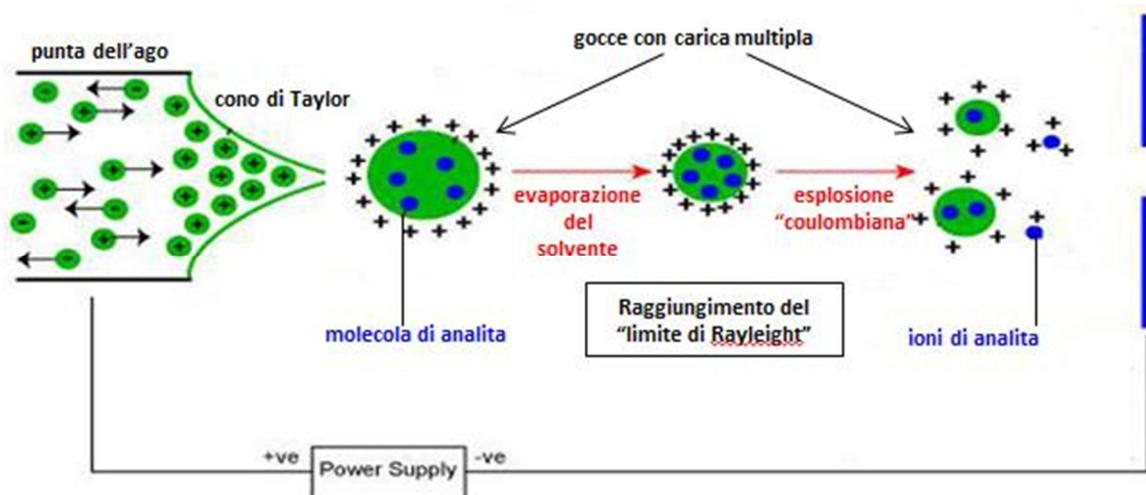


Figura 3.3: rappresentazione schematica di una sorgente ESI

## 1.2 L'analizzatore a triplo quadrupolo

Per indagare più in dettaglio la struttura degli ioni in fase gassosa e, quindi, la struttura dell'analita o per migliorare la specificità e la sensibilità dell'analisi quantitativa è possibile ricorrere ad un tipo particolare di spettrometria di massa, detta spettrometria di massa tandem (MS-MS).

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QqQ) è costituito dalla sequenza di tre quadrupoli con due analizzatori quadrupolari (Q1 e Q3) e la cella di collisione (Q2), posta fra loro. Anteriormente ai quadrupoli è posizionato un ulteriore quadrupolo (Q0) che provvede unicamente alla focalizzazione degli ioni entranti in Q1 (figura 3.4).

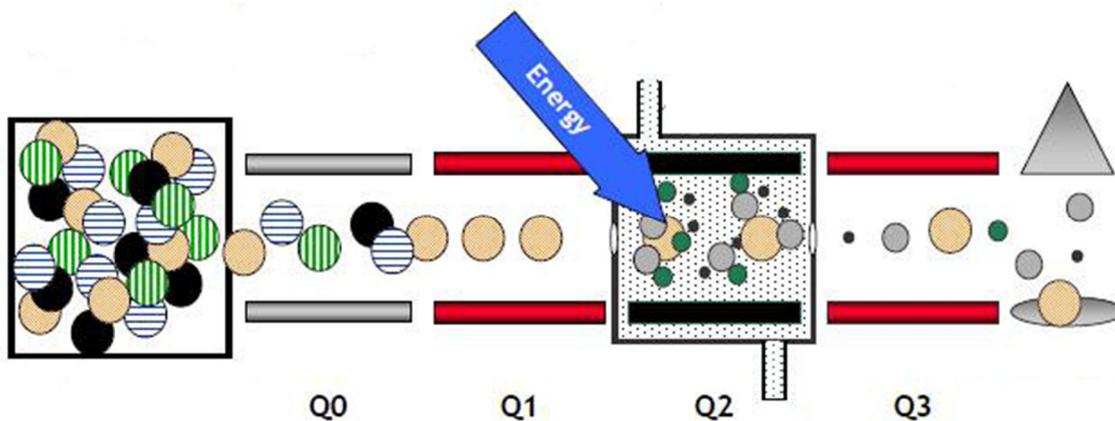


Figura 3.4: schema a blocchi dello spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo

Le modalità di utilizzo di un triplo quadrupolo sono molteplici e le più semplici vedono l'utilizzo dello strumento come un singolo quadrupolo mediante scansioni in *Fullscan* o in SIM utilizzando Q1 o Q3.

E' possibile tuttavia ottenere lo spettro di massa di ioni-prodotto derivanti dalla frammentazione di uno qualsiasi degli ioni (ione-precursore) presenti nello spettro di massa *full-scan*. In genere, per scopi quantitativi, è preferibile scegliere come ione-precursore quello più intenso nello spettro di massa *full-scan* in modo da selezionare la quasi totalità della corrente ionica generata dall'analita e non perdere in sensibilità. Con la spettrometria di massa tandem nel primo stadio di analisi lo ione precursore, avente un determinato rapporto  $m/z$ , viene selezionato ed isolato. Nel secondo stadio a tale ione viene fornita energia o per collisione o per radiazione elettromagnetica, inducendo la frammentazione dello stesso. Gli ioni prodotto risultanti, separati da un secondo analizzatore di massa sono rivelati ed acquisiti in uno spettro di massa tandem.

Le più comuni tipologie di analisi eseguite con questa tecnica sono le seguenti: (SIR – Single Ion Recording) o monitoraggio di reazioni multiple (MRM – Multiple Reaction Monitoring) per analisi quantitative sensibili e specifiche anche senza preventiva separazione; scansione degli ioni prodotti (Product Ion Scan) per studi strutturali delle molecole o scelta delle condizioni di MRM; analisi degli ioni precursori di un definito prodotto ionico (Precursor Ion Scan) e analisi di ogni ione che perde una certa massa (Constant Neutral Loss Scan) per riconoscere e quantificare famiglie di prodotti.

### **1.3 Il detector**

Gli ioni selezionati sono convogliati attraverso un sistema di lenti focalizzatrici e indirizzati, per mezzo di un deflector, nel "detector" dello spettrometro di massa, costituito da un elettromoltiplicatore CEM (Channel Electron Multiplier), composto da un dispositivo a dinodo continuo (già discusso nel capitolo II – paragrafo 1.4).

## **Capitolo IV**

### **I CAMPIONI REALI**



**12CA01565**

**a)** Microfoto del campione t.q. al microscopio ottico a 40x

**b)** Microfoto della sezione lucida al microscopio ottico in luce riflessa a 80x

Dal basso verso l'alto: stesura pittorica di colore giallo, probabile ocra, si osservano inoltre pochi granuli di blu e altri, sporadici, di ocra rossa e ocra bruna; stesura pittorica di colore bruno; stesura pittorica più chiara della precedente composta probabilmente da terra d'ombra miscelata a ocre.

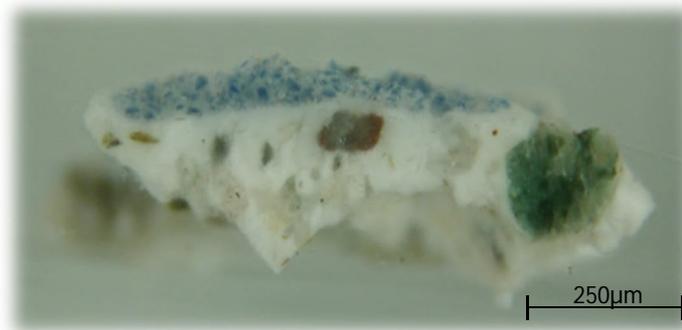
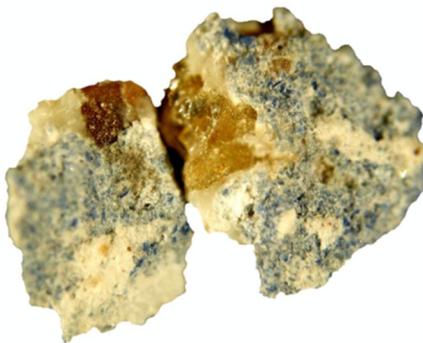


**12CA01570**

**a)** Microfoto del campione t.q. al microscopio ottico a 40x

**b)** Microfoto della sezione lucida al microscopio ottico in luce riflessa a 80x

Dal basso verso l'alto: stesura pittorica di colore rossastro, probabilmente ocre rosse; strato di colore bianco.



**12CA01571**

**a)** Microfoto del campione t.q. al microscopio ottico a 40x

**b)** Microfoto della sezione lucida al microscopio ottico in luce riflessa a 80x

Dal basso verso l'alto: stesura pittorica di colore azzurro ben conservata nella tinta.



**12CA01069**

**a)** Microfoto del campione t.q. al microscopio ottico a 40x

**b)** Microfoto della sezione lucida al microscopio ottico in luce riflessa a 80x

Dal basso verso l'alto: stesura pittorica di colore verde scuro a base probabilmente di terra verde e nero carbone di origine vegetale, accompagnata da piccole aggiunte di ocre gialla e ocre arancio.

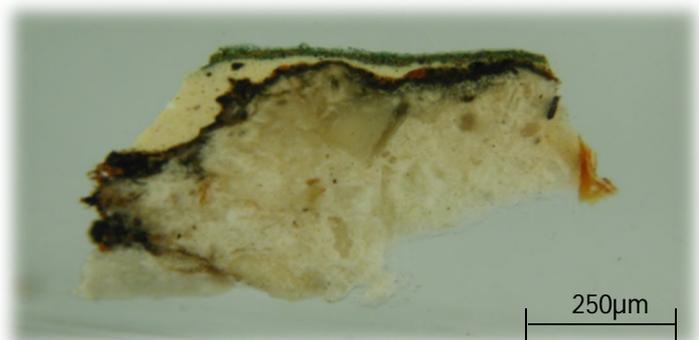


**12CA01070**

**a)** Microfoto del campione t.q. al microscopio ottico a 40x

**b)** Microfoto della sezione lucida al microscopio ottico in luce riflessa a 80x

Dal basso verso l'alto: strato nero a base probabilmente di nero carbone di origine vegetale; strato verde scuro contenente terra verde e nero carbone di origine vegetale insieme a piccole aggiunte di ocre gialla e ocre arancio.



**12CA02114**

**a)** Microfoto del campione t.q. al microscopio ottico a 40x

**b)** Microfoto della sezione lucida al microscopio ottico in luce riflessa a 80x

Dal basso verso l'alto: strato bruno-rossastro composto probabilmente da una miscela di nero carbone e ocre rossa; strato bianco-giallastro; strato verde a base probabilmente di ocre gialla, blu di Prussia e ossido di cromo verde.

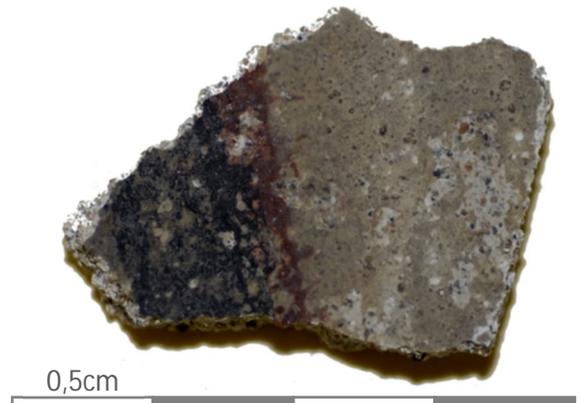


**12CA02115**

**a)** Microfoto del campione t.q. al microscopio ottico a 40x

**b)** Microfoto della sezione lucida al microscopio ottico in luce riflessa a 80x

Dal basso verso l'alto: stesura pittorica di colore giallo-aranciato dato dalla probabile presenza di ocre gialle e rosse; stesura pittorica gialla; strato bruno-chiaro; strato bruno-scuro; strato bianco; strato verde a base probabilmente di ocra gialla, blu di Prussia e ossido di cromo verde.



**FAT0836**

**FAT0857**



**FAT0922**

**FAT0926**

\* I campioni sopra descritti sono stati forniti dal laboratorio d'analisi C.S.G. Palladio. Si tratta di frammenti di intonaco dipinto e si compongono di una matrice carbonatica mista ad aggregati silicatici. Le foto sono state acquisite con Microscopio Ottico Polarizzatore (Nikon Alphaphot YS2), dotato di macchina fotografica (Nikon COOLPIX 990).

\*\* Si è mantenuta l' "etichetta" identificativa fornita ai campioni nel momento di accettazione all'interno dell'azienda

## **Parte sperimentale**

## **Capitolo V**

### **MATERIALI STRUMENTI E SOLVENTI UTILIZZATI**

## 1. MATERIALI STANDARD DI RIFERIMENTO

Standard di amminoacidi nativi in HCl 0,1M (Fluka, Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)

Composto	MOL. Wt	μMoles/mL	Stock No.
L-Alanina	89,09	2,50	Fluka® AA-S-18
L-Arginina	174,2	2,50	
L-Acido aspartico	133,1	2,50	
L-Cisteina	240,3	1,25	
L-Acido glutammico	147,1	2,50	
L-Glicina	75,07	2,50	
L-Istidina	155,2	2,50	
L-Isoleucina	131,2	2,50	
L-Leucina	131,2	2,50	
L-Lisina	146,2	2,50	
L-Metionina	149,2	2,50	
L-Fenilalanina	165,2	2,50	
L-Prolina	115,1	2,50	
L-Serina	105,1	2,50	
L-Treonina	119,1	2,50	
L-Tirosina	181,2	2,50	
L-Valina	117,2	2,50	

L-asparagina anidra	Sigma-Aldrich®
L-Glutammina	Sigma-Aldrich®
Trans-3-Hydroxy-L-Prolina	Sigma-Aldrich®
Trans-4-Hydroxy-L-Prolina	Sigma-Aldrich®

Standard di amminoacidi marcati al <sup>13</sup>C

Composto	Purezza	Fornitore
L-Alanina <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	98%	Sigma Aldrich®
L-Arginina <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	98%	Sigma Aldrich®
L-Acido aspartico <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	98%	Sigma Aldrich®
L-Acido glutammico <sup>13</sup> C <sub>5</sub>	98%	Sigma Aldrich®
L-Leucina <sup>13</sup> C <sub>1</sub>	≥ 98%	CIL
L-Fenilalanina <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	≥ 98%	CIL
L-Prolina <sup>13</sup> C <sub>1</sub>	≥ 98%	CIL
L-Valina <sup>13</sup> C <sub>1</sub>	≥ 98%	CIL

## 2.SOLVENTI E REAGENTI

- Acetonitrile (HPLC gradient PAI - ACS) (CH<sub>3</sub>CN) (Panreac)
- Acido Cloridrico fumante al 37% ACS (Fluka, Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)
- Acido Trifluoroacetico (TFA) (CF<sub>3</sub>COOH) (Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)
- Acqua Ultrapura (18,2 MΩ cm, 0,01 TOC)
- Acqua bidistillata (Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)
- Ammoniaca *Suprapur* 25% (NH<sub>3</sub>) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Gas Azoto, grado ricerche (SIAD, Bergamo, Italia)
- Gas Elio, grado ricerche
- L-Norleucina (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)
- Metanolo *Ultragradient* (Romil LTD, Cambridge, UK)
- N-metil-N-(t-butildimetilsilan)trifluoroacetammide (MTBSTFA)(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NOSi) (Fluka, Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)
- Piridina (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N) (Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)
- Trietilammina (TEA) (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N) (Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)

## 3. ATTREZZATURA DA LABORATORIO

- Inserti conici in vetro da 250 µl, con piedi in polipropilene, per vial in vetro (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Micropipette da 10, 100, 200, 1000 µl, con puntali sterili in polietilene (Eppendorf AG, Hamburg, Germania).
- Tappi in polipropilene *snap cap* con setto in PTFE/silicone, per vial in vetro (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Tappi in polipropilene, con rivestimento interno in PTFE, per vial in vetro per stoccaggio (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Vial ambrate in vetro da 2 ml, per autocampionatore (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Vial ambrate in vetro da 2, 4, 7 ml da stoccaggio (Agilent, Waldbronn, Germania).

- Vial a fondo conico da 1, 3 ml (Supelco)
- Agilent 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germania).
- API 4000 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada).
- Bilancia analitica a 5 cifre KERN ALT 220-4NM (KERN & Sohn GmbH, Bellinghen, Germania).
- Impianto di depurazione dell'acqua Purelab: Option-R pure water system accoppiato a Purelab Ultra Analytic ultra-pure water system (Elga Lab Water, High Wycombe, UK).
- R-8C Bench top centrifuge (REMI Laboratory Instruments)
- Sistema a microonde con tecnologia MDR, High Performance Microwave Digestion Unit MLS 1200 MEGA (Milestone Microwave Laboratory System), dotato di un modulo per l'evacuazione dei vapori Exhaust Module EM-45/A.
- Trace GC Ultra (Thermo scientific)
- ISQ (Thermo scientific)
- TR-5MS (5% fenil 95%metil-polisilossano) 0,25  $\mu\text{m}$ , 30m x 0,25mm (Thermo scientific)
- ZIC<sup>®</sup> - HILIC 3,5 $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm, 100 Å (SeQuant AB, Umeå, Sweden).
- ZIC<sup>®</sup> - HILIC Guard 5 $\mu\text{m}$ , 20 x 2,1 mm (SeQuant AB, Umeå, Sweden).

## **Capitolo VI**

# **METODOLOGIA ANALITICA**

La caratterizzazione del materiale proteico contenuto in un manufatto pittorico è effettuata generalmente mediante procedure analitiche che prevedono l'idrolisi delle proteine e determinazione degli amminoacidi mediante tecniche strumentali diverse. I paragrafi seguenti riportano i metodi proposti in letteratura per i vari stadi della procedura analitica.

## 1. INTERFERENZE DEI PIGMENTI NELLA DETERMINAZIONE DEGLI AMMINOACIDI

Nell'analisi del contenuto proteico in campioni di manufatti pittorici è necessario prendere in considerazione l'effetto dei pigmenti, costituiti in genere da sali inorganici, sulla reazione di derivatizzazione degli amminoacidi. Tali interferenze dipendono dal tipo di pigmento presente e dalla procedura di derivatizzazione utilizzata; in letteratura è stato riportato l'effetto interferente dei pigmenti contenenti calcio, ferro rame e piombo [COLOMBINI M.P. ET AL., 1999].

Il carbonato di **calcio** è il pigmento bianco più comune nella pittura murale, inoltre, in questo tipo di campioni, il calcio è spesso presente sotto forma di gesso, componente comune del substrato pittorico. Nella procedura basata sulla derivatizzazione con PITC (fenilisotiocianato) e determinazione mediante HPLC [RONCA F., 1994] [VALLANCE S.L. ET AL., 1997] la presenza di carbonato di calcio può causare una perdita fino al 100% degli amminoacidi asp e glu. I sali di calcio sono responsabili della bassa resa di reazione anche nella preparazione dei trifluoroacilmetil o butil-esteri degli amminoacidi [WHITE R., 1984][KENNDLER G. ET AL., 1992] e di una riduzione dei recuperi di acido aspartico, acido glutammico, prolina, idrossiprolina, tirosina dell'80% quando questi vengono derivatizzati con MTBSTFA [WHITE R., 1984].

I sali di **ferro** sono presenti in un'ampia varietà di pigmenti utilizzati fin dai tempi antichissimi: le Ocre e le Terre naturali. Questi sali causano gravi interferenze nella derivatizzazione con etilcloroformiato di serina, acido aspartico, acido glutammico, treonina, in campioni provenienti da stesure a base di colla animale [SHILLING M.R. ET AL., 1996]. I sali di ferro impediscono la completa derivatizzazione anche nel caso della trasformazione degli amminoacidi in N-trifluoroacil-metilesteri [WHITE R., 1984] o trifluoroacil-butil esteri [KENNDLER G. ET AL., 1992]. La presenza di pigmenti contenenti ferro nel film pittorico compromette inoltre la determinazione degli amminoacidi derivatizzati con MTBSTFA [COLOMBINI M.P. ET AL., 1996].

Il **rame** è contenuto nei principali pigmenti verdi e azzurri utilizzati nella pittura murale (Malachite, Azzurrite, Verdigris). E' stato riportato che la presenza di  $\text{Cu}^{2+}$  nell'idrolizzato riduce sensibilmente la resa di reazione sia nel caso in cui la reazione di derivatizzazione venga effettuata con PITC [HALPINE S.M., 1995] che con 9-fluorenil-metil-cloroformiato [VALLANCE S.L. ET AL, 1997]. In quest'ultimo caso è stata proposta l'aggiunta di EDTA prima dell'idrolisi per impedire la formazione di complessi chelati del rame con gli amminoacidi. Ciò richiede però un aggiustamento del pH dell'idrolizzato, operazione che implica l'aggiunta ulteriore di altri reagenti. I sali di rame interferiscono anche nella derivatizzazione degli amminoacidi con etilcloroformiato [SHILLING M.R. ET AL, 1996].

Gli autori concludono che la presenza di qualsiasi sale metallico rende in generale inaffidabile la quantificazione degli amminoacidi contenenti gruppi funzionali acidi (asp, glu), basici (lys), idrossilici (ser, hyp), solfidrici (met) e aromatici (phe), a causa di un abbassamento della resa di derivatizzazione dovuto alle interazioni fra tali gruppi funzionali e i cationi metallici.

Un altro gruppo di pigmenti particolarmente comuni in pittura murale è costituito dai sali di **piombo**, ma l'interazione del piombo con gli amminoacidi dovrebbe essere di limitata entità. Infatti è importante ricordare che durante l'idrolisi acida l'alta concentrazione di  $\text{Cl}^-$  porta alla precipitazione di  $\text{PbCl}_2$  [KENNDLER G. ET AL., 1992], abbassando la concentrazione del piombo fino a rendere trascurabile la sua interazione con gli amminoacidi.

Tra le soluzioni proposte in letteratura per eliminare o, almeno, ridurre, tali interferenze, i metodi più comuni sono due:

- eliminazione dei sali organici mediante resine a scambio ionico;
- estrazione selettiva del materiale proteico dalla matrice pittorica mediante soluzioni basiche.

## 2. IDROLISI DEL MATERIALE PROTEICO

Da un punto di vista generale, l'idrolisi dei legami peptidici può essere condotta in due modi: idrolisi enzimatica [HILL L., 1965] e idrolisi acida [GEHRKE C.W. ET AL., 1987]. La prima richiede tempi di reazione piuttosto lunghi (4-8 h) e non è adatta a campioni solidi, mentre la seconda può essere utilizzata per qualsiasi campione e, in condizioni opportune, può essere condotta in tempi molto più brevi. Per questi motivi l'idrolisi con HCl, sia in fase liquida che in fase vapore, è la tecnica più comunemente adottata, anche per campioni provenienti da opere d'arte.

I fattori più importanti che determinano l'efficienza di idrolisi acida sono:

- la concentrazione dell'acido;
- il tempo e la temperatura di idrolisi, che vanno regolati in modo da evitare eventuali reazioni di degradazione di alcuni amminoacidi;
- l'ossigeno, la cui presenza può causare reazioni indesiderate di ossidazione di alcuni amminoacidi;
- i carboidrati eventualmente presenti nel campione, i cui gruppi carbonilici possono dare luogo a reazioni di condensazione con gli amminoacidi (reazione di Maillard) con formazione di prodotti di condensazione di colore scuro dette umine [KARPOWICZ A., 1981].

Le condizioni di idrolisi acida comunemente utilizzate [WHITE R., 1984] sia in fase liquida che in fase vapore prevedono l'utilizzo di HCl 6M a temperature fino a 160° per tempi di reazione lunghi (24-78 ore), necessari per rompere i legami peptidici più stabili: ile-ile, val-val, ala-ala, ile-ala. Condizioni di reazione così drastiche determinano la completa conversione di asparagina e glutammina rispettivamente in acido aspartico e acido glutammico, e la progressiva e differenziata degradazione di altri amminoacidi in funzione del tempo di idrolisi. Tale degradazione è causata da reazioni di ossidazione e le corrispondenti perdite in amminoacidi dipendono fortemente dal tipo e dalla quantità di campione. L'aumento della temperatura da 110°C, temperatura di ebollizione dell'azeotropo HCl 6M, a 145°C consente di ridurre i tempi di idrolisi, ma non le perdite per alcuni amminoacidi.

Come alternativa all'idrolisi acida classica è stata proposta una metodologia di idrolisi catalizzata da una resina di scambio ionico in forma acida, effettuata sospendendo il campione solido, assieme ad uno scambiatore ionico, in una miscela EtOH-H<sub>2</sub>O (80/20%) [KENNDLER G. ET AL., 1992]; la reazione avviene in fase eterogenea senza bisogno di aggiungere acido ed al termine di 24 ore di riscaldamento a 110°C gli amminoacidi in forma ionica acida sono adsorbiti sulla resina e possono essere recuperati eluendo con NH<sub>3</sub> 7M. rispetto all'idrolisi classica in fase liquida questo

procedimento non sembra rappresentare un miglioramento evidente in quanto il tempo di idrolisi rimane ancora molto lungo ed, in pratica, i risultati ottenuti sono equivalenti. L'unico vantaggio di tale procedura è rappresentato dalla possibilità di ottenere una soluzione di aminoacidi purificata.

Un miglioramento decisivo delle prestazioni dell'idrolisi acida in fase vapore è stato ottenuto effettuando la stessa con HCl 6M in forno a microonde in assenza di ossigeno [COLOMBINI M.P. ET AL., 1996] a 8 atmosfere e 160°C. La potenza erogata dalle microonde permette di effettuare l'idrolisi in meno di un'ora limitando le perdite degli aminoacidi per ossidazione o degradazione causata dai tempi di reazione lunghi necessari per l'idrolisi classica. In conclusione, il metodo di idrolisi acida in fase vapore in combinazione con la tecnologia a microonde risulta essere il più vantaggioso sia in termine di tempo che di risultato.

### 3. TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

La procedura pre-analitica per la determinazione della composizione aminoacidica prevede estrazione in soluzione ammoniacale in ultrasuoni, purificazione con l'utilizzo di puntali Omix, idrolisi acida in fase vapore assistita da microonde e derivatizzazione con N-metil-N-(t-butildimetilsilan)trifluoroacetammide (MTBSTFA) del campione (figura 6.1).

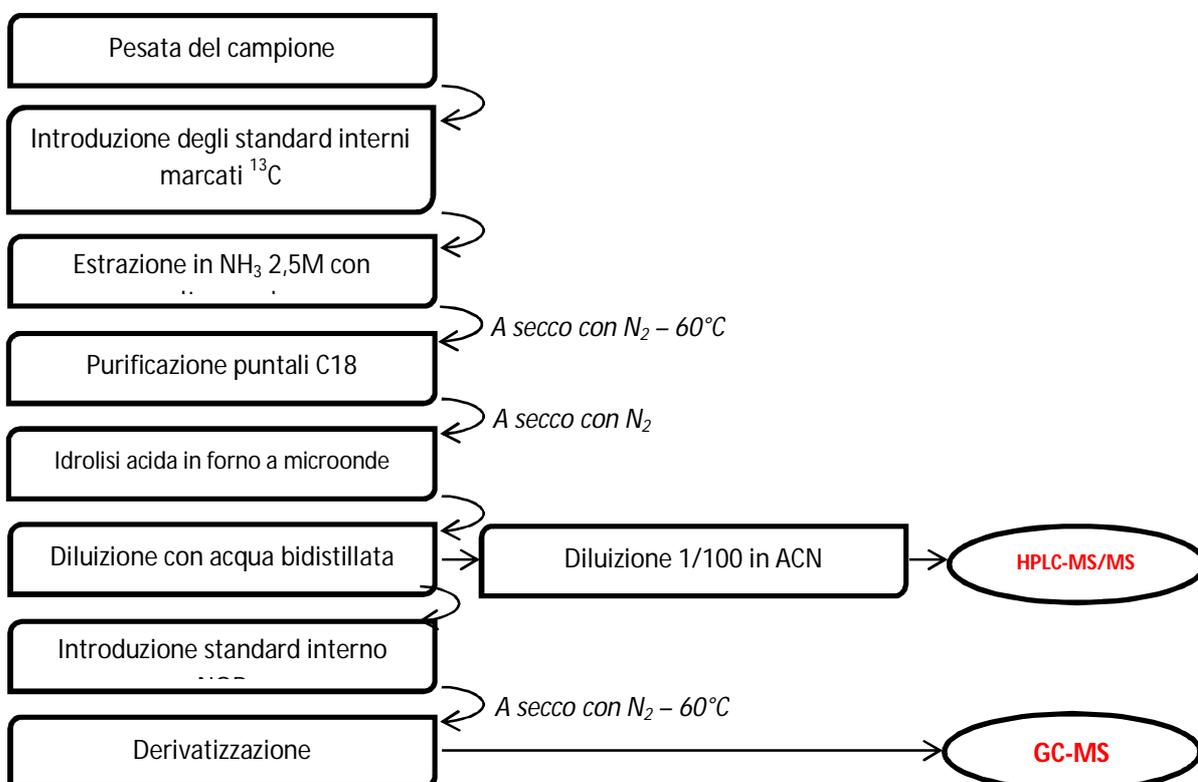


Figura 6.1: schema di preparazione del campione per l'analisi degli aminoacidi.

### 3.1 Estrazione selettiva delle proteine dal campione e purificazione

Una piccola quantità di ogni campione (circa 10mg per i campioni prodotti in laboratorio e circa 1mg per i campioni reali) è stata trattata due volte con volumi di 200µl di NH<sub>3</sub> 2,5M per 2 ore in ultrasuoni a 60°C. Il liquido, separato dal residuo solido, è stato poi portato a secco sotto debole flusso di N<sub>2</sub> in modo da eliminare completamente l'ammoniaca e miscelato con 100µl di una soluzione di acido trifluoroacetico (TFA) 1%.

I puntali C18 sono stati pre-condizionati con una soluzione di acetonitrile (ACN) 50% prima, di acido trifluoroacetico (TFA) 0,1% poi. Dopo il condizionamento la soluzione campione è stata caricata sulla parte terminale del puntale C18. I residui contaminanti che potrebbero risultare debolmente legati al materiale assorbente sono stati successivamente lavati con una soluzione acquosa debolmente acida (0,1% TFA). [GAUTIER G. ET AL., 2007]. Infine il materiale proteico è stato eluito in un vial a fondo conico servendosi di una soluzione di acetonitrile 75% (figura 6.2).

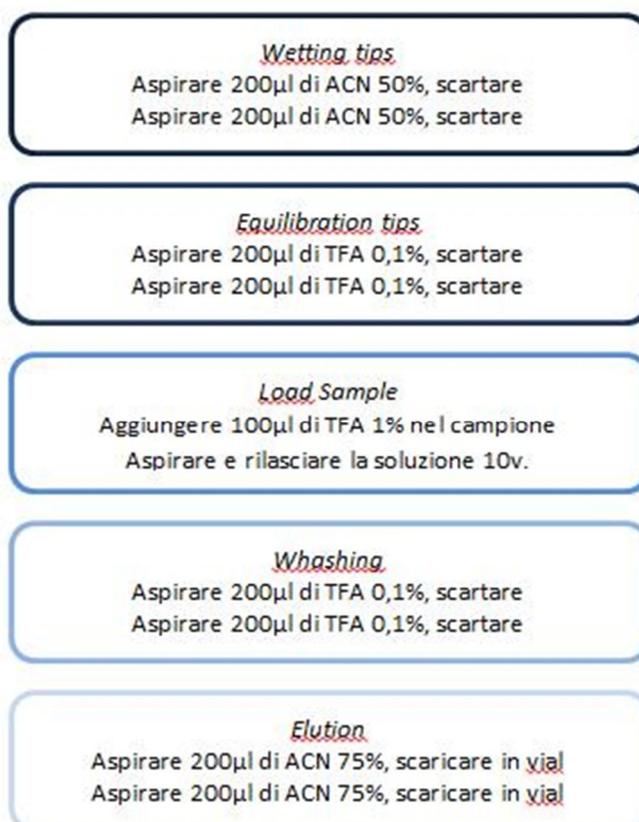


Figura 6.2: schema di utilizzo dei puntali OMIX

### 3.2 Idrolisi acida in fase vapore assistita da microonde

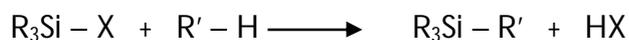
I campioni, dopo esser stati trasferiti in fiale da 1ml sono stati nuovamente portati a secco sotto debole flusso di N<sub>2</sub>, successivamente bagnati con due gocce di HCl 6M per evitarne la carbonizzazione e collocati, sei per volta, in un contenitore chiuso in teflon al cui interno si versano 50ml di HCl 6M il quale a sua volta viene inserito in un blocco rotore di polipropilene sistemato all'interno del forno e dotato di un sistema per l'evacuazione dell'aria e l'immissione di azoto e di due sensori per il monitoraggio di pressione e temperatura [COLOMBINI M.P., 1996].

Le condizioni operative sono le seguenti: 10 minuti a 250W e 160°C per raggiungere la temperatura di esercizio, 30 minuti a 500W e 160°C e infine 15 minuti di ventilazione per il raffreddamento. Prima dell'apertura dei contenitori è opportuno aspettare che i valori di T e p abbiano raggiunto i normali valori ambientali. All'idrolizzato sono stati dunque aggiunti 300µl di acqua bidistillata.

### 3.3 Derivatizzazione degli amminoacidi con MTBSTFA

Il derivatizzante utilizzato, l'N-metil-N-(t-butildimetilsilan)trifluoroacetammide (MTBSTFA), trasforma gli amminoacidi nei derivati del N(O)-terziar-butildimetilsilano (tBDMSi) (figura 6.3).

L'MTBSTFA è un ottimo silanizzante per tutti i gruppi protici attivi (ossidrili, carbossili, ammine e tioli), con i quali avviene la seguente reazione:



Tale reazione è determinata dall'attacco nucleofilo dell'eteroatomo più elettronegativo sul silicio ed affinché avvenga è necessario che R' abbia basicità maggiore di X, che non ci siano impedimenti sterici in modo da favorire l'attacco nucleofilo e che la reazione porti ad un complesso stabile. La trifluoroacetammide soddisfa tutti questi requisiti.

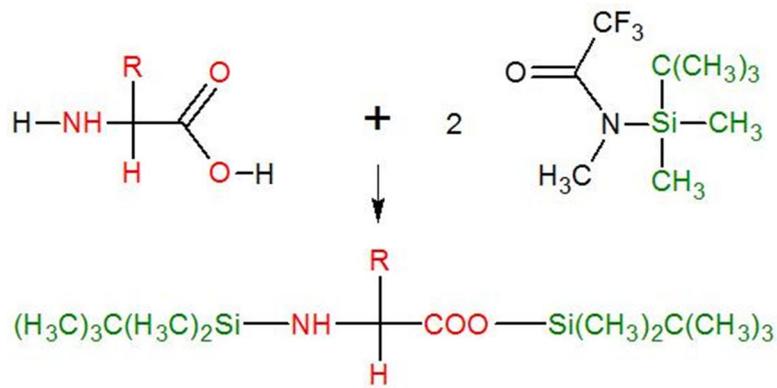


Figura 6.3: schema della reazione del MTBSTFA con gli aminoacidi

A tutti i campioni viene aggiunta una quantità nota di norleucina (NOR) (standard interno) che viene derivatizzata insieme agli aminoacidi e consente di normalizzare i risultati rispetto ad eventuali variazioni della resa di derivatizzazione. 5µl di NOR sono aggiunti ad un'aliquota di idrolizzato aminoacidico (150µl), si porta poi a secco scaldando a 60°C sotto un leggero flusso di N<sub>2</sub>. Sono aggiunti in seguito rispettivamente: 40µl di piridina (PYR), 20µl di MTBSTFA, 2µl di trietilammina (TEA). La soluzione viene fatta reagire a bagnomaria a 60°C per 30 minuti (figura 6.4).

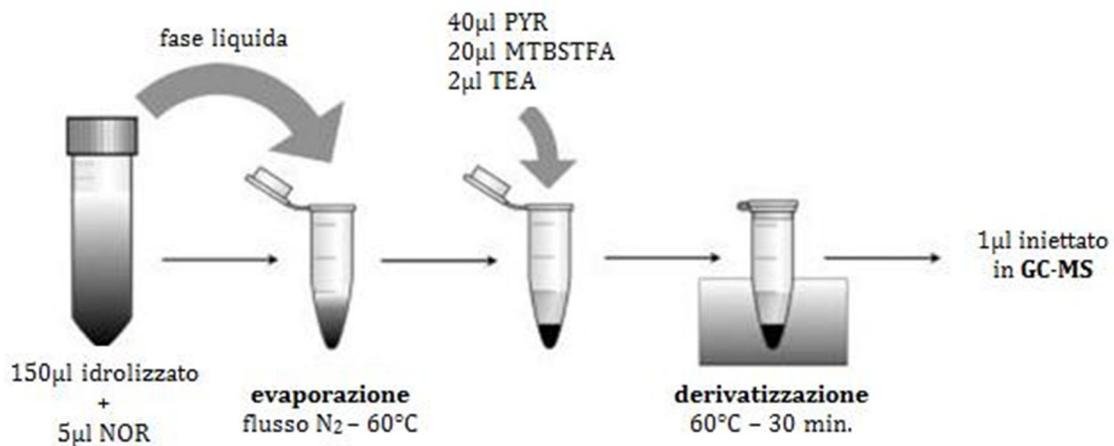


Figura 6.4: schema di derivatizzazione degli aminoacidi

Nelle condizioni riportate sopra si ottiene una derivatizzazione non quantitativa per treonina, arginina e istidina aminoacidi che peraltro non sono essenziali per il riconoscimento dei leganti proteici. La tert-butildimetilsilanizzazione della treonina è incompleta anche dopo 2 ore di attesa dall'aggiunta dei reattivi, a causa delle difficoltà d'inserimento di due gruppi tBDMS sulle funzionalità amminica ed idrossilica di questo aminoacido. La reazione che coinvolge l'arginina porta alla formazione parziale di due derivati e rese quantitative potrebbero essere ottenute solo a temperature di derivatizzazione intorno ai 150°C, il che causerebbe la decomposizione degli altri derivati. Infine, la bassa resa in istidina potrebbe essere imputata alla presenza del gruppo  $\beta$ -imidazolico che, una volta silanizzato, agirebbe come silanizzante.

A causa della relativa instabilità dei derivati silanizzati, il campione dopo derivatizzazione deve essere conservato a 4°C ed analizzato entro 3-4 ore [U. BARTOLUCCI, 2004].

#### 4. PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI IMPIEGATE

Le soluzioni madri degli standard marcati  $^{13}\text{C}$  e di alcuni nativi quali 3-idrossiprolina e 4-idrossiprolina sono state preparate sciogliendo gli aminoacidi solidi (circa 0,010 g) in una soluzione 0,1 M di HCl. Il mix degli standard marcati è stato ottenuto poi prelevando da ciascuna soluzione madre degli standard marcati tra 40 e 200  $\mu\text{L}$  che sono poi stati diluiti in 20 mL di HCl 0,1 M.

Tabella 6.1: concentrazioni relative alle soluzioni madre, alla soluzione mix e a quella utilizzata per il calcolo di FR degli standard interni marcati riportate per ogni singolo composto

<b>Analita</b>	<b>[C] soluz. madre (ng/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b><math>\mu\text{l}</math> di madre</b>	<b>[C] mix marcati (ng/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>FR (ng/<math>\mu\text{l}</math>)</b>
Ala $^{13}\text{C}_3$	4900	40	9,80	2,45
Arg $^{13}\text{C}_6$	4855	200	48,55	12,14
Asp $^{13}\text{C}_4$	5235	200	52,35	13,09
Glu $^{13}\text{C}_5$	4710	100	23,55	5,89
Leu $^{13}\text{C}$	5190	40	10,38	2,60
Phe $^{13}\text{C}$	4600	40	9,20	2,30
Pro $^{13}\text{C}$	6200	200	62,00	15,50
Val $^{13}\text{C}$	6080	40	12,16	3,04

La soluzione "Spike" impiegata nella validazione del metodo è stata ottenuta a partire da 700 µL della soluzione standard "Fluka", cui sono stati aggiunti 50 µL di 3-idrossiprolina e 50 µL di 4-idrossiprolina (preparate come sopra descritto); il tutto è stato portato a volume di 2 mL.

Tabella 6.2: concentrazioni relative alla soluzione degli "spike" e a quella utilizzata per il calcolo di FR degli amminoacidi nativi riportate per ogni singolo composto

<b>Analita</b>	<b>[C] spike (ng/µl)</b>	<b>FR(ng/µl)</b>
Ala	77,96	3,90
Arg	152,43	7,62
Asp	116,46	5,82
Cys	53,01	2,65
Glu	128,74	6,44
Gly	65,69	3,28
His	135,77	6,79
Ile	114,78	5,74
Leu	114,78	5,74
Lys	127,91	6,40
Met	130,56	6,53
Phe	144,54	7,23
Pro	100,74	5,04
Ser	91,96	4,60
Thr	104,23	5,21
Tyr	158,54	7,93
Val	102,51	5,13
3-Hyp	138,75	6,94
4-Hyp	121,38	6,07

Nelle tabelle proposte (tabella 6.1; tabella 6.2) sono riportate le concentrazioni (ng/µl) anche della soluzione per il calcolo del fattore di risposta che è stata preparata a partire da 50 µL della soluzione "Spike" e 250 µL della soluzione degli standard interni marcati diluiti ad 1 mL in HCl 0,1M. Tale soluzione è stata diluita 1/100 in ACN prima dell'iniezione.

## **Capitolo VII**

### **L'ANALISI STRUMENTALE**

## 1. LA MESSA A PUNTO E L'OTTIMIZZAZIONE DEL METODO STRUMENTALE GC-MS

Lo strumento adottato è il gascromatografo Trace CG Ultra (Thermo Scientific) interfacciato con uno spettrometro di massa ISQ (Thermo Scientific) dotato di analizzatore a quadrupolo. Per la separazione cromatografica degli analiti è stata impiegata una colonna capillare in silice fusa TR-5MS (Thermo Scientific) 5% fenil 95%metil-polisilossano della lunghezza di 30 metri, diametro interno di 0,25mm e di spessore del film 0,25 $\mu$ m.

Nell'analisi GC/MS sono state ottimizzate sia le condizioni di gascromatografia sia di spettrometria di massa.

L'elio è stato utilizzato quale gas di trasporto (purezza 99,995%) a flusso costante 1,2ml/min.

Le temperature a cui sono stati portati iniettore e transfer line sono rispettivamente di 100°C e 280°C.

Il campione (1 $\mu$ l), introdotto in colonna mediante iniezione splitless, ha previsto la seguente programmata di temperatura: 100°C per 2 minuti, 4°C/min fino a 280°C, poi 280°C per 15 minuti.

Il tempo della corsa cromatografica è stato suddiviso in undici finestre temporali (segmenti) al fine di migliorare il segnale relativo a ciascun analita. Per l'impostazione delle diverse finestre temporali è stato iniettato 1 $\mu$ l di soluzione mix di amminoacidi nativi previa derivatizzazione con MTBSTFA per valutare i loro tempi di ritenzione. Gli spettri di massa per la caratterizzazione di tutti gli analiti sono stati registrati in modalità *full-scan* (range m/z 50-550) (figura 7.1; tabella 7.1).

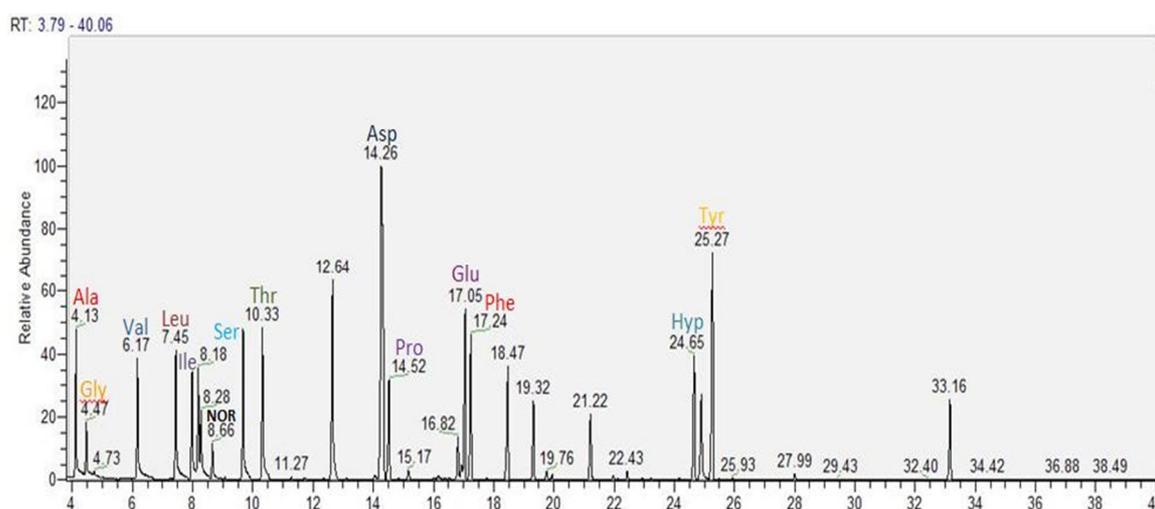
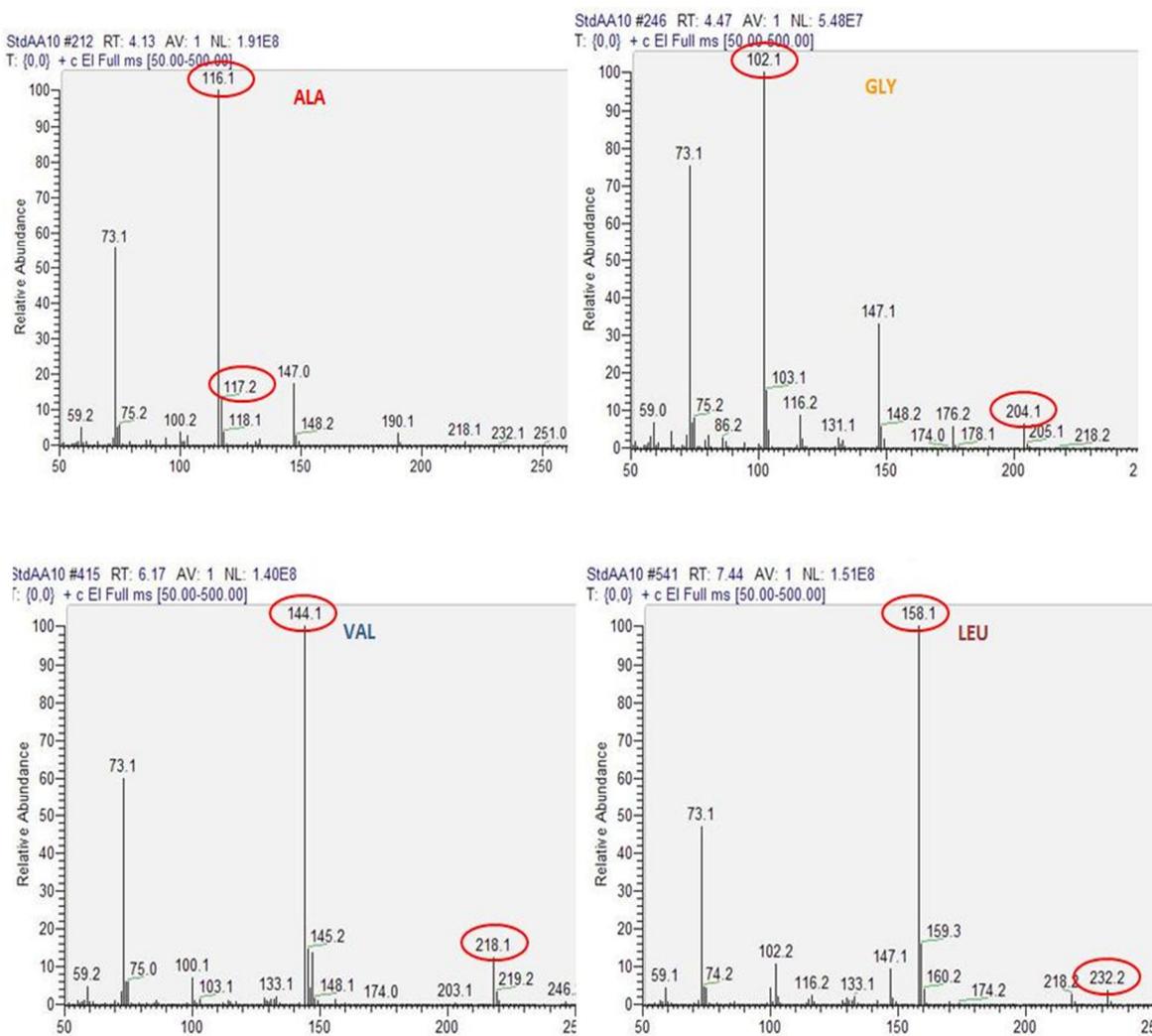


Figura 7.1: cromatogramma in TIC relativo alla soluzione standard di amminoacidi nativi

Tabella 7.1: descrizione del metodo ottimizzato a finestre

segmento	analita	tempo (min)
seg. I	Ala	3.75 - 4.30
seg. II	Gli	4.31 - 5.50
seg. III	Val	5.51 - 6.90
seg. IV	Ile;Leu;Nor	6.91 - 9.40
seg. V	Ser	9.41 - 10.10
seg. VI	Asp	10.11 - 14.42
seg. VII	Pro	14.43 - 16.80
seg. VIII	Glu	16.81 - 17.15
seg. IX	Phe	17.16 - 18.20
seg. X	Hyp	18.21 - 24.70
seg. XI	Tyr	24.71 - 26.00

Per l'analisi quantitativa degli amminoacidi gli spettri di massa sono stati registrati in modalità *single ion monitoring* acquisendo i valori di m/z riportati in tabella 7.2.



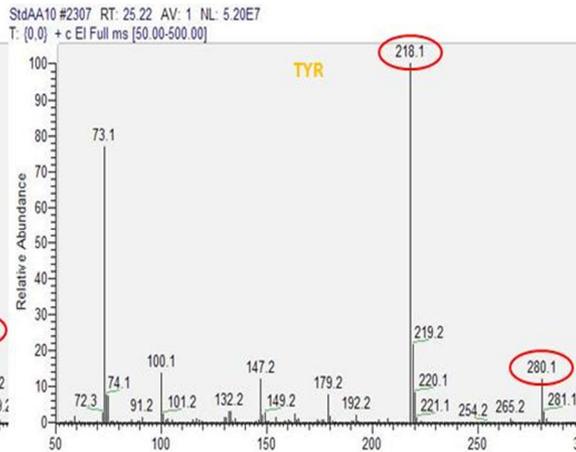
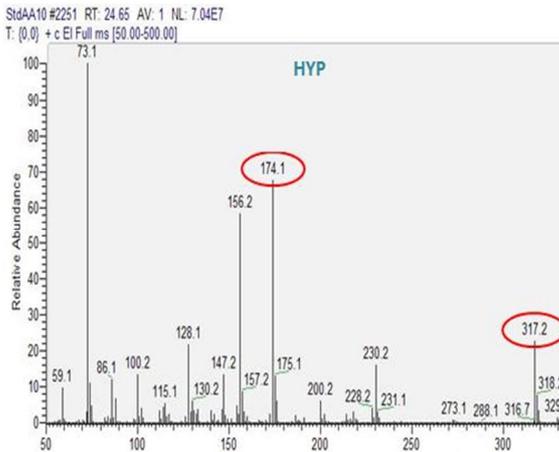
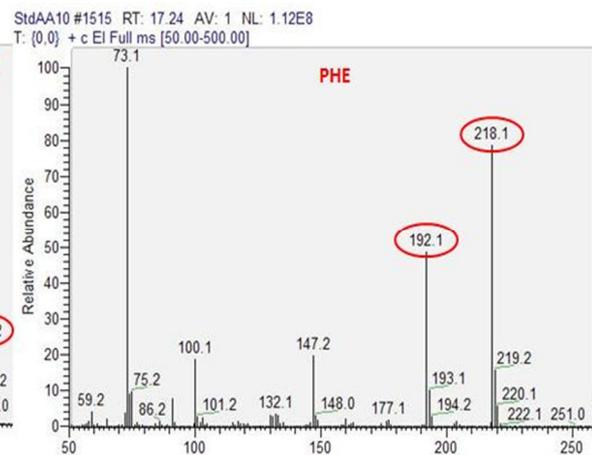
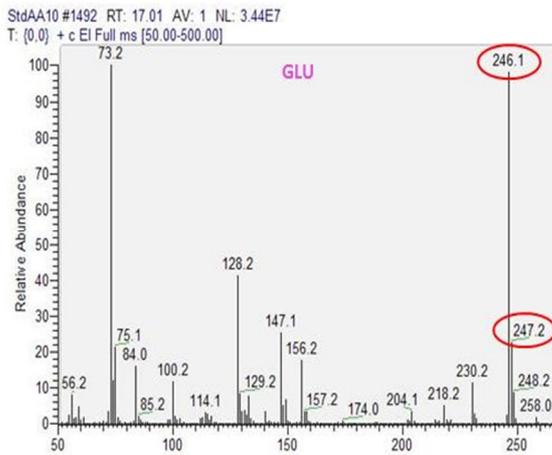
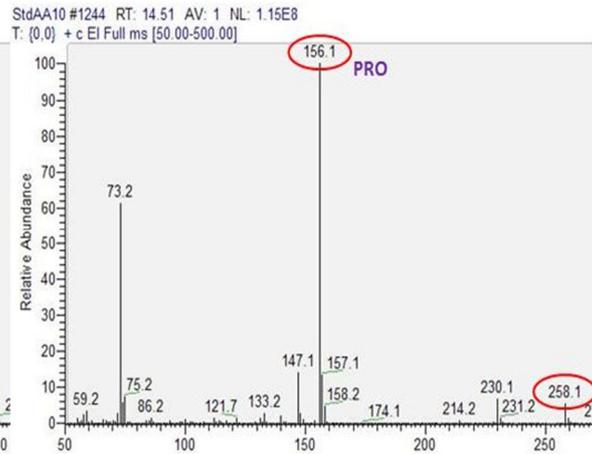
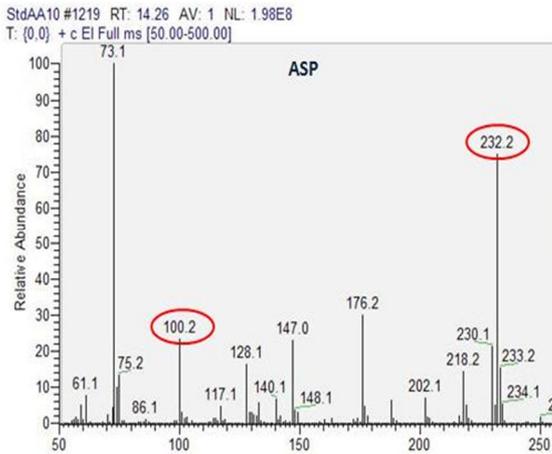
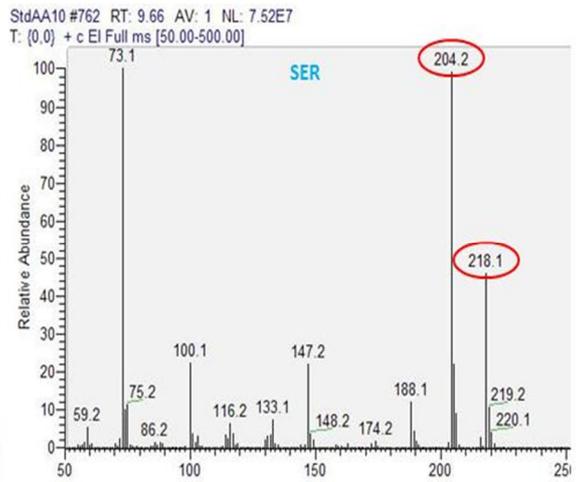
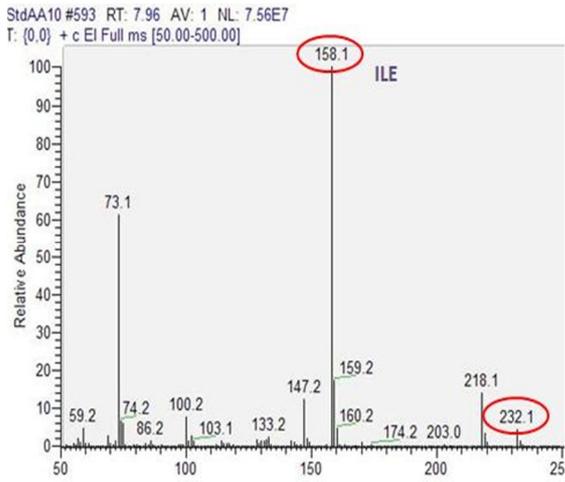


Tabella 7.2: parametri di acquisizione: scansione di ioni selezionati (SIM)

<b>analita</b>	<b>SIM (m/z)</b>
Ala	116 , 117
Gli	102 , 204
Val	144 , 218
Leu;Ile;Nor	158 , 232
Ser	204 , 218
Asp	100 , 232
Pro	156 , 258
Glu	246 , 247
Phe	192 , 218
Hyp	174 , 317
Tyr	218 , 280

## 2. LA MESSA A PUNTO E L'OTTIMIZZAZIONE DEL METODO STRUMENTALE HPLC-MS/MS

L'analisi cromatografica è stata eseguita utilizzando un cromatografo liquido Agilent 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germania), dotato di pompa binaria, degasser, autocampionatore e vano colonna termostato. La determinazione degli analiti è avvenuta utilizzando uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada), dotato di una sorgente Turbo V utilizzata in *Turbo Ion Spray* (TIS). La sorgente di ionizzazione è stata impiegata in modalità positiva per la ionizzazione di tutti gli analiti e degli standard marcati  $^{13}\text{C}$  considerati, per i quali si ha la formazione di specie ioniche del tipo  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna ZIC-HILIC 2,1 × 150 mm (SeQuant AB, Umeå, Sweden), alla quale è stata applicata una colonna di guardia avente la stessa fase stazionaria della colonna analitica (colonna di guardia ZIC-HILIC Guard 5µm, 20 × 2,1 mm, SeQuant AB, Umeå, Sweden).

Il flusso dell'eluente è 150 µL min<sup>-1</sup>. Come solvente "A" è stato impiegato un tampone di acetato d'ammonio portato a pH 4 e come solvente "B" si è utilizzato acetonitrile acidificato con acido formico al 10% in H<sub>2</sub>O (tabella 7.3). Il volume di iniezione del campione è 5 µL.

Tabella 7.3: descrizione della corsa cromatografica impiegata

Tempo (min)	Regime di flusso (min <sup>-1</sup> )	( $\mu$ L NH <sub>4</sub> COOH 5mM in H <sub>2</sub> O-pH 4 (%))	ACN + Acido Formico 10% (%)
0.00	150	15,0	85,0
30.00	150	47,0	53,0
32.00	150	80,0	20,0
37.00	150	80,0	20,0
39.00	150	15,0	85,0
55.00	150	15,0	85,0

L'acquisizione dei dati è avvenuta in modalità *Multiple Reaction Monitoring*, con dwell time/trasmissione di 200 ms. Gli spettri di frammentazione degli ioni genitori ottenuti dagli analiti in esame sono stati registrati in modalità di acquisizione *Product Ion Scan* al fine di individuare i frammenti più intensi e significativi.

Il tempo della corsa cromatografica è stato suddiviso in cinque finestre temporali (segmenti), in ciascuna delle quali sono stati individuati i parametri ottimali per massimizzare il segnale relativo a ciascun analita (tabella 7.4).

Tabella 7.4: descrizione del metodo ottimizzato a finestre

segmento	analita
seg. I	Gly; Phe; Phe*; Thr; Leu; Leu*; Ile; Met
seg. II	Tyr; Val; Val*; 3-Hyp; Pro; Pro*
seg. III	4-Hyp; Ala; Glu; Gln; Ser; Asn
seg. IV	Asp; Asp*; Cys
seg. V	Arg; Arg*; Hys; Lys

## **Capitolo VIII**

### **RISULTATI E DISCUSSIONI**

## 1. LA VALIDAZIONE DEL METODO

La validazione del metodo è stata eseguita mediante la stima dell'accuratezza (Resa media %) e della precisione (RSD %) della risposta strumentale. In mancanza di un materiale di riferimento certificato, per la validazione del metodo è stata considerata una matrice simile a quella murale in esame, preparata a partire da un impasto di tipo misto carbonatico – silicatico.

Per effettuare la valutazione del bianco in HPLC-MS/MS le concentrazioni degli amminoacidi considerati nel metodo strumentale sono state analizzate aggiungendo alla matrice murale (0,010 g) una quantità nota (250 µl) della miscela di amminoacidi marcati isotopicamente. La stima dell'accuratezza è stata effettuata aggiungendo alla matrice (0,010 g) 250 µl della soluzione degli amminoacidi marcati (standard interno per HPLC-MS/MS) e 50 µl della soluzione degli Spike (amminoacidi nativi). In seguito si è proceduto rispettivamente con le fasi di estrazione, purificazione, idrolisi e infine con la diluizione 1/100 in ACN e l'analisi strumentale. Per la quantificazione in GC-MS in fase di derivatizzazione sono stati aggiunti 5 µl di Norleucina (standard interno).

In tabella (tabella 8.1) vengono riportati i risultati ottenuti dall'analisi GC-MS.

	Resa media %	RSD%	LOD (ug/g)[n=5]	LOQ (ug/g)[n=5]
Ala	80	6	0,021	0,033
Gly	58	13	0,022	0,038
Val	66	24	0,030	0,050
Leu	63	7	0,070	0,117
Ile	65	3	0,021	0,037
Ser	43	8	0,052	0,093
Asp	38	12	0,038	0,055
Pro	15	20	0,008	0,016
Glu	31	17	0,042	0,066
Phe	33	8	0,001	0,002
Hyp	36	3	0,020	0,046

Tabella 8.1: resa media %, RSD %, LOD e LOQ associati alla preparazione ed alla misura dei campioni

Si può osservare che i valori di accuratezza sono accettabili per analiti che presentano resa media % superiore al 60% quali alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina. Si nota un recupero piuttosto scarso per la prolina in quanto il valore si attesta al 15%.

Per quanto riguarda la ripetibilità della misura, si riscontrano buoni valori per la maggior parte dei composti, fatta eccezione per valina, prolina, acido glutammico che presentano valori di RSD%, rispettivamente, di: 24 %, 20 %, 17 %.

Non è stato possibile validare il metodo in HPLC-MS/MS in quanto in fase di messa a punto del metodo cromatografico si è riscontrata irripetibilità del tempo di ritenzione degli analiti dovuta a degradazione molto veloce della fase stazionaria. Degradazione dovuta probabilmente alla metodologia di trattamento del campione che ha portato alla formazione di specie che hanno contribuito in questo senso e che producevano scariche nella sorgente ESI.

E' interessante paragonare i dati ottenuti dall'analisi con GC-MS con quelli derivanti da uno studio recente di determinazione degli amminoacidi contenuti nei leganti a base proteica utilizzati nella pittura a tempera [ZANGRANDO R. ET AL., 2010] Come riportato in letteratura la fase pre-analitica è ridotta rispetto a quella adottata nel presente lavoro e non prevede le preliminari fasi di estrazione e purificazione ma il campione viene sottoposto solo ad idrolisi acida prima di essere analizzato. Si riporta di seguito il procedimento in tutti i suoi passaggi (figura 8.1).

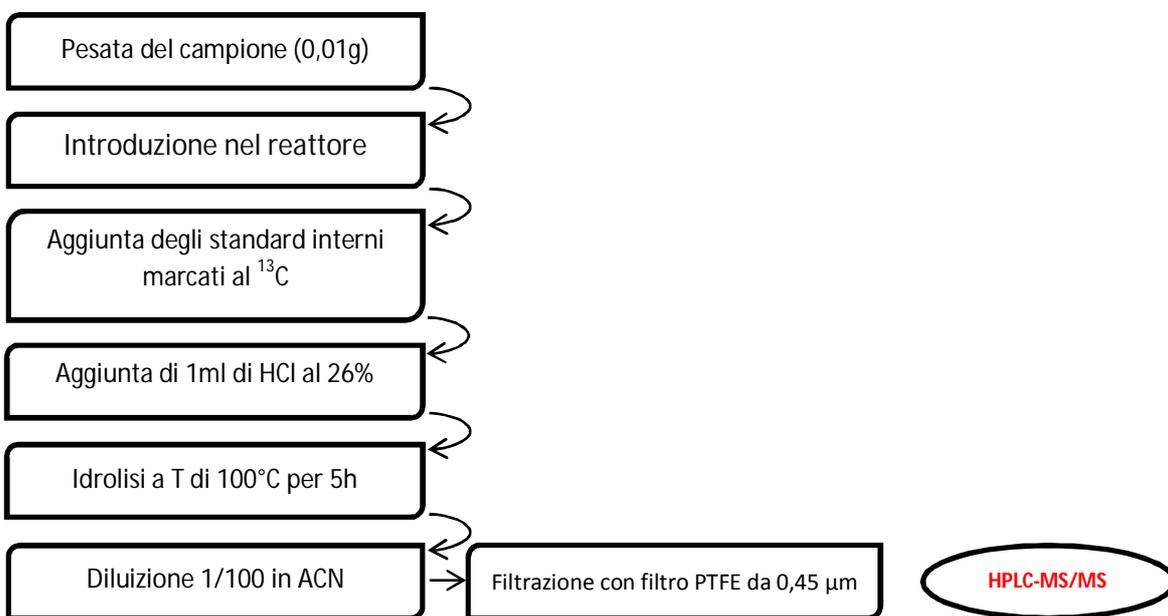


Figura 8.1: schema di preparazione del campione per l'analisi degli amminoacidi mediante HPLC-MS/MS

Si riportano inoltre in tabella i valori ottenuti per la validazione del metodo, resa% e RSD% significativi per valutare rispettivamente accuratezza e precisione della risposta strumentale

(tabella 8.2). Si tenga presente che le analisi sono state condotte con lo stesso apparato strumentale adottato nella presente trattazione.

	<b>Resa%</b>	<b>RSD%</b>
Ala	99	6
Arg	115	19
Asp	99	14
Glu	101	2
Cys	68	6
Phe	95	1
3-Hyp	96	2
4-Hyp	94	3
Ile	101	5
Hys	45	3
Leu	94	2
Lys	40	1
Met	2	73
Pro	85	5
Ser	107	17
Tyr	105	5
Thr	118	11
Val	109	6

Tabella 8.2: resa %, RSD %, associati alla preparazione ed alla misura dei campioni

Gli aspetti più evidenti sono sicuramente il maggior numero di composti analizzati e i valori di resa% più elevati per tutti gli analiti tra i quali è possibile fare un confronto.

Anche per quanto riguarda la ripetibilità della misura, si riscontrano buoni valori di RSD% fatta eccezione per metionina, serina ed arginina, che sono stati esclusi a priori dal nostro metodo e per l'acido aspartico con RSD% dell'11% che risulta paragonabile al valore da noi ottenuto.

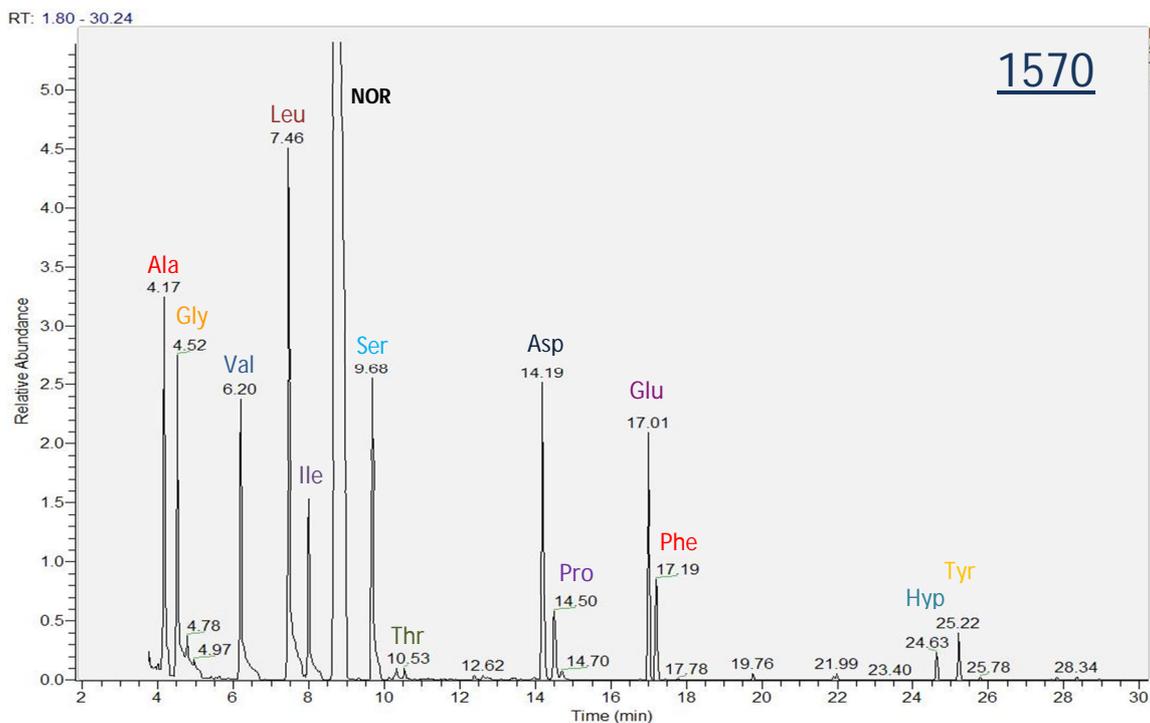
## 2. RISULTATI E DISCUSSIONI SULL'ANALISI GC-MS DEI CAMPIONI REALI

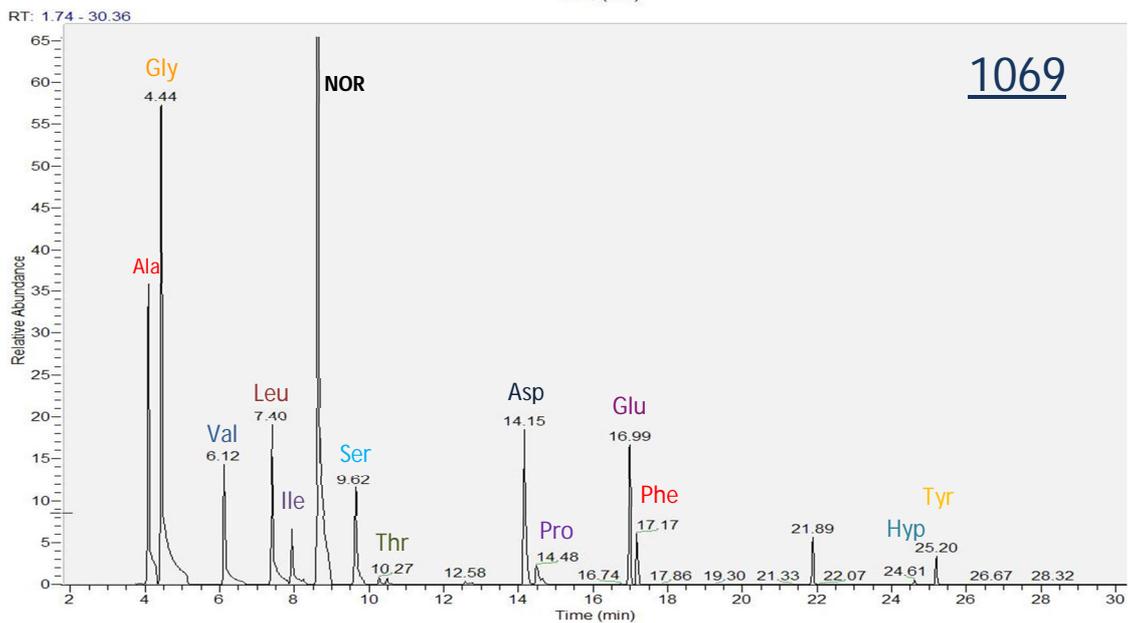
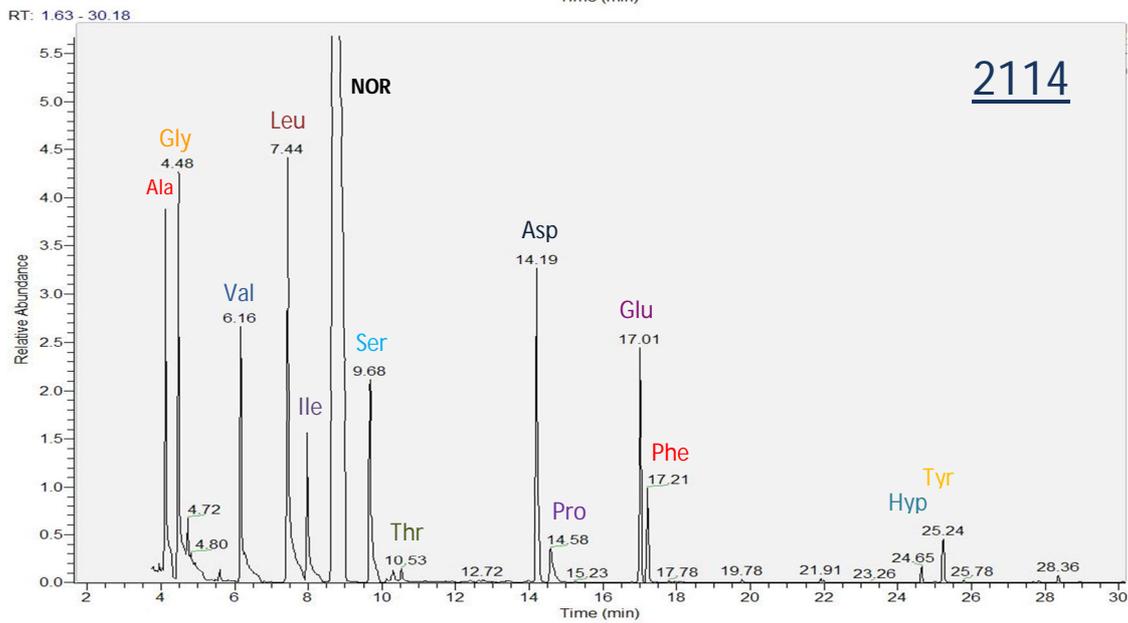
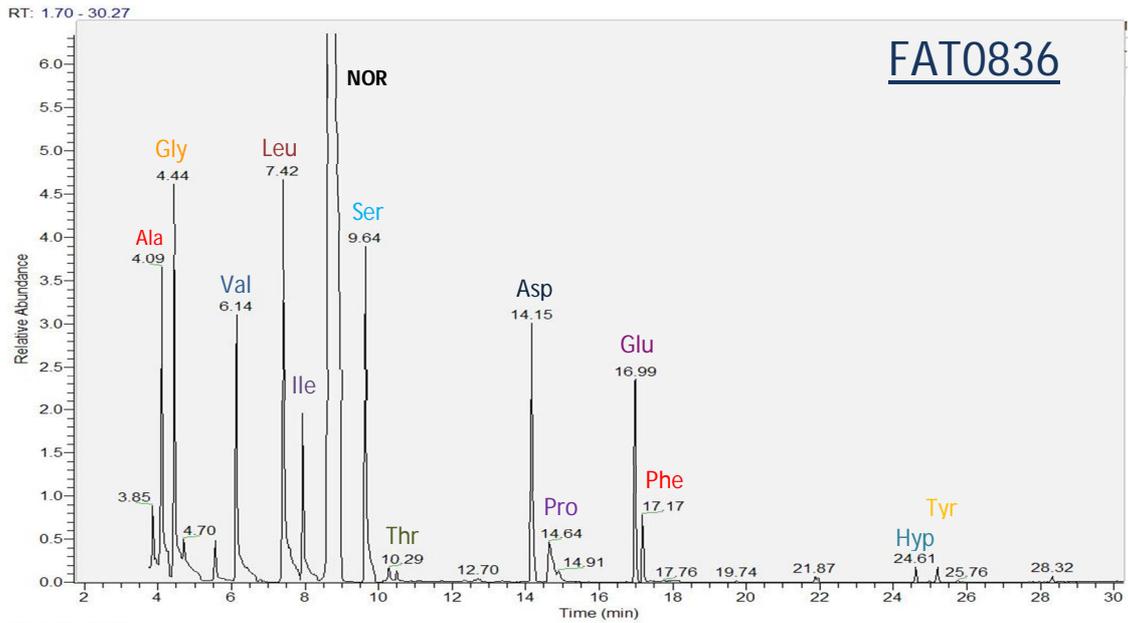
I campioni oggetto di studio descritti nel capitolo IV sono stati forniti dal laboratorio d'analisi C.S.G. Palladio e sono suddivisibili, adottando un criterio di provenienza, in quattro gruppi:

- camp. n. 1565, 1570, 1571 provenienti dagli interni di una chiesa sita a Trento;
- camp. n. FAT0836, FAT0857, FAT0922, FAT0926 provenienti dagli interni di una chiesa sita a Bolzano;
- camp. n. 2114, 2115 provenienti dagli interni di una chiesa sita a Padova;
- camp. n. 1069, 1070 provenienti dagli interni di una chiesa sita a Mantova.

I campioni sono stati preparati secondo la modalità descritta precedentemente (parte sperimentale - capitolo VI – paragrafi 3.1, 3.2, 3.3). A causa del peso limitato dei frammenti pittorici sono stati trattati 0,001g di pellicola pittorica.

Si riportano di seguito quattro cromatogrammi relativi a quattro prelievi pittorici aventi provenienza diversa, rispettivamente i campioni n. 1570, n. FAT0836, n.2114, n. 1069.





Il grafico in figura 8.2 riporta i risultati di queste analisi e illustra l'andamento della concentrazione di ogni amminoacido quantificato relativo ad ogni campione ed espressa in  $\mu\text{g/g}$ .

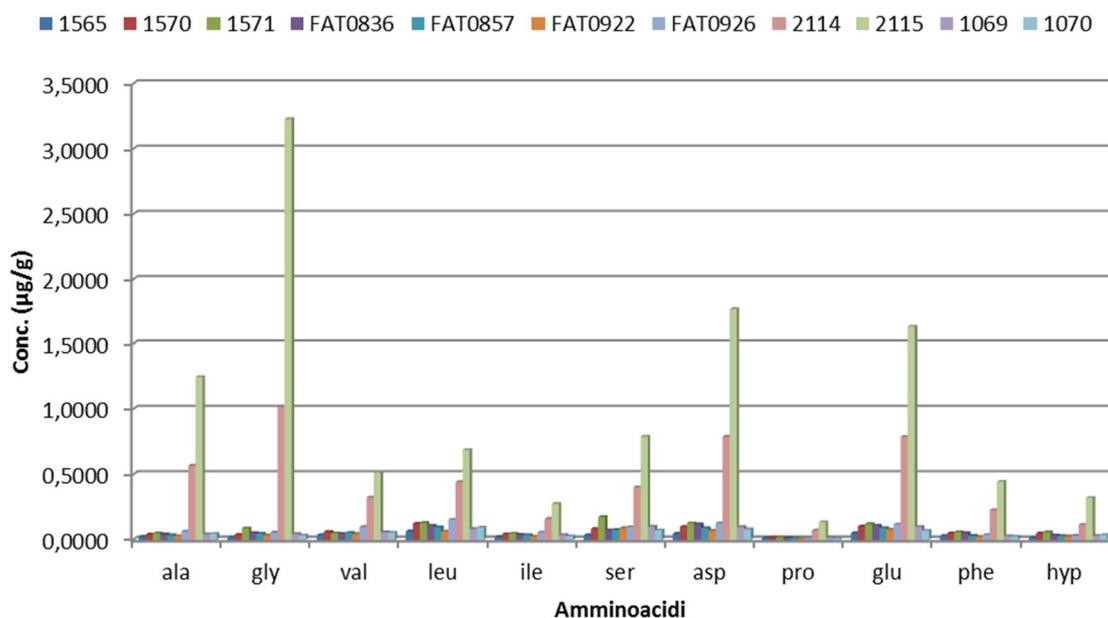


Figura 8.2: grafico che illustra le concentrazioni relative agli amminoacidi contenuti in ciascuno dei campioni analizzati espresse in  $\mu\text{g/g}$

Il grafico evidenzia le differenze che intercorrono tra gli undici diversi campioni pittorici. Il profilo amminoacidico appare paragonabile per quasi tutti i frammenti ad eccezione dei due provenienti dagli interni della chiesa padovana (n. 2114, 2115). Il materiale proteico recuperato in questo caso risulta maggiore e di particolare interesse ai fini della caratterizzazione del legante pittorico spiccano le concentrazioni di glicina e idrossiprolina indicative probabilmente della presenza di colla animale. I valori della prolina sono, escludendo i due casi citati, sempre al di sotto del limite di rilevabilità, per questo motivo la presenza di tale analita può essere identificata come inquinante.

## 2.1 L'analisi statistica - fondamenti teorici

I dati sperimentali relativi alla componente amminoacidica dei campioni sono stati elaborati statisticamente utilizzando l'analisi delle componenti principali (PCA – Principal Components Analysis). Questo trattamento dei dati è una tradizionale tecnica di Pattern Recognition. Si tratta di uno strumento di importanza fondamentale nell'esplorazione multivariata dei dati, ovvero, per estrarre l'informazione contenuta in una serie di dati sperimentali (a prescindere da qualsiasi conoscenza a priori sui campioni a cui si riferiscono) quando essi possono essere organizzati in modo da formare una matrice.

Nella PCA, le variabili che descrivono i dati vengono trasformate in nuove variabili, chiamate appunto componenti principali (o variabili latenti), che risultano essere delle combinazioni lineari delle variabili originali, e la cui caratteristica principale è quella di essere tra loro ortogonali.

Alla base del metodo sta l'esistenza di modelli matematici che, con assunzioni piuttosto generali, sono capaci di descrivere una serie di dati polidimensionali con una buona (e controllabile) approssimazione. L'assunzione fondamentale, necessaria affinché il modello empirico funzioni, è che i sistemi (gli oggetti) sui quali sono misurate le stesse variabili, possano considerarsi sostanzialmente "simili", o, almeno, di "diversità limitata". [PIAZZA, 2008].

L'approccio PCA, sfruttando l'interdipendenza delle variabili, è in grado di fornire in risultato statistico in cui la dimensionalità del modello (cioè il numero di componenti principali) e la rilevanza di ciascuna variabile si ottengono come risultati dell'analisi e non devono essere prefissati. Per questo motivo, la PCA si presta assai bene a descrivere, semplificare e a trarre informazioni da una struttura di dati multidimensionali rappresentati attraverso variabili sperimentali, la cui rilevanza al problema non è nota a priori.

Il numero di componenti che si possono estrarre è pari al numero di variabili originarie. Ogni componente, essendo funzione di tutte le variabili originali, raccoglie in genere informazioni da gruppi di variabili, ed in maggioranza da tutte quelle per le quali i coefficienti  $a_{pj}$  sono sufficientemente elevati. Di conseguenza, variabili che sono ad elevato grado di associazione (correlate) tendono a concentrare il loro peso (in positivo o in negativo, a seconda del segno del coefficiente) su una o su poche componenti principali. Più la base dati originaria è correlata dunque, più il nostro sistema risulta semplificato e basteranno poche componenti principali a descrivere la maggior parte dell'informazione contenuta nelle variabili originarie.

Ad ogni componente è associata una varianza che, essendo una frazione della variabilità totale presente in tutte le variabili, viene chiamata varianza spiegata e spesso riportata come valore relativo percentuale.

## 2.1 L'analisi statistica – analisi dei dati

Al fine di caratterizzare i campioni reali è stata utilizzata la “banca dati” di riferimento del laboratorio presso il quale è stato svolto il presente lavoro. Essa è stata creata conducendo analisi ripetute su tre tipologie di standard pittorico che riassumono i principali leganti a base proteica utilizzati nella pittura a tempera (uovo, colla animale, caseina). Gli standard analizzati sono stati trattati adottando una metodologia preparativa uguale a quella proposta in questa trattazione (capitolo VI – paragrafi 3.1, 3.2, 3.3) ed è stata eseguita con modalità analoghe per le tre diverse tipologie in esame.

L'analisi multivariata è stata eseguita su una matrice di dati in cui a quelli interni aziendali sono stati aggiunti i valori relativi ai campioni oggetto di studio. Solo questi ultimi vengono riportati in tabella 8.3 dove compaiono i valori delle concentrazioni espresse in % di 11 amminoacidi per 11 campioni.

Tabella 8.3: parte della matrice dei dati su cui è stata eseguita la PCA.  
La composizione amminoacidica del materiale proteico è espressa in %

	<b>Ala</b>	<b>Gly</b>	<b>Val</b>	<b>Leu</b>	<b>Ile</b>	<b>Ser</b>	<b>Pro</b>	<b>Phe</b>	<b>Asp</b>	<b>Glu</b>	<b>Hyp</b>
<b>1565</b>	6,7	5,2	10,3	18,1	6,0	10,0	3,8	8,2	13,1	14,2	4,3
<b>1570</b>	5,8	5,6	8,6	17,4	6,0	11,8	2,3	7,0	13,9	14,5	7,1
<b>1571</b>	5,4	9,5	5,4	14,1	5,2	18,9	1,9	6,4	13,7	13,2	6,4
<b>FAT0836</b>	6,1	7,6	6,7	15,7	5,4	10,6	2,1	7,7	17,3	15,8	4,9
<b>FAT0857</b>	5,9	7,9	9,1	16,2	6,0	12,7	2,0	5,2	15,0	15,1	4,8
<b>FAT0922</b>	5,5	6,9	9,1	12,8	5,2	18,1	2,1	4,6	14,1	16,1	5,4
<b>FAT0926</b>	7,5	6,6	11,6	18,0	6,7	11,4	1,3	4,4	14,9	13,9	3,7
<b>2114</b>	11,6	20,7	6,6	9,0	3,3	8,2	1,4	4,6	16,1	16,1	2,3
<b>2115</b>	11,3	29,2	4,7	6,2	2,5	7,1	1,2	4,0	16,1	14,8	2,9
<b>1069</b>	6,6	7,0	9,0	13,0	5,7	15,8	2,7	4,3	15,5	15,7	4,7
<b>1070</b>	8,3	6,1	9,9	17,1	4,9	13,2	1,8	4,5	14,6	12,7	6,7

Per il sistema presentato, la varianza spiegata nelle prime due componenti principali è pari all' 85 %, sufficiente a descrivere con buona approssimazione la struttura dei dati.

Si riporta in figura 8.3 lo score plot, grafico che consente di analizzare il comportamento degli oggetti nelle diverse componenti principali, e le loro similarità. Permette di osservare varie caratteristiche presenti nei dati come l'esistenza di eventuali raggruppamenti di campioni o di particolari andamenti all'interno di uno stesso insieme di campioni, o comunque di una struttura presente nei dati e di significato rilevante per lo specifico problema trattato.

Nel caso in esame sono chiaramente visibili tre raggruppamenti, identificabili rispettivamente come classi "uovo", "colla animale" e "caseina".

In particolare, la prima componente principale è in grado di suddividere i composti della "classe uovo" e della "classe caseina" da quelli appartenenti alla "classe colla animale", mentre l'informazione contenuta nella seconda è in grado di discriminare i campioni appartenenti alle prime due classi.

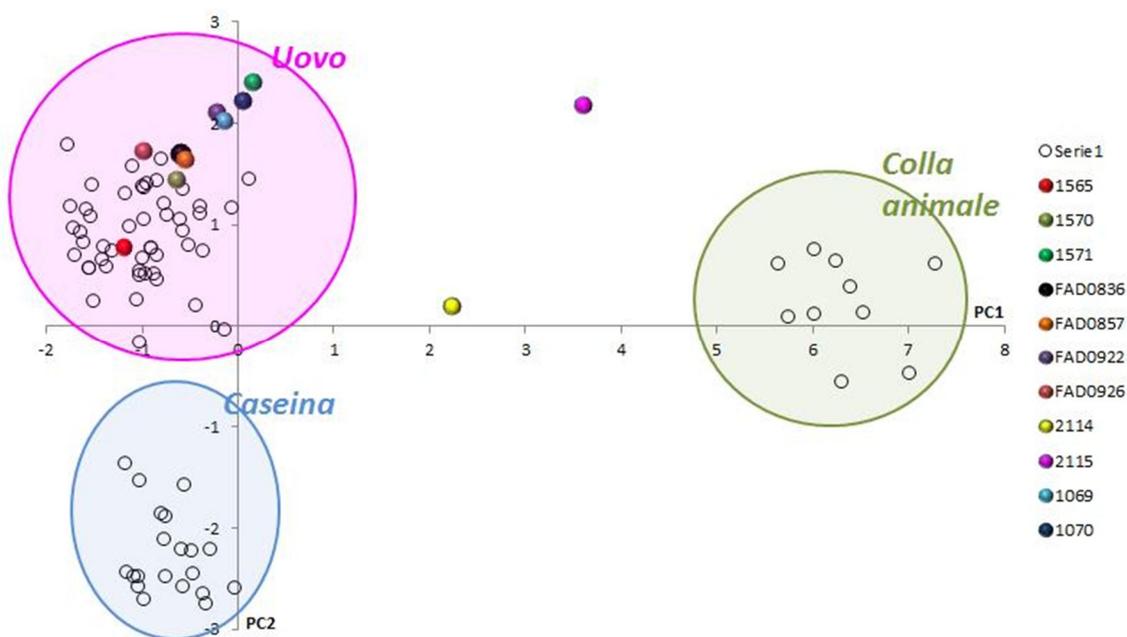


Figura 8.3: score plot (diagramma di dispersione dei campioni)

Nove campioni oggetto di studio cadono all'interno della "classe uovo" e vengono così completamente caratterizzati. Non sono riscontrabili differenze macroscopiche tra i campioni di diversa provenienza. Solo due (n. 2114, 2115) come già anticipato in precedenza si discostano nella visualizzazione grafica e cadono a metà tra la classe identificante le stesure preparante con

legante uovo e quelle a base di colla animale. La spiegazione più probabile è che si tratti di una miscela di queste due componenti.

La figura 8.4 illustra il *loading plot*. Questo tipo di grafico consente di analizzare il ruolo di ciascuna variabile nelle diverse componenti principali, le loro correlazioni dirette e inverse e la loro importanza relativa. Dal grafico si può osservare come alcune variabili partecipino in modo più significativo alla formazione delle componenti principali.

In particolare, sulla base dei risultati ottenuti si possono trarre le seguenti conclusioni :

- acido aspartico e serina sono i più significativi per la caratterizzazione della tempera a base di uovo, ed hanno lo stesso peso;
- idrossiprolina, glicina e in misura minore alanina sono i più significativi per la caratterizzazione della tempera a base di colla animale;
- l'acido glutammico è l'amminoacido più significativo per le tempere a base di caseina;
- la prolina differenzia le tempere a base di colla animale e caseina da quelle a base di uovo;
- fenilalanina, valina, leucina ed isoleucina differenziano chiaramente le tempere a base di uovo e caseina da quelle a base di colla animale.

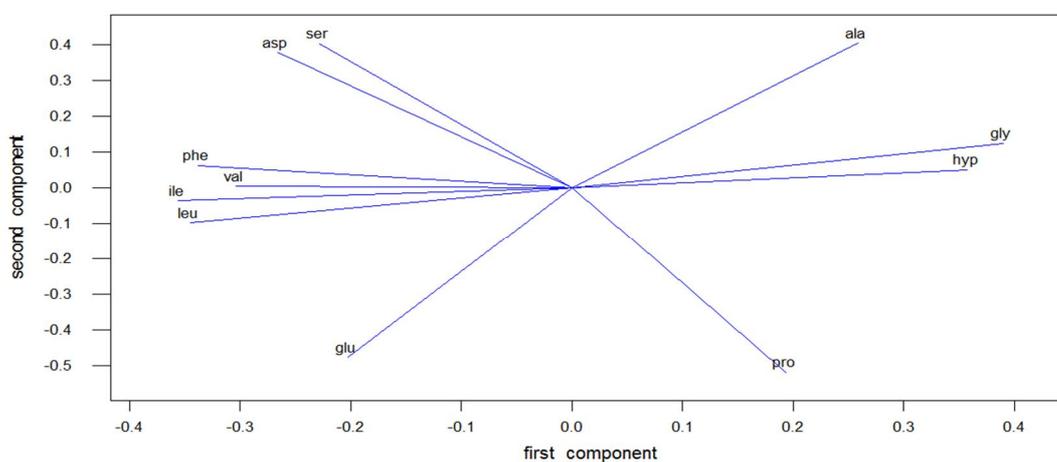


Figura 8.4: loading plot (diagramma di dispersione delle variabili sulle prime due componenti principali)

### 3. CONCLUSIONI

Nello svolgimento di questa tesi sperimentale sono state affrontate alcune problematiche analitiche relative alla caratterizzazione di leganti proteici in campioni provenienti da dipinti murali quali, la presenza di miscele complesse e degradate, le interferenze dovute alla presenza di specie inorganiche, le piccole dimensioni dei campioni, il rischio di contaminazione. La procedura pre-analitica ha previsto la determinazione della composizione amminoacidica mediante estrazione, purificazione, idrolisi e derivatizzazione del campione al fine di caratterizzarlo sfruttando le potenzialità analitiche degli strumenti GC-MS e HPLC-MS/MS e di confrontare i dati ottenuti con le due diverse metodiche analitiche. Il confronto non è stato possibile in quanto non si sono ottenuti risultati apprezzabili dall'analisi HPLC-MS/MS in cui la separazione cromatografica degli analiti è stata effettuata con una colonna HILIC, mentre la rivelazione degli analiti è stata eseguita con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, servendosi della sorgente ESI per la ionizzazione degli analiti. Il metodo non è stato validato in quanto il trattamento del campione è risultato non adatto a questo tipo di strumentazione.

Dall'analisi in GC-MS sono stati quantificati undici amminoacidi in dieci campioni utili alla validazione e undici campioni reali provenienti da quattro diversi interni di chiese e forniti dal laboratorio d'analisi C.S.G. Palladio preso il quale è stato svolto parte di questo lavoro. Gli amminoacidi determinati sono stati: alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, serina, acido aspartico, prolina, acido glutammico, fenilalanina, idrossiprolina. Il legante proteico dei campioni esaminati è stato caratterizzato servendosi dell'analisi statistica multivariata e nello specifico dell'analisi delle componenti principali collocando i valori relativi ai campioni oggetto di studio all'interno della matrice dei dati riferibile a degli standard pittorici preparati con materiale proteico noto e utilizzata dal laboratorio sopra citato. Ne è risultato che i campioni reali presentano un profilo amminoacidico pressoché simile e caratteristico dell'uovo, fatta eccezione per due campioni (di uguale provenienza) per i quali risulta caratteristico di una situazione intermedia tra quella dell'uovo e della colla animale, non si esclude, per questo motivo, che possa trattarsi di una miscela.

## BIBLIOGRAFIA

- U. BARTOLUCCI, *Caratterizzazione di leganti proteici in campioni d'affreschi provenienti dal cortile di Michelozzo in Palazzo Vecchio a Firenze*, Tesi di Master di I Livello in Materiali e Tecniche Diagnostiche nel Settore dei Beni Culturali, Pisa, Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, 2003 - 2004
- A. CASOLI, P. MIRTI, G. PALLA, *Characterization of medieval proteinaceous painting media using gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, pp. 352 – 372
- C. CENNINI, *Il Libro dell'Arte* (XIV sec.), a cura di R. Simi, R. Carabba Editore, Lanciano, 1932
- M.P. COLOMBINI, A. ANDREOTTI, I. BONADUCE, F. MODUGNO, E. RIBECHINI, *Analytical strategies for characterizing organic paint media using gas chromatography/mass spectrometry*, *Account of chemical Research* 43, 2010, pp. 715 - 727
- M.P. COLOMBINI, R. FUOCO, A. GIACOMELLI, B. MUSCATELLO, *Characterization of proteinaceous binders in wall painting samples by microwave-assisted acid hydrolysis and GC/MS determination of amino acids*, *Studies in Conservation* 43, 1998, pp. 33 - 41
- M.P. COLOMBINI, G. GAUTIER, *Identificazione dei leganti proteici in dipinti murali tramite GC-MS*, IV Congresso Nazionale IGIC - Lo Stato dell'Arte – Siena, 2006
- M.P. COLOMBINI, F. MODUGNO, A. GIACOMELLI, *Two procedures for suppressing interference from inorganic pigments in the analysis by gas chromatography-mass spectrometry of proteinaceous binders in paintings*, *Journal of Chromatography*, 1999, pp. 101-111.
- G. GAUTIER, M.P. COLOMBINI, *GC-MS identification of proteins in wall painting samples: A fast clean-up procedure to remove copper-based pigment interferences*, *Talanta* 73, 2007, pp. 95 – 102
- C.W. GEHRKE, L.L. WALL, *Sample preparation for chromatography of aminoacids: acid hydrolysis of proteins*, *Aminoacid Analysis by Gas Chromatography*, Vol. I, C.R.C. Press Inc., Florida 1987

- S.M. HALPINE, *An investigation of artist's materials using aminoacid analysis: introduction of the one-hour extraction method*, Conservation Research, Ed. National Gallery of Art, Washington, 1995
- L. HILL, *Hidrolisis of proteins*, Adv. Protein Chemistry 20, 1965, p. 37
- A. KARPOWICZ, *Ageing and deterioration of proteinaceous media*, Studies in conservation 26, 1981, pp. 153 – 160
- G. KENNDLER, K. SCHMIDT – BEIWL, F. MARINGER, M. POHM, *Identification of proteinaceous binding media of easel paintings by GC-MS of the aminoacids derivatives after catalytic hydrolysis by a protonated cation exchanger*, Fresenius Journal of Analytical Chemistry 342, 1992, pp. 135 – 141
- M. MATTEINI, A. MOLES, *La Chimica nel Restauro*, Nardini Editore, Firenze, 1989
- J.S. MILLS, R. WHITE, *The organic chemistry of museum objects*, Butterworths, London, 1987
- F. RONCA, *Protein determination in polychromed stone sculpture, stuccoes and gesso grounds*, Studies in Conservation 39, 1934, pp. 107 – 120
- C. ROSATI, *Tecniche pittoriche e restauro dei dipinti*, Ed. Scientifiche A. Cremonese, Bologna, 1991
- M.R. SHILLING, H.P. KHANJIAN, *Gas Chromatographic analysis of aminoacids as chloroformiate derivatives*, Journal of the American Institute for Conservation 35, 1996, pp. 45 – 59
- D.A. SKOOG, D.M. WEST, F.J. HOLLER, S.R. CROUCH, *Fondamenti di Chimica Analitica*, EdiSES, Napoli, 2005
- S. L. VALLANCE, B.W. SINGER, S.M. HITCHEN, *The analysis of proteinaceous artists media by HPLC, LC-GC international*, 1997, pp. 48 – 53

- A. VIANELLO, *Sviluppo di una metodologia analitica per la determinazione degli amminoacidi contenuti nei leganti a base proteica utilizzati nella pittura a tempera, mediante HPLC-MS/MS*, Tesi di Laurea, relatore A. Gambaro, Venezia, Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, 2007 – 2008
- R. WHITE, *The characterization of proteinaceous binder in art objects*, National Gallery Technical Bulletin 8, 1984, pp. 5 – 14
- R. ZANGRANDO, R. PIAZZA, W.R.L. CAIRNS, F.C. IZZO, A. VIANELLO, E. ZENDRI, A. GAMBARO, *Quantitative determination of un-derivatised amino acids in artistic mural paintings using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta* 675 ,2010, pp. 1 -7

## **RINGRAZIAMENTI**

*A conclusione di questa esperienza qualificante e professionalmente gratificante quale è stata la produzione della presente tesi è doveroso porre i miei più sentiti ringraziamenti alle persone che ho avuto la fortuna di incontrare e senza le quali la produzione dell' elaborato non sarebbe stata possibile.*

*Vorrei ringraziare: il Professor Gambaro per la professionalità dimostrata nel seguirmi con attenzione e disponibilità in ogni fase del presente lavoro in special modo nella fase organizzativa; il Dott. Cornale per avermi dato la possibilità di lavorare presso la Sua struttura con persone preparate ed estremamente competenti; la Dott.ssa Zangrando e la Dott.ssa Barbaro per il loro supporto pratico nella fase analitica; il Professor Piazza per avermi seguito nell'elaborazione statistica; il Dott. Bartolucci, per il suo prezioso contributo, risultato fondamentale per lo sviluppo della tesi sia dal punto di vista formativo e conoscitivo che da quello umano.*

*Infine, in questi ringraziamenti, non posso fare a meno di ricordare tutte le persone che mi sono state vicine in questi anni sostenendomi e incoraggiandomi.*