



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE  
(ordinamento ex D.M. 270/2004)  
IN SCIENZE CHIMICHE PER LA CONSERVAZIONE ED  
IL RESTAURO

—

Ca' Foscari  
Dorsoduro 3246  
30123 Venezia

TESI

Estrazione di leganti pittorici di natura  
proteica: valutazione di diverse metodiche  
tramite spettrofotometria UV-VIS.

**Relatore**

Prof. Carlo Barbante

**Correlatori**

Dott.ssa Sara Crotti

Dott.ssa Clara Granzotto

**Laureanda**

Claudia Zigola

Matricola 831280

**Anno Accademico**

2011 / 2012

## **ABBREVIAZIONI**

BCA = Bicinchoninic Acid Protein Assay

BSA = Albumina di Siero Bovino

DTT = Ditiotreitolo

EDTA = Acido Etilendiamminotetracetico

EGTA = Acido Etileneglico-bis-aminoetilentetracetico

ESI-MS = Electrospray Ionization – Mass Spectrometry

GC-MS = Gas Chromatography – Mass Spectrometry

HPLC = High-Performance Liquid Chromatography

IFM = Microscopia d'immunofluorescenza

MALDI-TOF = Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of Flight

NH<sub>3</sub> = Ammoniaca

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = Ammonio Carbonato

OVA = Ovalbumina

Py-GC = Pyrolysis Gas Chromatography

SDS = Sodio Dodecil Solfato

SERS = Surface Enhanced Raman Spetroscopy

TFA = Acido Trifluoroacetico

# SOMMARIO

<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>1</b>
<b>SOMMARIO .....</b>	<b>2</b>
<b>CAPITOLO 1.....</b>	<b>4</b>
<b>PARTE INTRODUTTIVA.....</b>	<b>4</b>
1.1 INTRODUZIONE.....	4
1.2 LE PROTEINE.....	7
1.3 I LEGANTI PITTORICI DI NATURA PROTEICA.....	9
1.3.1 Uovo.....	9
1.3.2 Colle animali.....	12
1.3.3 Caseina.....	14
1.4 TECNICHE ANALITICHE .....	15
1.5 OBIETTIVO.....	18
<b>CAPITOLO 2.....</b>	<b>19</b>
<b>ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE .....</b>	<b>19</b>
2.1 ESTRAZIONE IN CONDIZIONI DENATURANTI E NON DENATURANTI .....	19
2.1.1 Condizioni non denaturanti.....	19
2.1.2 Condizioni denaturanti.....	20
2.2 METODI DI QUANTIFICAZIONE .....	20
2.2.1 Spettrofotometria UV-VIS .....	20
2.2.2 Metodi colorimetrici .....	22
<b>CAPITOLO 3.....</b>	<b>28</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>28</b>
3.1 STANDARD, REAGENTI E MATERIALE.....	28
3.2 PREPARAZIONE DEI MODELLI PITTORICI.....	28
3.3 PREPARAZIONE PROTEINE STANDARD E RETTE DI CALIBRAZIONE.....	30
3.4 PROTOCOLLI .....	30
<b>CAPITOLO 4.....</b>	<b>33</b>
<b>RISULTATI .....</b>	<b>33</b>
4.1 SCELTA DEL KIT COLORIMETRICO .....	33
4.1.1 Determinazione range di linearità.....	33
4.1.2 Riproducibilità .....	34
4.1.3 Interferenza dei pigmenti con i reattivi.....	35
4.1.4 Quantificazione proteina standard in presenza di pigmenti.....	36
4.2 PROTOCOLLO IN CONDIZIONI ACIDE.....	37
4.2.1 Albume.....	37
4.2.2 Tuorlo.....	39
4.2.3 Colle animali.....	40
4.2.4 Caseina.....	41
4.3 PROTOCOLLO IN CONDIZIONI BASICHE .....	42
4.3.1 Albume.....	42

4.3.2 Tuorlo.....	43
4.3.3 Colle animali.....	45
4.3.4 Caseina.....	47
4.4 PROTOCOLLO IN CONDIZIONI DI DENATURANTI .....	47
4.4.1 Albume.....	47
4.4.2 Tuorlo.....	48
4.4.3 Colle animali.....	49
4.4.4 Caseina.....	51
<b>CAPITOLO 5.....</b>	<b>53</b>
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>53</b>
5.1 ALBUME.....	53
5.1.1 Vetrino .....	53
5.1.2 Intonaco .....	54
5.1.3 Gesso e colla.....	55
5.2 TUORLO .....	57
5.2.1 Vetrino .....	57
5.2.2 Intonaco .....	58
5.2.3 Gesso e colla.....	58
5.3 CASEINA .....	60
5.3.1 Vetrino .....	60
5.3.2 Intonaco .....	60
5.3.3 Gesso e colla.....	61
5.4 COLLE ANIMALI.....	62
5.4.1 Vetrino .....	62
5.4.2 Intonaco .....	64
5.4.3 Gesso e colla.....	66
5.5 CONCLUSIONI .....	69
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>71</b>

## CAPITOLO 1

### PARTE INTRODUTTIVA

#### 1.1 Introduzione

La struttura di un dipinto risulta molto complessa poiché caratterizzata da una molteplicità di strati che prevedono l'impiego di materiali organici e inorganici (Fig.1).

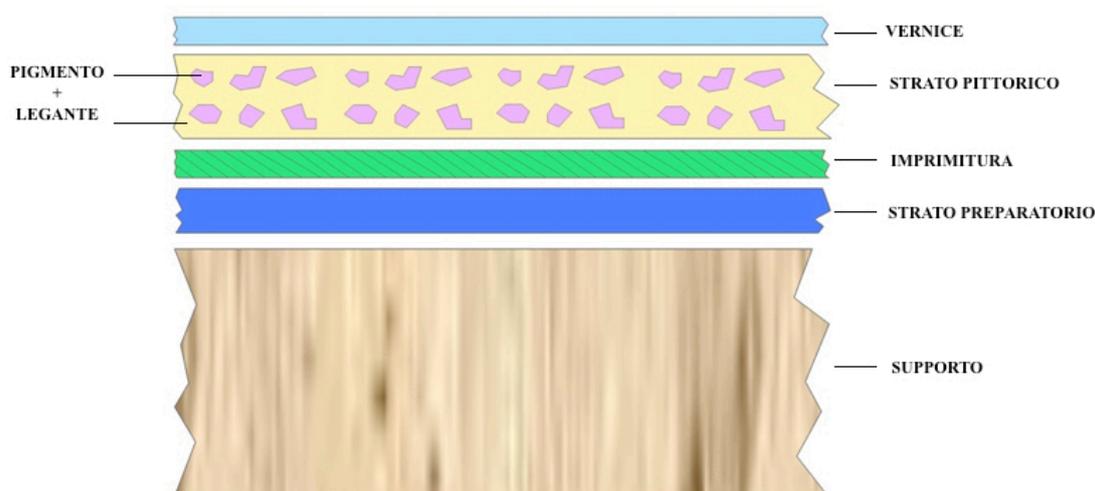


Figura 1 Rappresentazione schematica della struttura di un dipinto.

Si parte dal supporto il quale deve accogliere in maniera appropriata le stesure pittoriche e può essere ad esempio una tavola lignea, una tela o un supporto murario. I supporti devono essere ricoperti da strati preparatori i quali hanno il compito di rendere la superficie piana e creare un fondo poco assorbente in modo che i leganti possano seccare per evaporazione anziché per assorbimento. La preparazione tipica delle tavole lignee ad esempio consiste in un impasto di gesso e colla animale. Spesso allo strato preparatorio si sovrappone un ulteriore strato sottile chiamato imprimitura che ha lo scopo di rendere la preparazione meno assorbente e formare una campitura cromatica di base; essa è costituita da pigmenti a granulometria fine e leganti simili a quelli degli strati preparatori. Sopra

L'imprimatura vengono applicati uno o più strati pittorici che consistono in stesure sottili e coerenti ottenute dalla mescolanza di uno o più pigmenti con un legante che serve a disperdere i pigmenti e a dare coerenza e stabilità al film. Infine, a copertura di tutto, si trova uno strato di vernice, spesso una resina vegetale, che svolge una funzione protettiva ed estetica (Campanella, 2007).

Lo studio dei materiali organici in campioni pittorici, presenti sia come costituenti originali sia come materiali aggiunti durante successivi interventi di restauro, è uno strumento fondamentale per accertare lo stato di conservazione della pittura stessa, quindi d'aiuto per la scelta delle condizioni ambientali richieste per preservare ed esporre l'oggetto. La conoscenza della tecnica pittorica, la quale viene definita in base al tipo di legante impiegato dal pittore, è estremamente importante dal punto di vista della storia dell'arte e della tecnologia. Questo studio può anche aiutare nella valutazione dell'autenticità dell'opera d'arte e nell'attribuzione ad un particolare pittore (Bonaduce, 2009).

Le sostanze organiche sono ampiamente utilizzate nella realizzazione di un'opera pittorica sia per l'esecuzione della preparazione del supporto, sia come leganti pittorici che come vernici. I leganti pittorici antichi si dividono in diverse categorie: oli siccativi, leganti proteici, resine vegetali, leganti polisaccaridici (gomme) e cere. Nello specifico, i leganti proteici (colle animali, caseina lattica, rosso e bianco d'uovo) giocarono un ruolo importante nella pittura antica e sono tuttora ampiamente utilizzati grazie alla loro capacità di formare film elastici e aderenti di alta durabilità.

L'identificazione dei materiali organici è ancora un argomento problematico a causa della grande varietà di composti usati storicamente nella produzione artistica e al fatto che essi vennero spesso applicati non puri ma sottoforma di miscele. La componente organica, rispetto a quella inorganica tende a subire processi di degrado e questo complica il loro riconoscimento (Vagnini, 2008). Nel caso particolare dei leganti proteici i processi di degrado consistono, ad esempio, nella perdita di adesione dovuta a fenomeni di rigonfiamento e ritiro conseguenti a variazioni di umidità e temperatura, in sviluppo di muffe e microrganismi dovuto anch'esso all'umidità, in processi di fotossidazione indotti dalla radiazione UV e visibile e in interazioni con i pigmenti o con leganti di natura

diversa. L'identificazione dei leganti proteici è soggetta a diversi problemi analitici quali: la bassa quantità di campione disponibile (solitamente inferiore ad 1 mg) in quanto si tende a preservare il più possibile l'integrità dell'opera, il ridotto contenuto di legante organico presente nel campione (circa 10% w/w), la presenza di una componente inorganica quale i pigmenti. Per queste ragioni una delle grandi difficoltà nell'analisi di proteine è l'isolamento di queste dal campione eterogeneo (Gautier, 2007). Nel caso particolare delle pitture murali la difficoltà nell'identificazione delle proteine è ancora maggiore per la presenza di specie inorganiche in elevata concentrazione quali il carbonato di calcio (Colombini, 1999). I pigmenti possono continuamente interagire con il legante proteico attraverso la formazione di complessi fra gli ioni  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e gli amminoacidi, oltre ad agire come catalizzatori in reazioni di *cross-linking*. Poiché gli amminoacidi hanno una diversa suscettibilità nel formare complessi metallici, le proteine reagiranno diversamente in base al tipo di pigmento presente. Questa interazione con i cationi può dare interferenze durante il trattamento preanalitico e quindi impedire la corretta identificazione del legante proteico quando l'analisi dei leganti proteici avviene per idrolisi acida e successiva quantificazione degli amminoacidi con tecniche analitiche quali la gas cromatografia accoppiata allo spettrometria di massa. Ad esempio Rampazzi *et al.* riportano che la *recovery* delle proteine dell'uovo diminuisce significativamente quando sono presenti gesso, ossalato di calcio o entrambi (Rampazzi, 2004).

Colombini *et al.*, per risolvere il problema dell'interferenza dei pigmenti durante la determinazione quantitativa di amminoacidi ottenuti dall'idrolisi acida di leganti proteici tramite GC-MS, riportano due metodi: estrazione delle proteine dal campione attraverso una soluzione di ammoniaca 2.5 M ed eliminazione degli ioni inorganici dagli acidi idrolizzati tramite un'eluizione selettiva su colonna impaccata con resine a scambio cationico.

Tutte queste difficoltà d'interazione tra le varie componenti di un dipinto giustificano la volontà di trovare il metodo più efficiente per estrarre le proteine dei leganti proteici dal contesto complesso.



CO e NH che si trovano in catene polipeptidiche differenti; la struttura terziaria si crea in seguito all'instaurarsi di legami disolfuro, legami idrogeno, interazioni idrofobiche e forze di Van der Waals fra gli amminoacidi della catena; la struttura quaternaria è infine l'associazione di due o più catene polipeptidiche.

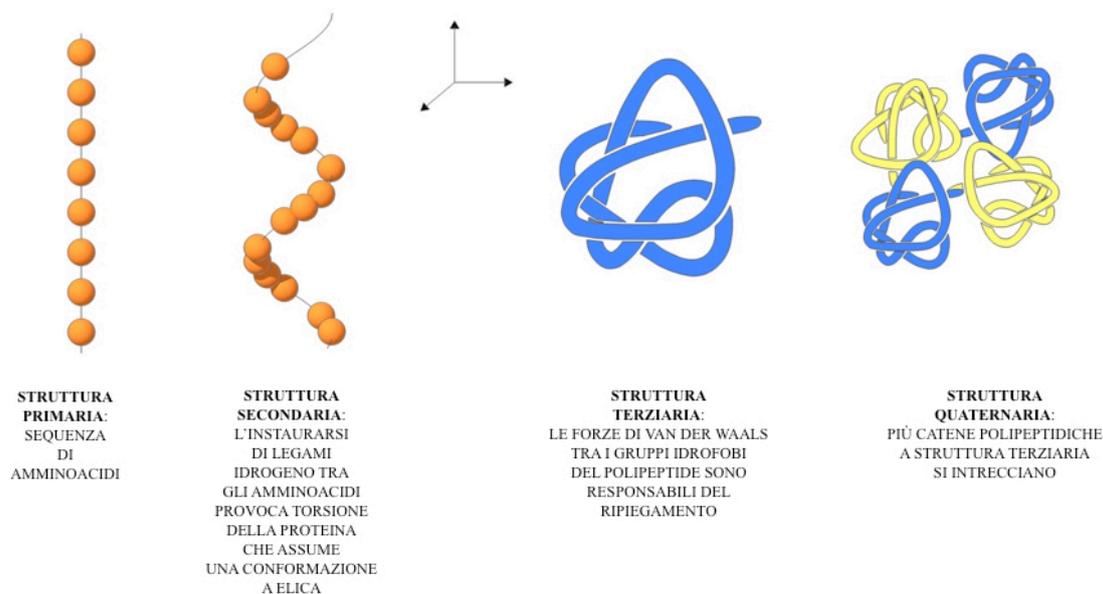


Figura 4 Le quattro strutture delle proteine.

Le differenze nelle proprietà chimiche e fisiche delle proteine sono causate non solo dalle sequenze di amminoacidi nella catena ma anche dalla loro struttura tridimensionale la quale a sua volta può subire modificazioni. La struttura delle proteine non rimane infatti inalterata ma può subire processi di denaturazione dovuti ad esempio a processi d'invecchiamento o di preparazione del campione che prevedono l'impiego del calore.

Nel caso dei leganti proteici, una volta applicati, incominciano ad essiccare perdendo acqua e le strutture terziarie e quaternarie delle proteine in esse contenuti cambiano tramite riarrangiamento dei legami interni tra i gruppi funzionali (Karpowicz, 1981). In soluzioni acquose, infatti, gli amminoacidi con gruppi laterali idrofobici tendono a ripiegarsi all'interno della molecola proteica. Pitture fresche contengono una grande quantità d'acqua che evapora velocemente in seguito all'applicazione della stesura; durante l'essiccazione la proteina continua a perdere acqua per raggiungere un equilibrio con l'umidità dell'ambiente circostante generando spazi vuoti tra le molecole, le quali si trovano

obbligate a riempirli e a riarrangiare la struttura. Parti delle catene peptidiche perdono il loro ordine e si aprono. Una proteina disidratata è denaturata e i suoi legami intramolecolari non covalenti devono essere parzialmente distrutti e riarrangiati. Parte dei gruppi funzionali laterali, solitamente all'interno della molecola ripiegata nello stato nativo, diventeranno così disponibili e la proteina disidratata potrà aumentare l'attività chimica grazie ai gruppi funzionali esposti, responsabili della reattività delle proteine. Dopo la realizzazione della struttura finale, le sostanze leganti asciutte avranno pertanto nuove proprietà fisiche.

### **1.3 I leganti pittorici di natura proteica**

Genericamente per tempera s'intende un impasto cromatico ottenuto unendo il pigmento macinato e amalgamato con sostanze di natura organica solubili in acqua. Solo dopo lo sviluppo della tecnica ad olio il significato del termine tempera si è ristretto e ad oggi indica quelle tecniche in cui i leganti sono di natura proteica (a base d'uovo, colle animali di varia natura o latte) o polisaccaridica (gomme vegetali, amido, destrine).

I pregi di questa tecnica consistono nella chiarezza e delicatezza di toni che si ottengono e nell'opaca levigatezza del risultato finale. Utilizzata dai maggiori maestri del Quattrocento (Mantegna, Botticelli, Piero della Francesca), questa tecnica decade parzialmente nel XVI secolo con il parallelo affermarsi della pittura ad olio (Campanella *et al.*, 2007).

In questo paragrafo verranno quindi prese in esame le tre tipologie di leganti proteici dal punto di vista della loro composizione, preparazione e caratteristiche del film pittorico finale.

#### *1.3.1 Uovo*

La tempera a base d'uovo è considerata la più importante, se non la tempera per eccellenza (Matteini, 2003). L'uovo è utilizzato mescolato all'acqua, sia intero che separatamente bianco e rosso.

#### *Composizione dell'uovo*

L'uovo è costituito da acqua, proteine, lipidi, sali, carboidrati ed altre sostanze; la composizione del tuorlo e dell'albume varia a seconda che si tratti di uovo fresco o secco (Tab.1).

Sostanza	Tuorlo		Albume	
	fresco %	secco %	fresco %	secco %
Acqua	51	-	85	-
Lipidi	22	45	-	-
Proteine	15	31	12	80
Sali e altre sostanze	12	24	3	20

Tabella 1 Composizione del tuorlo e dell'albume freschi e dopo essiccazione (Carter, 1968).

Il rosso d'uovo (o tuorlo) è un'emulsione tra una soluzione acquosa colloidale di alcune proteine fosforate (Tab.2) e un insieme di grassi ed oli animali, stabilizzata da emulsionanti tra i quali il più importante è la lectina. Il bianco d'uovo (o albume) è essenzialmente una soluzione acquosa colloidale di proteine (Tab.3), soprattutto albumina, con piccole quantità di grassi e sali minerali.

Proteine	Contenuto %	
Livetine	4-10%	
Fosfoproteine	Fosvitina	5-6%
	Vitellina	4-15%
	Vitellinina	8-9%
Lipoproteine	Lipovitellina	16-18%
	Lipovitellinina	12-13%

Tabella 2 Composizione proteica percentuale del rosso d'uovo (Carter, 1968).

Proteine	MW (kDa)	Contenuto %
Ovalbumina	45	54
Ovotransferrina	85	13
Ovomucoide	28	11
Lisozima G <sub>1</sub>	14.6	3.5
Ovomucina	110	1.5
Flavoproteine	32	0.8
Ovoglicoproteine	24.4	0.5
Avidina	70	0.05
Ovoinibitore	44	0.1
Ovomacroglobulina	760	0.5
Globulina G <sub>2</sub> G <sub>3</sub>	36	8
	45	

Tabella 3 Composizione proteica percentuale del bianco d'uovo (Carter, 1968).

Com'è possibile notare, una delle principali differenze fra albume e tuorlo è che il

bianco d'uovo essiccato è costituito principalmente da proteine, nel rosso invece sono presenti sia proteine che grassi per lo più di natura non siccativa, cioè privi di tendenza a polimerizzare. Questa distinzione nella composizione chimica implica proprietà diverse del film pittorico ottenuto con i due leganti. L'albume tal quale è meno adatto del tuorlo come medium in quanto forma un film fragile e parzialmente sensibile all'acqua a causa dell'assenza di oli e di grassi. Il tuorlo invece grazie all'elevata percentuale di grassi in esso contenuti e dispersi dà luogo alla formazione di un film con eccellenti proprietà meccaniche, coesione, adesione e flessibilità che migliorano con l'invecchiamento.

*Preparazione e caratteristiche della tempera a base d'uovo*

Per quanto riguarda la preparazione del legante nel suo "Il libro dell'arte" Cennino Cennini descrive due possibili preparazioni (capitolo LXXII "El modo del colorire in muro in seccho e ssuo' tempere"): la prima consiste nel battere il tuorlo d'uovo con il liquido che fuoriesce dai ramoscelli di fico tagliati, utile per favorirne la conservazione e la coagulazione ritardando l'essiccamento dei colori sulla tavolozza; il secondo è quello di mescolare solo il rosso d'uovo con i pigmenti (Cennini, 1437).

Nella pittura a tempera veniva usato prevalentemente il rosso separato accuratamente dal bianco e mescolato con poca acqua ma in quantità tale da ottenere con i pigmenti una pasta stendibile. Spesso si aggiungeva anche qualche goccia di aceto o di latte di fico a scopo antifermentativo, per fluidificare la miscela e ritardarne il rapido essiccamento. La miscela veniva poi impastata con i pigmenti in polvere in quantità differenti a seconda del pigmento e in base al gusto e all'abilità dell'artista tenendo comunque presente che un eccesso di uovo avrebbe prodotto un film pittorico troppo "grasso" mentre un difetto implicava una stesura non uniforme e i colori, una volta secchi, sarebbero diventati più chiari e "gessosi".

Una volta essiccata la tempera all'uovo si trasforma per perdita d'acqua in un gel irreversibile, non più solubile in acqua, con notevoli proprietà di coesione e proprietà ottiche. I processi degenerativi che interessano l'uovo sono principalmente riconducibili all'azione dell'umidità ma, rispetto alle colle, dimostra in generale una maggiore resistenza sia per l'insolubilità delle proteine sia per la protezione esercitata dai grassi presenti nel

tuorlo. La pittura a tempera d'uovo, se difesa dall'umidità, si è dimostrata una delle tecniche più resistenti tanto da pervenire ai nostri giorni molto ben conservata.

### *1.3.2 Colle animali*

#### *Composizione delle colle*

Le colle animali sono costituite principalmente da sostanze proteiche e in parte minore da sostanze non proteiche di natura organica e inorganica. Il loro aspetto, composizione chimica e proprietà fisiche variano in base all'animale/tessuti di provenienza ed ai trattamenti subiti in fase di preparazione e purificazione. Le colle meno purificate sono chiamate colle forti (utilizzate in ambito artistico prevalentemente come adesivi) mentre quelle più pure sono le gelatine (utilizzate come leganti pittorici) costituite quasi esclusivamente da collagene. Una classificazione in base all'origine d'estrazione divide le colle in tre categorie: colla di pelle, estratta da cascami di pelli animali e da altre parti cartilaginee; colla d'ossa, estratta dalle ossa dei mammiferi e colla di pesce, estratta da varie parti dei pesci.

La proteina presente nelle colle è il collagene, una proteina semplice della classe degli albuminoidi (Stryer, 1975) presente nelle ossa e nei tessuti connettivi dei vertebrati in percentuale variabile ma con un valore medio dell'80% (Wolf, 2006; Olivo, 2002; Hickman, 2000). Quando viene scaldato in acqua acidificata a 80°-90°C il collagene solubilizza parzialmente e tale frazione, quasi incolore ed amorfa, viene chiamata con il termine generico di gelatina. Non esiste un tessuto formato solo da collagene in quanto esso si trova sempre associato ad altre proteine (cheratina, elastina, mucina ecc.).

Il collagene ha una struttura rigida (grazie alla presenza di specifici amminoacidi quali prolina e idrossiprolina) a tripla elica in quanto costituita da tre catene polipeptidiche, il tropocollagene. Il tropocollagene (Fig.5) è l'unità monomerica, una proteina di 285 KDalton, formato da tre catene polipeptidiche con andamento sinistrorso che si associano a formare una tripla elica destrorsa.

Poiché le tre catene sono diverse fra loro per sequenza amminoacidica, esistono diverse famiglie di collagene la più abbondante delle quali è il collagene di tipo I: due

catene  $\alpha_1$  e una catena  $\alpha_2$ . Le catene peptidiche sono del tipo Gly-X-Y dove X e Y sono gli amminoacidi prolina e idrossiprolina. I filamenti di tropocollagene sono tenuti insieme da legami idrogeno tra il gruppo ossidrilico dell'idrossiprolina e l'idrogeno della glicina. Infine la fibra di collagene si forma tramite l'instaurarsi di legami covalenti tra le fibre di tropocollagene.

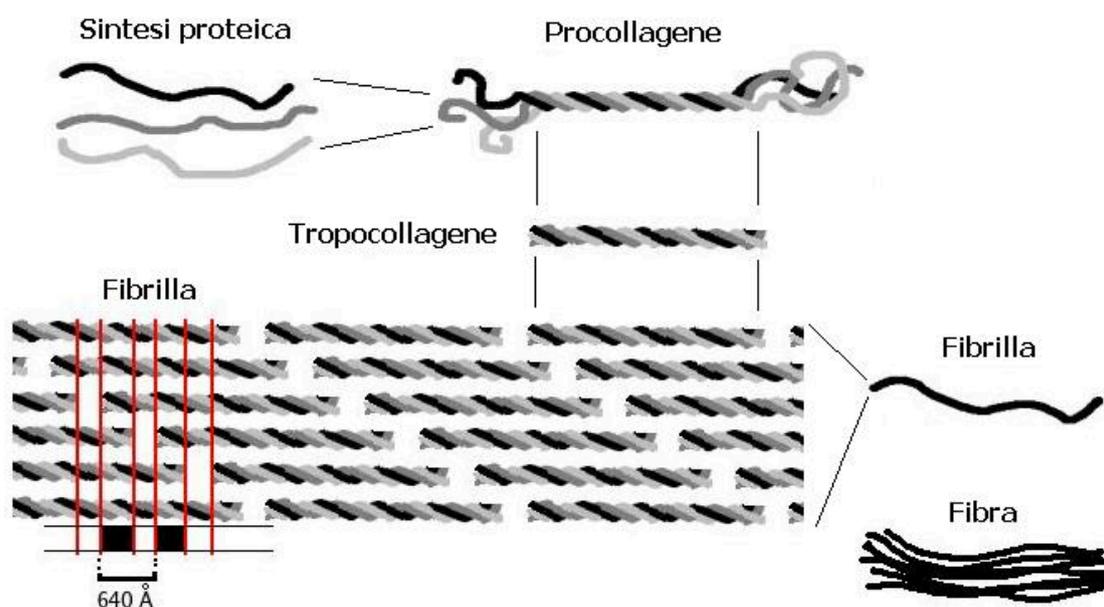


Figura 5 Formazione di una fibra di collagene a partire dalle catene polipeptidiche.

#### *Preparazione e caratteristiche delle colle*

Al contrario dell'uovo, le colle formano soluzioni colloidali acquose reversibili. Le soluzioni di colla vengono ottenute rigonfiando i pezzi di materiale in acqua a freddo con successivo riscaldamento moderato per completarne la solubilizzazione.

I processi alterativi delle colle utilizzate negli strati preparatori e pittorici sono in gran parte riconducibili all'acqua sotto forma di umidità e si possono classificare in tre tipologie diverse: (a) di natura fisica, in cui la variazione di umidità causa rigonfiamento e ritiro negli strati preparatori portando ad una perdita di coesione, adesione e formazione di *craquelures*; (b) di natura chimica, per i quali l'acqua assume il ruolo di reattivo generando reazioni idrolitiche o degenerative del collagene fino ad una graduale perdita di proprietà leganti e meccaniche; (c) di natura microbiologica, favoriti dalla presenza di umidità.

### *1.3.3 Caseina*

La tempera a caseina (principalmente sottoforma di caseinato d'ammonio) è stata scarsamente utilizzata come medium pittorico a causa della rapidità dei processi degenerativi che subisce nel tempo quali la tendenza del film a screpolarsi e a diventare fragile. A livello pittorico questa problematica implica una stesura della caseina in strati molto sottili.

La caseina non è solubile in acqua a pH acido e neutro, per renderla tale è necessario farla reagire con gli alcali con cui forma i caseinati. I caseinati più usati sono quelli di ammonio (utilizzato come legante in pittura murale a tempera) ottenuto da caseina e ammoniaca o caseina e ammonio carbonato, e quello di calcio (insolubile e tenace, usato quindi come consolidante ed adesivo) ottenuto da caseina e idrossido di calcio. La caseina non può essere quindi utilizzata direttamente per disperdere i pigmenti ma necessita di una solubilizzazione in ambiente fortemente basico (pH>9).

#### *Composizione della caseina*

La caseina è una fosfoproteina contenuta nel latte (82%) come sale calcico sotto forma di dispersione colloidale. Essa è una proteina fosforilata contenente circa l'1% di fosforo sottoforma di acido fosforico esterificato con il gruppo ossidrilico della serina. La caseina è un aggregato di più frazioni caseiniche associate in micelle:  $\alpha_{S1}$ -caseina (MW = 23600 dalton),  $\beta$ -caseina (MW = 24000 dalton) e k-caseina (MW = 19000). Le diverse caseine si associano formando inizialmente sub-micelle di diametro di 15-20 nm, attraverso interazioni idrofobiche ed elettrostatiche. Le sub-micelle si associano a loro volta per formare micelle con diametro maggiore di circa 50-300 nm. La k-caseina in quanto idrofila, al contrario delle altre due altamente idrofobiche, si localizza quindi sulla superficie della micella garantendone una certa stabilità. L'assenza di ponti disolfuro causano la mancanza di una struttura terziaria che porta alla formazione di complessi colloidali abbastanza grandi e insolubili in acqua poiché molti residui idrofobici sono esposti all'esterno della proteina potendosi associare a residui di altre caseine.

### Preparazione della caseina

Un metodo, utilizzato nella tradizione, per ricavare la caseina dal latte consiste nel prendere mezzo litro di latte di vacca fresco e mettervi 3 mL di acido acetico glaciale. La miscela viene quindi fatta bollire in modo che con il calore il latte si rappigli e si separi il cacio dal siero. Il latte così trasformato viene filtrato ed il residuo viene lavato prima con mezzo litro di acqua calda a 60-70°C, per discioglierne la parte burrosa, e dopo una seconda filtrazione con dell'acqua fredda. Il residuo bianco che si ottiene dopo essiccazione in stufa a 50°C è la caseina.

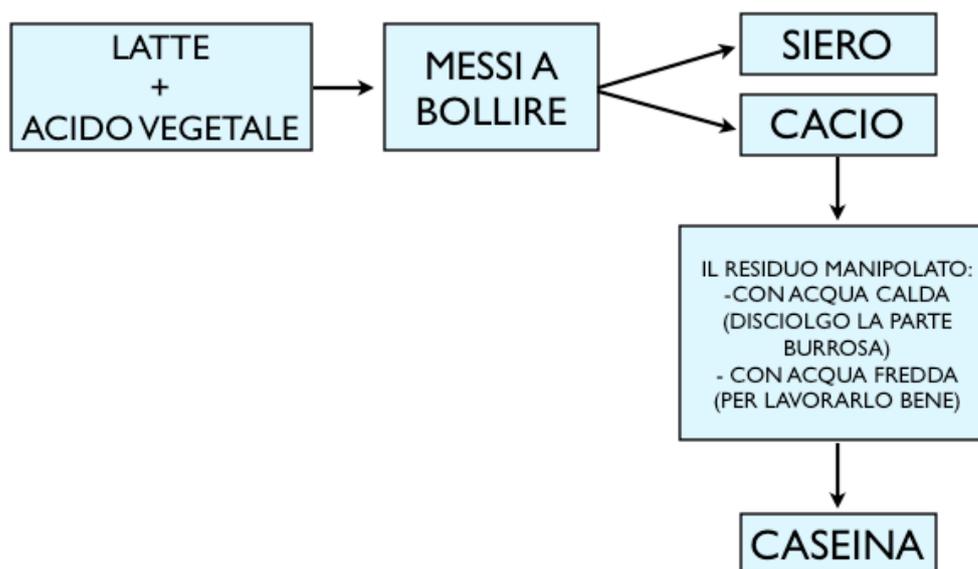


Figura 6 Processo di preparazione della caseina partendo dal latte.

### 1.4 Tecniche analitiche

Diverse tecniche analitiche sono state utilizzate e riportate in letteratura per la caratterizzazione dei leganti pittorici di natura proteica (Fremout, 2009). I test istochimici e le tecniche spettroscopiche (FTIR, NIRS e micro-Raman) permettono di distinguere le classi di leganti (oli, proteine ecc.), ma non la tipologia di legante all'interno della stessa classe. Le tecniche cromatografiche (GC, HPLC, Py-GC) accoppiate a spettrometria di massa e, più recentemente tecniche ESI-MS e MALDI-TOF, permettono l'identificazione

dei leganti rispettivamente in base alla composizione amminoacidica e alla sequenza peptidica ottenuta per digestione della proteina stessa. La microscopia d'immunofluorescenza (IFM) permette di identificare le proteine presenti nel campione e la loro ubicazione grazie all'alta specificità dell'interazione anticorpo-antigene (Vagnini, 2008).

#### *TEST MICROCHIMICI E IMMUNOLOGICI*

Questi test si effettuano su sezioni trasversali di campioni precedentemente inglobati in resina e si basano su reazioni colorimetriche dovute all'affinità di specifici gruppi funzionali del materiale analizzato nei confronti di coloranti organici che fungono da reagenti. I vantaggi di questa tecnica sono: la facilità di esecuzione, il fatto di non essere una tecnica distruttiva e la possibilità di identificare e localizzare il materiale proteico nei vari strati. I limiti principali sono invece: la possibilità di assorbimento del colorante da parte di altre componenti (es. resina per inglobare), l'interferenza colorimetrica legata ai pigmenti presenti e la mancanza di specificità in quanto non si possono discriminare materiali appartenenti alla stessa classe (es. l'uovo dalle colle e dalla caseina).

Le più recenti tecniche immunologiche si possono considerare un'evoluzione dei metodi microchimici nello studio dei materiali proteici. Esse si basano sulla specificità della reazione antigene-anticorpo che avviene naturalmente quando un agente immunizzato (proteina) stimola un'immuno risposta in un organismo generando anticorpi che sono in grado di legare l'antigene. Questa metodica è altamente specifica, permette la discriminazione di colle animali, uovo, caseina e gomma arabica direttamente sulla *cross section*. In questo caso gli svantaggi sono dovuti a problemi d'interferenza delle componenti inorganiche e al deterioramento del campione a causa del prolungato contatto con soluzioni aggressive (Vagnini, 2008).

#### *TECNICHE SPETTROSCOPICHE*

Delle tecniche spettroscopiche fanno parte la spettroscopia UV-visibile, la spettroscopia infrarossa e la spettroscopia Raman.

La spettroscopia UV è una tecnica non distruttiva basata sull'assorbimento selettivo da parte delle molecole quando sono irradiate da radiazioni con lunghezza d'onda comprese tra i 10 e 780 nm. I materiali di natura proteica possiedono lunghezze d'onda d'assorbimento specifiche con una fluorescenza caratteristica di colore grigio-azzurra (Campanella *et al.* 2007).

La spettroscopia infrarossa (FTIR) permette di ottenere spettri di assorbimento in cui le lunghezze d'onda delle bande dipendono dai legami presenti nelle molecole analizzate e sono caratteristiche di ogni sostanza. È pertanto possibile ottenere informazioni di base relative alla classe dei composti organici (es. legame ammidico caratteristico delle proteine).

La spettroscopia Raman si basa invece sull'interazione tra un raggio monocromatico con l'analita e la registrazione dei fotoni emessi a lunghezze d'onda differenti rispetto a quella del raggio. Essa fornisce risultati ottimali per lo studio di materiali inorganici e dei coloranti organici (tramite ad esempio la tecnica SERS - Surface Enhanced Raman Spectroscopy) ma non è adatta per la caratterizzazione dei leganti proteici.

### *TECNICHE CROMATOGRAFICHE*

La loro elevata capacità di separare composti chimici presenti in miscele complesse unita alle proprietà di identificare i medesimi composti tramite rivelatori a spettrometria di massa, le ha rese le tecniche più ampiamente utilizzate nell'analisi di materiali organici costituenti opere d'arte.

Per caratterizzare i materiali proteici si procede solitamente con l'idrolisi acida delle proteine e successiva determinazione del profilo amminoacidico. La tecnica analitica maggiormente utilizzata è la gas cromatografia anche se in letteratura si riportano alcune difficoltà. I tempi di preparazione sono infatti particolarmente lunghi; i materiali proteici di origine biologica diversa hanno una simile composizione amminoacidica e pertanto difficilmente distinguibili (es. colle); alcuni leganti polisaccaridici, spesso utilizzati in concomitanza di quelli proteici, contengono fino ad un 3% di proteine, e pertanto si altera il risultato delle analisi in quanto basato sul rapporto di amminoacidi. Infine la presenza dei cationi inorganici dei pigmenti e della preparazione creano complessi stabili con

amminoacidi e quindi interferiscono con la loro determinazione.

Le tecniche cromatografiche vengono comunemente accoppiate con analizzatori di massa. Gli spettrometri di massa sono in grado di separare ioni atomici o molecolari in base al loro rapporto massa/carica. I composti vengono ionizzati, i diversi ioni prodotti vengono separati e rilevati ottenendo uno spettro di massa che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione al loro rapporto  $m/z$ . Essa viene applicata con buoni risultati alle analisi di proteine presenti in campioni pittorici.

### **1.5 Obiettivo**

Viste le premesse nel presente lavoro si è quindi cercato di valutare diverse metodiche che permettano l'estrazione della maggior quantità possibile di proteina presente in un legante proteico da un campione pittorico. Poiché la quantità di campione disponibile è ridotta e il contenuto di legante organico è solitamente inferiore al 10%, l'interesse è quello di estrarre la maggior quantità di proteina possibile che sia poi disponibile all'analisi, al fine di ottenere il più ampio numero di informazioni.

Per fare questo si confronteranno diverse metodiche di estrazione lavorando in ambiente a pH acido (acido trifluoroacetico), basico (ammoniaca) e con prodotti denaturanti (sodio dodecilsolfato). Le diverse metodiche saranno valutate procedendo alla quantificazione delle proteine estratte mediante due kit colorimetrici (Bradford e Bicinchoninc Acid Protein Assay) con successiva lettura tramite spettrofotometro UV-VIS.

## **CAPITOLO 2**

### **ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE**

La fase di estrazione di proteine da un campione pittorico è di fondamentale importanza perché permette di rimuovere le sostanze interferenti ovvero le specie inorganiche provenienti dal supporto e dai pigmenti. Questa è resa difficile dalle interazioni con il substrato inorganico e dalla bassa solubilità del materiale proteico dovuta principalmente a processi di denaturazione (Ronca, 1994).

#### **2.1 Estrazione in condizioni denaturanti e non denaturanti**

##### *2.1.1 Condizioni non denaturanti*

In letteratura vengono riportati numerosi lavori nei quali si affronta il problema di trovare una metodica estrattiva efficiente per tutti i leganti pittorici di natura proteica. Ronca (Ronca, 1994) riporta come miglior metodo estrattivo, nel caso di tuorlo e caseina, l'impiego di NaOH 1 N con riscaldamento del campione a 80°C per 180 minuti. Questo metodo viene riportato anche da Manzano *et al.* (Manzano, 2000) con una resa di circa 1 µg/mg di estratto. Tuttavia questa metodica può creare problemi in quanto è inefficiente in presenza di sali solubili ed introduce un elevato contenuto di sodio il quale può interferire con le successive reazioni di derivatizzazione necessarie per l'analisi GC-MS (Bonaduce, 2009). Molto utilizzata è stata anche la doppia estrazione con NH<sub>3</sub> 2.5 M (Colombini, 1999) ma anch'essa può essere inefficiente con alcuni sali solubili come gesso o alcuni pigmenti contenenti rame e mercurio (Bonaduce, 2009). Tokarski *et al.* invece di estrarre con HCl, NaOH e NH<sub>3</sub> che possono degradare selettivamente gli amminoacidi; propongono un'estrazione che prevede l'utilizzo di una resina sintetica macinata insieme al campione in una soluzione acquosa acidificata con TFA 1%, da sottoporre

successivamente ad un bagno ultrasuoni per 45 minuti al fine di separare le proteine dai pigmenti inorganici (Tokarski, 2006). Altre procedure analitiche utilizzate per sopprimere la presenza di specie inorganiche possono essere estrazioni con resine a scambio ionico ed estrazioni con agenti chelanti (Gautier, 2007).

### *2.1.2 Condizioni denaturanti*

La denaturazione è un fenomeno chimico che consiste nel cambiamento della struttura proteica nativa con conseguente perdita dell'originaria struttura tridimensionale della molecola senza che ne vengano compromessi i legami peptidici (la struttura primaria non ne risulta modificata). La denaturazione porta le proteine ad esporre e rendere reattivi alcuni gruppi funzionali grazie ai quali si possono formare dei legami intramolecolari che portano all'aggregazione di più molecole proteiche. La denaturazione può avvenire con l'aumentare della temperatura, con la variazione di concentrazione salina o ad alte concentrazioni di sostanze denaturanti come SDS, urea e guanidina cloruro.

Il sodio dodecilsolfato (SDS) è un tensioattivo anionico; la molecola è costituita da una coda idrofoba di 12 atomi di carbonio unita ad un gruppo idrofilo solfato. L'SDS denatura la proteina rompendone i legami non covalenti e facendole perdere la sua forma nativa. Le proteine reagiscono con l'SDS per formare complessi carichi negativamente secondo un rapporto per cui ogni molecola di SDS si lega a due amminoacidi. Dal legame con l'SDS si viene a formare una repulsione elettrostatica che causa la denaturazione della proteina la quale assume una struttura filiforme. In letteratura si trovano varie concentrazioni di SDS per la denaturazione delle proteine che vanno da 0.1 a 10 mM. Nello specifico una soluzione di SDS 2 mM viene indicata da Gudiksen *et al.* per l'ovalbumina (Gudiksen, 2006).

## **2.2 Metodi di quantificazione**

### *2.2.1 Spettrofotometria UV-VIS*

I metodi spettroscopici si basano sulla misura della quantità della radiazione prodotta o assorbita dalle specie molecolari o atomiche d'interesse. Questi metodi vengono classificati in base alla regione dello spettro elettromagnetico coinvolta nella misura. Le

regioni dello spettro utilizzate sono quelle dei raggi  $\gamma$ , dei raggi X, dell'ultravioletto (UV), del visibile, dell'infrarosso (IR), delle microonde e delle radiofrequenze (RF). Solitamente il campione viene stimolato mediante l'uso di energia sotto forma di calore, di energia elettrica, di luce, di particelle o di reazione chimica. Prima della stimolazione l'analita si trova prevalentemente nel suo livello di energia più basso o stato fondamentale. L'applicazione dello stimolo fa sì che alcune specie dell'analita passino ad uno stato energetico più alto o stato eccitato. Si possono acquisire informazioni sull'analita misurando la radiazione elettromagnetica emessa per ritornare allo stato fondamentale o misurando la quantità di radiazione elettromagnetica assorbita come risultato dell'eccitazione. Queste sono infatti caratteristiche dell'analita stesso.

Ogni specie molecolare è in grado di assorbire frequenze caratteristiche della radiazione elettromagnetica, tale processo trasferisce l'energia alla molecola producendo una diminuzione nell'intensità della radiazione elettromagnetica incidente. L'assorbimento della radiazione attenua il raggio secondo la legge di Lambert-Beer che spiega in maniera quantitativa come la quantità di radiazione attenuata dipende dalla concentrazione delle molecole che assorbono e dal cammino ottico nel quale avviene l'assorbimento. In particolar modo l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione della specie assorbente  $c$  e alla lunghezza del cammino ottico  $b$  del mezzo assorbente, secondo una costante di proporzionalità  $a$  (assorbanza specifica).

$$A = abc$$

La spettroscopia molecolare di assorbimento nell'ultravioletto/visibile è utilizzata soprattutto per l'analisi quantitativa. Un primo passo in un qualunque metodo spettrofotometrico è lo sviluppo di condizioni che producano una relazione riproducibile tra assorbanza e concentrazione dell'analita. Per ottenere la massima sensibilità le misure di assorbanza spettrofotometriche sono ordinariamente eseguite ad una lunghezza d'onda corrispondente ad un picco di assorbimento, che corrisponde al massimo di sensibilità.

Uno spettrofotometro è uno spettrometro che permette la misura del rapporto della potenza radiante (ovvero l'energia di un raggio che raggiunge una determinata area in un determinato tempo) di due fasci, requisito fattore necessario per misurare l'assorbanza. L'assorbanza è infatti uguale al logaritmo negativo della trasmittanza la quale a sua volta è

uguale al rapporto tra potenza radiante in uscita e potenza radiante in entrata, ovvero alla frazione di radiazione incidente trasmessa dalla soluzione.

Uno spettrofotometro UV-VIS è composto principalmente da: una sorgente di energia raggiante che fornisce le lunghezze d'onda che coprono lo spettro UV-visibile; un monocromatore che isola una singola lunghezza d'onda; l'alloggiamento del campione ed il rivelatore. Il campione allo stato liquido viene posto in cuvette trasparenti alla lunghezza d'onda a cui si lavora (esse sono generalmente in vetro, materiale plastico o quarzo). Esistono spettrofotometri a singolo raggio o a doppio raggio. Nei primi il raggio percorre un cammino unico dalla sorgente al rivelatore; mentre i secondi si dividono in sistema a doppio raggio nello spazio e a doppio raggio nel tempo. Il sistema a doppio raggio nello spazio prevede l'impiego di specchi semi riflettenti per sdoppiare il raggio proveniente dal monocromatore e indirizzarlo contemporaneamente all'analita ed al riferimento (bianco), e ricombinare i raggi prima dell'arrivo al rivelatore; il sistema a doppio raggio nel tempo utilizza un chopper posto in rotazione che alterna due fasi riflettenti a due trasparenti (Skoog, 2005; Amandola, 1995; Robinson, 2005).

### *2.2.2 Metodi colorimetrici*

Esistono diversi metodi colorimetrici che permettono di effettuare una quantificazione delle proteine presenti in una soluzione. Il principio base di questi kit consiste sul legame che si instaura fra certi ioni metallici/coloranti e le proteine, secondo uno specifico rapporto di massa. Questi complessi portano alla formazione di soluzioni intensamente colorate e caratterizzate da una specifica lunghezza d'onda d'assorbimento. Inoltre all'interno di uno specifico intervallo di concentrazione dell'analita, questi reagenti generano una banda di assorbimento la cui intensità è proporzionale alla concentrazione delle proteine in soluzione in unità di massa/volume (Copeland, 1994).

In questo lavoro sono stati confrontati due metodi colorimetrici specifici per l'analisi di proteine: il Bradford e il BCA. Per tutti i metodi colorimetrici la scelta della proteina standard per la costruzione della retta di calibrazione influenza fortemente i risultati della concentrazione dell'analita proprio perché ogni proteina è costituita da una sequenza amminoacidica specifica e pertanto da una specifica risposta colorimetrica. Per questo

motivo si consiglia di utilizzare come proteina standard una proteina che si avvicini il più possibile alle caratteristiche dell'analita preso in esame. Quando tutto ciò non è fattibile si usa generalmente la BSA.

### BRADFORD

Questo metodo si basa sul legame che si crea tra le proteine ed il colorante Blu Brillante Coomassie G-250 (Fig.7). Nelle condizioni di pH previste dal metodo Bradford il colorante è presente sotto la sua forma cationica ed ha un'assorbanza specifica a 465 nm. Quando il colorante si lega ad una proteina si stabilizza la forma anionica doppiamente protonata del colorante, la quale ha il massimo di assorbimento a 595 nm, lunghezza d'onda che viene monitorata (Fig.8). Questa procedura è altamente riproducibile e rapida e il legame colorante-proteina mantiene una buona stabilità per circa un'ora.

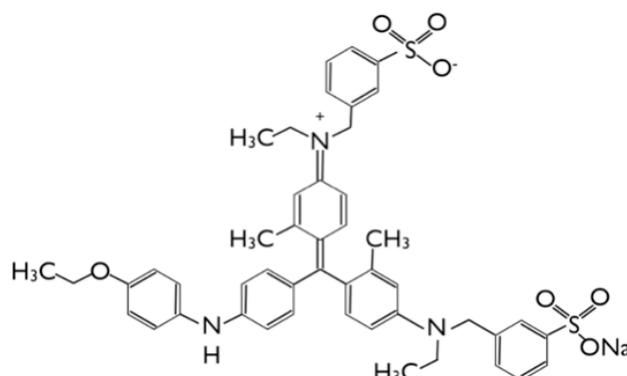


Figura 7 Struttura chimica del Blu Brillante Coomassie G-250.

L'attacco del colorante richiede una forma macromolecolare con alcuni gruppi funzionali reattivi. Le interazioni sono principalmente con l'arginina piuttosto che con i gruppi amminici primari; gli altri residui basici (His, Lys) e aromatici (Try, Tyr e Phe) danno una risposta meno intensa in termini di variazione colorimetrica. Il comportamento del legame che si forma tra colorante e proteina è attribuibile alle forze di Van der Waals ed alle interazioni idrofobiche (Compton, 1985).

Uno dei maggiori vantaggi di questo metodo di analisi è che esso è relativamente insensibile a numerosi reagenti nei quali le proteine vengono comunemente solubilizzate, a

cationi come sodio o potassio e a carboidrati come il saccarosio. In particolare è meno sensibile rispetto al metodo BCA alle sostanze riducenti e a quelle chelanti. Gli unici reagenti che danno un'eccessiva interferenza sono per la maggior parte detergenti come SDS, Triton X-100 e detergenti commerciali per vetreria (Bradford, 1976). Le interferenze si spiegano in termini dell'effetto che hanno i composti sull'equilibrio tra le tre forme del colorante (anionico, cationico e neutro).

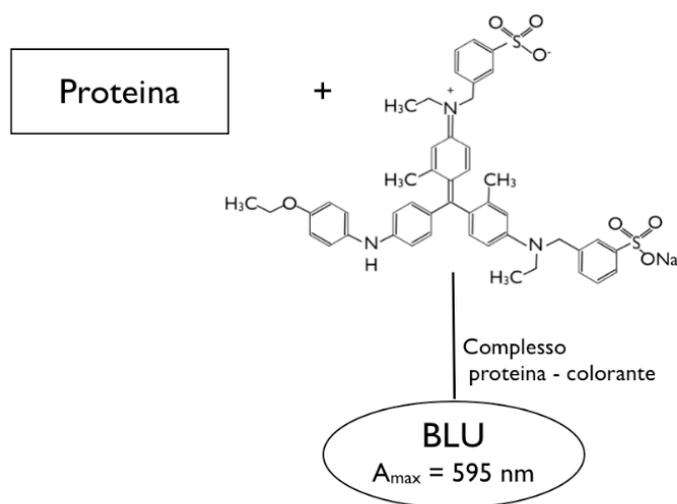


Figura 8 Reazione schematica tra Blu di Coomassie e proteina.

La procedura consiste nel preparare una serie di soluzioni di proteina standard a concentrazione nota per costruire la curva di calibrazione. Tali soluzioni e quella del campione vengono mescolate col reagente secondo un rapporto soluzione della proteina-reagente 1:50 (v/v). Si lascia incubare al buio per cinque minuti e le soluzioni vengono trasferite nelle cuvette e si monitora l'assorbanza a 595 nm (Copeland, 1994).

### BCA

Il BCA è un kit per l'individuazione colorimetrica e la quantificazione delle proteine totali. Questo metodo si basa sulla riduzione di  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  ad opera delle proteine in condizioni alcaline, con individuazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione  $\text{Cu}^+$  usando un reagente che contiene acido bicinconico. La reazione tra BCA e  $\text{Cu}^+$  porta allo sviluppo di un intenso colore viola con un massimo di assorbanza a 562 nm

(Smith, 1985). Questa colorazione è dovuta alla chelazione di due molecole di BCA con uno ione  $\text{Cu}^+$  (Fig.9). L'assorbanza a 562 nm presenta un andamento quasi lineare con l'aumentare della concentrazione di proteina per un ampio intervallo di lavoro (20-2000  $\mu\text{g/mL}$ ).

Questo metodo non ha un vero e proprio punto finale, il colore continua a cambiare ma questo cambiamento è sufficientemente lento da permettere l'analisi contemporanea di un largo numero di campioni.

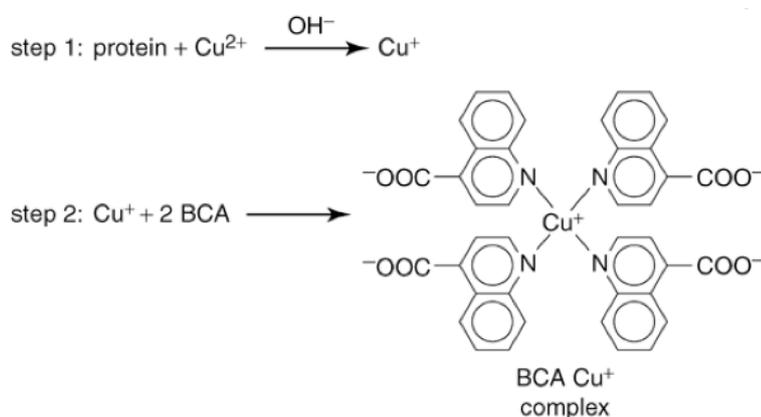


Figura 9 Reazione schematica tra BCA e proteina.

Il colore formato con il BCA è legato alla struttura macromolecolare della proteina, al numero di legami peptidici e alla presenza di quattro particolari amminoacidi (cisteina, cistina, triptofano e tirosina). Siccome la produzione di  $\text{Cu}^+$  in questo esame è funzione della concentrazione delle proteine in soluzione e del tempo d'incubazione, la quantificazione di proteine in campioni sconosciuti può essere determinata spettrofotometricamente tramite confronto con proteine standard a concentrazione nota (Wiechelman, 1988).

Il metodo colorimetrico a base di BCA è utile per la determinazione quantitativa di proteine grazie alla sua elevata sensibilità, facilità e tolleranza ai vari contaminanti presenti in campioni biologici o aggiunti durante la purificazione del campione. Tuttavia altre sostanze, sia naturalmente presenti nel campione sia aggiunte, interferiscono con la metodica del BCA. Si deve infatti considerare che, poiché il metodo coinvolge la riduzione

di  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  ad opera delle proteine, composti riducenti (come DTT, cisteina o zuccheri riducenti) o reagenti chelanti il rame (come EDTA) possono causare interferenze. Altre sostanze che possono interferire sono: acido ascorbico, catecolamina, creatinina, cisteina, EGTA, glicerolo impuro, perossido di idrogeno, idrazide, ferro, lipidi, melibiosio, rosso fenolo, saccarosio impuro, triptofano, tirosina, acido urico (Pierce).

La procedura richiede un rapporto proteina/reagente di 1:20 (v/v). Il reagente corrisponde ad una miscela di un reagente A e un reagente B in un rapporto 50:1 (v/v) dove il reagente A è costituito da carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, acido bicinconinico e tartrato di sodio in idrossido di sodio 0.1 M mentre il reagente B è costituito da solfato di rame al 4%. Dopo aver aggiunto il reagente al campione, si lascia ad incubare a  $37^{\circ}\text{C}$  per 30 minuti. Una volta raffreddate le soluzioni vengono analizzate leggendo l'assorbanza a 562 nm (Fig.10).

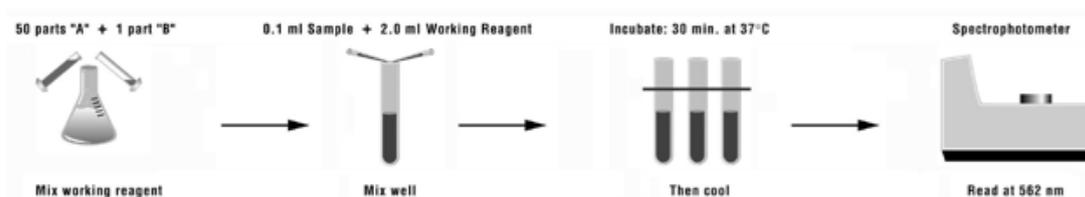


Figura 10 Procedura di analisi con il kit BCA (Thermo scientific - Pierce BCA Protein Assay kit - Instructions).

### NANO ORANGE

Il kit denominato Nano-Orange rappresenta una svolta tecnologica per la quantificazione delle proteine in soluzione, combinando facilità d'uso e ottima sensibilità.

Il campione di proteina viene semplicemente aggiunto al reagente Nano-Orange diluito e scaldato a  $95^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti. Questo reagente non mostra fluorescenza in soluzioni acquose ma a seguito dell'interazione con le proteine presenta un ampio picco di assorbimento centrato a circa 470 nm ed un ampio picco di emissione centrato a circa 570 nm.

L'unicità chimica del reagente Nano-Orange permette un'accurata identificazione di proteine a concentrazione tra 10 ng/mL e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Questo livello di sensibilità è considerevolmente migliore rispetto a quello ottenuto con BCA o Bradford. Tuttavia, l'impegno di *microplate* per l'analisi mediante il kit e il fatto che il range di concentrazione

operativa è molto minore della quantità di legante utilizzata, ne ha limitato l'utilizzo. Si ritiene pertanto che tale metodica sia da tenere in considerazione, eventualmente per l'analisi di campioni reali.

## CAPITOLO 3

### PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 Standard, reagenti e materiale

Albumina di siero bovino (BSA), ovalbumina da bianco d'uovo di pollo (OVA),  $\beta$ -caseina da latte bovino SDS e il reagente Bradford sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich®. Acido trifluoroacetico (TFA), ammonio carbonato e ammoniaca sono stati reperiti dalla Fulka®. Il BCA Protein Assay Kit è stato acquistato dalla Pierce. La colla di pelle, la colla d'ossa, la colla di lapin e la caseina sono stati reperiti dalla Kremer PIGMENTE®. Il giallo d'ocra è stato acquistato dalla Bresciani, il bianco di zinco dalla Dolci mentre i restanti pigmenti (cinabro, gesso, verde smeraldo, verde cromo e rosso di cadmio) e la colla di storione sono stati reperiti dalla CTS srl. L'uovo fresco di gallina è stato acquistato al supermercato. Spettrofotometro UV/Vis Perkin Elmer Lambda 25.

#### 3.2 Preparazione dei modelli pittorici

Inizialmente sono state preparate le varie tipologie di leganti proteici seguendo le antiche ricette (Tab.4).

Legante	Preparazione
Colla di lapin	2 g di granuli di colla vengono lasciati in 25 mL di acqua fino a rigonfiamento. Il tutto viene in seguito riscaldato a circa 50° C a bagnomaria fino a completo scioglimento della colla.
Colla d'ossa	
Colla di pesce	
Colla di pelle	
Tuorlo	Si recupera il tuorlo applicando un piccolo foro sulla pellicola protettiva in modo da evitare residui di albume e lo si stempera in acqua.
Albume	Si monta a neve, lo si lascia riposare una notte, si elimina la schiuma superficiale e si utilizza il liquido rimasto nel fondo.
Caseina	A 20 g di caseina si aggiungono 100 g di acqua e 4 g di ammoniaca in modo da ottenere caseinato d'ammonio. Nell'applicazione si può diluire con ulteriore ammoniaca.

Tabella 4 Procedura di preparazione dei singoli leganti proteici.

Per l'uovo si è diviso il tuorlo dall'albume. Si è recuperato il tuorlo forando la pellicola protettiva eliminando residui di albume e stemperandolo in acqua. L'albume è stato montato a neve e lasciato riposare una notte, quindi è stata eliminata la schiuma superficiale e utilizzato il liquido sul fondo.

Per quanto riguarda le colle ne sono stati mescolati 2 g in 25 mL di acqua, il tutto è stato poi riscaldato a bagnomaria a 50°C fino a scioglimento completo.

Per la caseina, infine, se ne sono aggiunti 20 g in 100 g d'acqua e in 4 g di NH<sub>3</sub> ottenendo il caseinato d'ammonio.

I leganti sono stati in seguito mescolati ai pigmenti in un rapporto pigmento/legante di circa 3:1 w/w. I pigmenti scelti sono: cinabro, verde smeraldo, gesso, rosso di cadmio, verde cromo, ocre gialla, bianco di zinco (Tab.5). La scelta è ricaduta sui pigmenti sopracitati in quanto i corrispettivi ioni Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> possono creare complessi stabili con le proteine. Inoltre il verde smeraldo è stato scelto anche per valutare l'interferenza degli ioni Cu<sup>2+</sup> con il BCA.

Supporti	Leganti	Pigmenti
Vetrino	Albume	Giallo Ocre (silicoalluminati e ossidi di ferro idrati Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O)
	Tuorlo	Bianco di Zinco (ZnO)
Intonaco (CaCO <sub>3</sub> )	Caseina	Cinabro (HgS)
	Colla di Lapin	Gesso (CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)
Gesso e colla (CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Colla di Pesce	Verde Smeraldo (Cu(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> · 3Cu(AsO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> )
	Colla di Pelle	Verde di Cromo (Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
	Colla d'Ossa	Rosso Cadmio (CdS(Se))

**Tabella 5 Combinazioni di leganti, supporti e pigmenti utilizzati nei modelli pittorici.**

Le varie miscele legante-pigmento sono state stese su diverse tipologie di supporti: vetrino, gesso e colla, intonaco (Fig.11). Le stesure sono state lasciate a contatto con l'aria, a temperatura ambiente per circa una settimana ed è stato quindi prelevato, tramite bisturi, circa 1 mg di campione per ogni stesura.

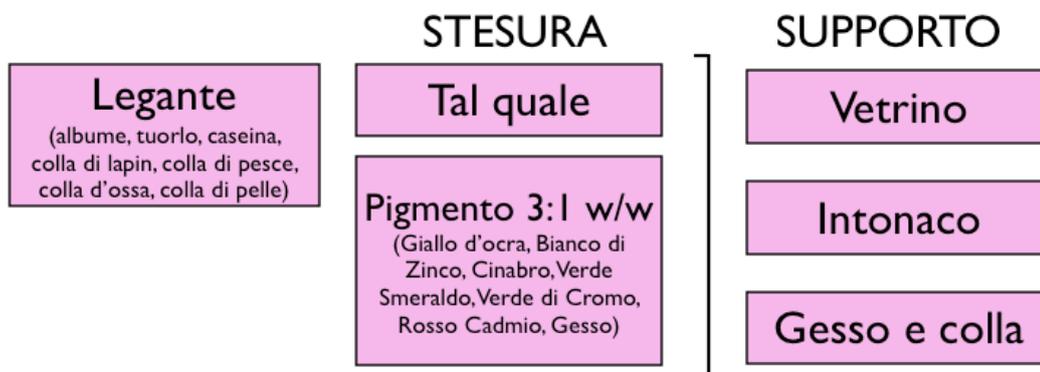


Figura 11 Schematizzazione delle tipologie di modelli pittorici preparati in laboratorio.

### 3.3 Preparazione proteine standard e rette di calibrazione

Al fine di riprodurre il comportamento delle proteine prese in esame con il corrispettivo kit colorimetrico, sono state preparate le rette di calibrazione con BSA, OVA,  $\beta$ -caseina e i vari tipi di colle (lapin, d'ossa, di storione e di pelle) in tutti i tipi di fasi estraenti. Per ogni proteina standard è stata preparata una soluzione di 1mg/mL nella fase estraente desiderata e si sono fatte le successive diluizioni per creare i punti della retta: per il BCA da 20 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , mentre per il Bradford da 75 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3.4 Protocolli

#### *Protocollo in ambiente acido (TFA 1%)*

Al campione prelevato (circa 1 mg) si aggiungono 250  $\mu\text{L}$  di TFA 1%, quindi si lascia in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti e si centrifuga a 10000 giri per tre minuti in modo da poter separare il surnatante dal precipitato (frazione inorganica); il surnatante viene quindi analizzato per via colorimetrica nello spettrofotometro UV/Vis.

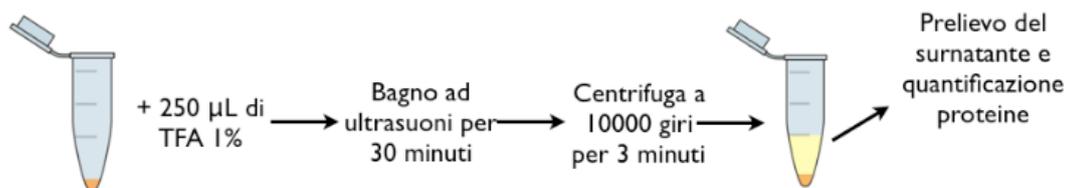


Figura 12 Protocollo di estrazione con TFA 1%.

*Protocollo in ambiente alcalino (NH<sub>3</sub> 2.5M)*

Nel caso del protocollo in ambiente alcalino si è deciso di effettuare una tripla estrazione. 250 µL di soluzione estraente vengono aggiunti al campione che viene poi sottoposto a bagno ad ultrasuoni per 30 minuti e centrifugato per tre minuti a 10000 giri in modo da dividere il surnatante dal precipitato. Dal surnatante si prelevano due aliquote di 100 µL ciascuna. Al precipitato si aggiungono nuovamente 250 µL di NH<sub>3</sub> e si ripetono le stesse operazioni descritte precedentemente in modo da avere tre estrazioni finali.

Un'aliquota di ogni estrazione viene analizzata subito, l'altra viene sommata alle altre due, portate a secco e quantificate.

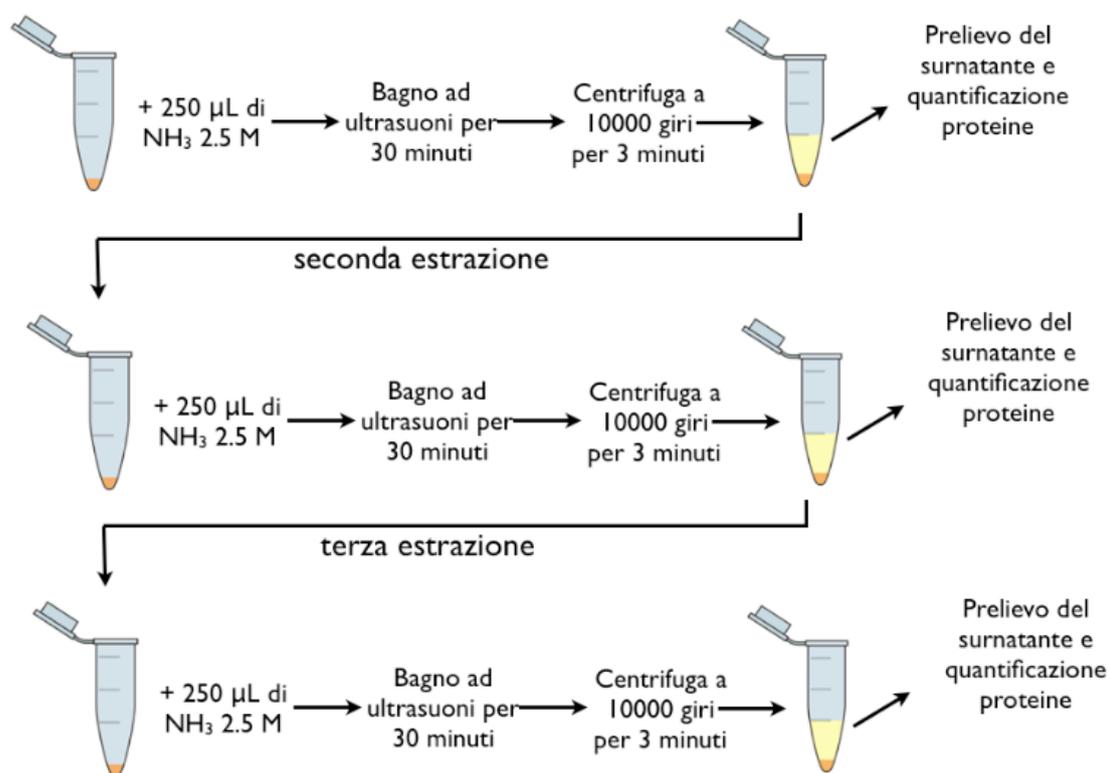


Figura 13 Protocollo di estrazione con NH<sub>3</sub> 2.5 M.

*Protocollo in condizioni denaturanti (SDS 2 mM)*

Seguendo i dati riportati in letteratura e facenti riferimento alla denaturazione dell'ovalbumina (Gudikse, 2006), si è deciso di preparare una soluzione di SDS 2 mM in

ammonio carbonato. 250  $\mu$ L di questa soluzione vengono aggiunti ad ogni campione, si lascia sonicare per 30 minuti, si centrifuga a 10000 giri per tre minuti e si preleva il surnatante per la successiva quantificazione.

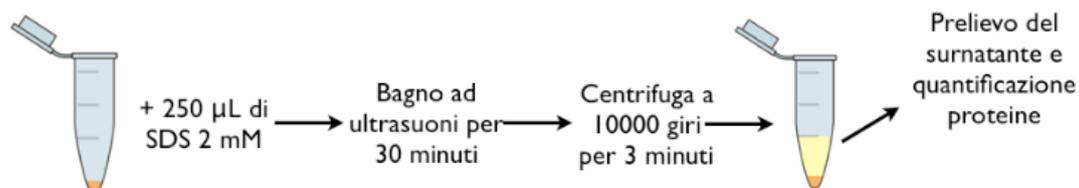


Figura 14 Protocollo di estrazione con SDS 2 mM.

L'SDS è però un tensioattivo e tende a formare una schiuma quando si preleva con la pipetta e quando si aggiunge al campione, questo fatto potrebbe creare problemi per quanto riguarda la quantità di volume esatto prelevato. Per questo motivo si è reso necessario centrifugare per tre minuti a 10000 giri dopo ogni aggiunta di SDS nelle Eppendorf.

L'SDS non assorbe nell'intervallo della radiazione UV (Gudiksen, 2006).

## CAPITOLO 4

### RISULTATI

Partendo dall'obiettivo di trovare il miglior metodo di estrazione delle proteine dai leganti pittorici, si sono confrontati i vari risultati ottenuti dall'applicazione dei tre diversi protocolli.

Tutti i dati di assorbanza riportati corrispondono alla media di tre letture effettuate per ogni campione.

#### 4.1 Scelta del kit colorimetrico

Per scegliere il kit colorimetrico più appropriato si è proceduto all'analisi di tre replicati di proteine standard quali OVA e BSA in acqua tramite i due kit colorimetrici presi in esame: Bradford e BCA.

##### 4.1.1 Determinazione range di linearità

Per determinare i *range* di linearità con i due diversi reagenti si è proceduto alla costruzione di due rette di calibrazione di BSA in acqua lette sia con il Bradford (Fig.15) che con il BCA (Fig.16).

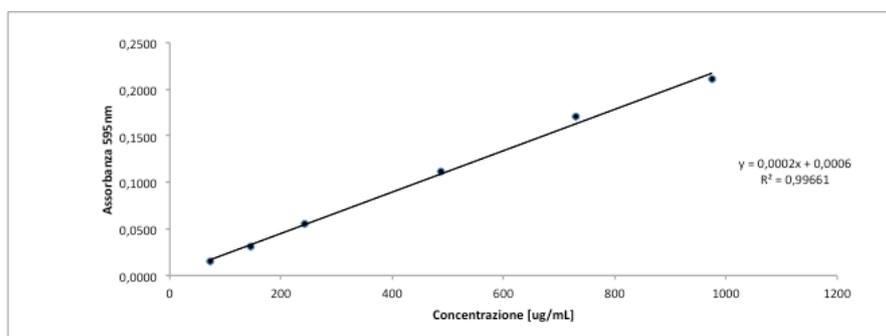


Figura 15 Curva di calibrazione della BSA in acqua con Bradford con punti da 75 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .  $y = 0,0002x + 0,0006$ ,  $R^2 = 0,99661$ .

Come si evince dal confronto delle due curve, il miglior *range* di linearità corrisponde alla retta ottenuta con il BCA; mentre la curva ottenuta con il Bradford mostra un leggero andamento asintotico. Ulteriore elemento a favore del BCA è fornito anche dal valore di  $R^2$  (0.99843) che è leggermente migliore rispetto a quello ottenuto con il Bradford (0.99661). Dalla figura 17 si può notare che la linearità nella curva con BCA viene mantenuta anche al di sotto dei 75  $\mu\text{g/mL}$ .

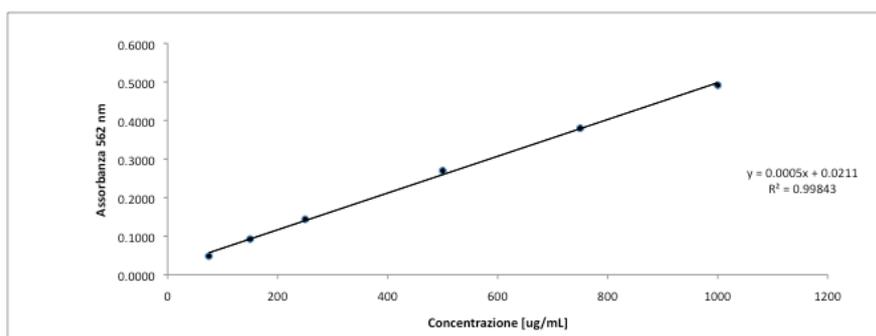


Figura 16 Curva di calibrazione della BSA in acqua con BCA con punti da 75 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .  $y = 0.0005x + 0.0211$ ,  $R^2 = 0.99843$ .

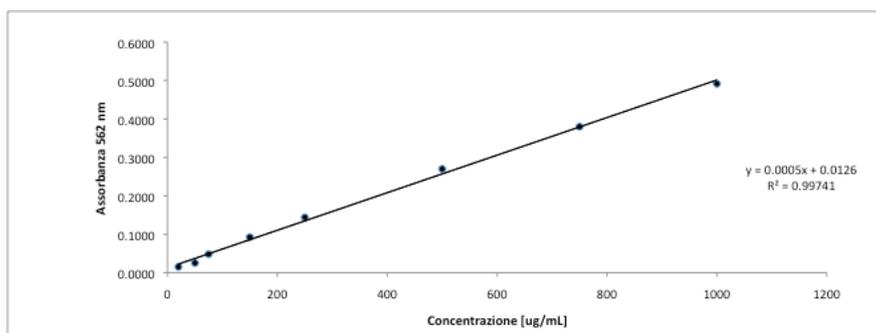


Figura 17 Curva di calibrazione della BSA in acqua con BCA con punti da 20 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .  $y = 0.0005x + 0.0126$ ,  $R^2 = 0.99741$ .

#### 4.1.2 Riproducibilità

Dopo aver fatto le curve di calibrazione si è proceduto ad analizzare i campioni di OVA e di BSA preparati ad una concentrazione nota di 400  $\mu\text{g/mL}$ . Per ogni campione si sono analizzati tre replicati in modo da poter calcolare la rispettiva deviazione standard. I risultati (Tab.6) mostrano che il metodo che prevede la quantificazione tramite BCA è più riproducibile del Bradford, poiché ha una deviazione standard minore, inoltre consente di ottenere un intervallo di concentrazioni maggiore per la costruzione della retta di

calibrazione.

	<b>Bradford</b>	<b>BCA</b>
<b>OVA</b>	8.08%	0.79%
<b>BSA</b>	7.35%	0.86%

Tabella 6 RSD% di OVA e BSA in acqua analizzate con Bradford e con BCA.

Viste queste considerazioni, è stato scelto il kit BCA per eseguire la quantificazione delle proteine estratte.

#### 4.1.3 Interferenza dei pigmenti con i reattivi

Vista la natura complessa di un campione pittorico e la possibilità che la frazione inorganica sia recuperata con il surnatante, si è reso necessario valutare l'interferenza dei pigmenti con i corrispettivi reattivi dei due kit colorimetrici. A questo proposito a circa 600 µg di ogni pigmento si è aggiunto 1 mL di reattivo e si è effettuata la lettura alla corrispettiva lunghezza d'onda di assorbimento. Dai risultati di queste prove non appare nessuna interferenza diretta ad eccezione del rosso di cadmio mescolato con il BCA (Tab.7). Bisogna tuttavia considerare che difficilmente particelle di pigmento sono presenti nella soluzione proteica estratta.

<b>Pigmento</b>	<b>Assorbanza media (Bradford)</b>	<b>Assorbanza media (BCA)</b>
Bianco di Zinco	-0.033	0.0168
Giallo Ocra	-0.041	0.0063
Rosso Cadmio	-0.051	<b>0.7244</b>
Verde Cromo	-0.048	0.0126
Verde Smeraldo	-0.064	0.0066
Gesso	-0.039	0.0076
Cinabro	-0.048	0.0100

Tabella 7 Interferenza pigmenti con Bradford e BCA, posti in ultrasuoni per un'ora.

Si è inoltre analizzato il surnatante ottenuto da circa 600 µg di pigmento in 250 µL di acqua, lasciati in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti e successivamente centrifugati a 10000 giri per tre minuti. Questa analisi è stata fatta per simulare la procedura di estrazione dei protocolli con TFA, NH<sub>3</sub> e SDS e valutare se i vari pigmenti rimangono nel surnatante ed interferiscano con i reagenti dei due kit colorimetrici. I risultati (Tab.8) sembrano non riportare interferenze significative da parte dei pigmenti sia per quanto riguarda il Bradford che il BCA.

<b>Pigmento in H<sub>2</sub>O</b>	<b>Assorbanza media (Bradford)</b>	<b>Assorbanza media (BCA)</b>
Bianco di Zinco	0.0030	-0.0110
Giallo Ocra	0.0032	-0.0060
Rosso Cadmio	0.0058	-0.0010
Verde Cromo	0.0064	-0.0190
Verde Smeraldo	0.0054	0.0000
Gesso	0.0028	0.0004
Cinabro	0.0059	-0.0080

**Tabella 8** Interferenza pigmenti in acqua posti in ultrasuoni per mezz'ora, centrifugati e analisi del surnatante con Bradford e con BCA.

#### *4.1.4 Quantificazione proteina standard in presenza di pigmenti*

Per valutare l'interferenza che i pigmenti potrebbero dare durante la quantificazione delle proteine con i kit colorimetrici, si è preparata una soluzione 400 µg/mL di BSA in acqua. A 600 µL di tale soluzione sono stati aggiunti 600 µg di ogni pigmento scelto in modo da ottenere un rapporto proteina/pigmento 1/3 w/w che riproducesse la tipica composizione di un campione pittorico.

Questi campioni ed un campione di sola BSA 400 µg/mL, utilizzata come riferimento, sono poi stati analizzati sia col Bradford che con il BCA. Dai risultati ottenuti con entrambi i kit (Tab.9) i pigmenti non sembrano dare sostanziali interferenze.

<b>BSA + Pigmento</b>	<b>Concentrazione [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>] (con Bradford)</b>	<b>Differenza con BSA% (con Bradford)</b>	<b>Concentrazione [<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>] (con BCA)</b>	<b>Differenza con BSA % (con BCA)</b>
BSA 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$	401	-	428	-
Bianco di Zinco	395	98.5	389	90.8
Giallo Ocra	373	93.0	427	99.7
Rosso Cadmio	374	93.2	418	97.6
Verde Cromo	367	91.5	417	97.4
Verde Smeraldo	428	106.7	429	100.2
Gesso	421	104.9	427	99.7
Cinabro	367	91.5	431	100.7

**Tabella 9** Interferenza BSA/pigmenti posti in ultrasuoni per un'ora e analizzati con Bradford e con BCA.

## 4.2 Protocollo in condizioni acide

Per tutti i protocolli impiegati, al fine di valutare in modo corretto la *recovery* proteica è necessario eliminare dal peso complessivo del campione prelevato la percentuale di pigmento presente in modo da ottenere solo la quantità di legante utilizzato; così come è necessario eliminare la quantità d'acqua presente al momento della stesura. Una volta ottenuto il valore della quantità di legante sul secco bisogna infine eliminare la percentuale di tutte le sostanze presenti in esso all'infuori delle proteine.

### 4.2.1 Albume

Le estrazioni eseguite con TFA 1% per l'albume riportano *recovery* relativamente basse (al di sotto del 50%) eccetto il campione di albume e gesso su vetrino (51.7%). In generale la quantità di proteina estratta è maggiore per i campioni stesi su vetrino e minore per quelli stesi su intonaco.

Come proteina standard per la costruzione della curva di calibrazione è stata utilizzata l'OVA essendo la proteina contenuta in percentuale maggiore nel bianco d'uovo ( $R^2 = 0.99854$ ).

Di seguito sono riportati i diversi risultati suddivisi per tipologia di supporto.

*VETRINO*

Come si può osservare in tabella 10, le *recovery* dei campioni di albume tal quale e con i vari pigmenti su vetrino hanno valori compresi in un intervallo che va dal 17.8% al 51.7%. Le *recovery* più alte (attorno al 50%) si osservano per i campioni di albume con pigmenti quali gesso, verde smeraldo e rosso di cadmio.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	29.5
Ocra Gialla	32.0
Bianco di Zinco	30.5
Cinabro	22.0
Gesso	51.7
Verde Smeraldo	49.9
Verde di Cromo	17.8
Rosso di Cadmio	46.6

**Tabella 10** *Recovery %* campioni di albume su vetrino estratti con TFA 1% e analizzati con BCA.

*INTONACO*

Per quanto riguarda invece i campioni di albume su intonaco (Tab.11) le *recovery* sono molto più basse (tra 1.8% e 21.6%) rispetto ai risultati ottenuti dai campioni depositati su vetrino. Anche in questo caso, come per i campioni su vetrino, rosso di cadmio, verde smeraldo e gesso mostrano i valori più alti (>15%).

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	11.5
Ocra Gialla	9.3
Bianco di Zinco	1.8
Cinabro	14.3
Gesso	16.8
Verde Smeraldo	19.7
Verde di Cromo	12.7
Rosso di Cadmio	21.6

**Tabella 11** *Recovery %* campioni di albume su intonaco estratti con TFA 1% e analizzati con BCA.

*GESSO E COLLA*

Anche nel caso di campioni di albume stesi su una preparazione a gesso e colla, la quantità di proteina estratta è sempre minore del 50% (Tab.12). Gli unici valori che si avvicinano al 50% si riferiscono ai campioni di albume mescolato con verde smeraldo e rosso di cadmio.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	10.2
Ocra Gialla	7.4
Bianco di Zinco	4.4
Cinabro	13.4
Gesso	26.0
Verde Smeraldo	43.2
Verde di Cromo	20.6
Rosso di Cadmio	45.4

**Tabella 12** Recovery % campioni di albume su gesso e colla estratti con TFA 1% e analizzati con BCA.

Poiché, com'è possibile constatare, il recupero percentuale di proteina non è mai superiore al 50% per nessuna delle tre le tipologie di supporto, ciò può indurre a pensare che le scarse *recovery* possano dipendere dal metodo di estrazione e non dal tipo di supporto su cui vengono stesi i campioni.

#### 4.2.2 Tuorlo

I campioni di tuorlo estratti con TFA 1% riportano *recovery* abbastanza simili per le stesure su vetrino e per quelle su intonaco, piccole variazioni si possono invece osservare nel caso delle stesure su gesso e colla.

La retta di calibrazione che si è utilizzata per calcolare i valori di proteina estratta dai campioni di tuorlo è stata realizzata utilizzando la BSA come proteina standard ( $R^2 = 0.99874$ ).

#### VETRINO

Nel caso del tuorlo steso su vetrino si ottengono *recovery* superiori al 50% solo per le stesure di tuorlo tal quale e di tuorlo con verde cromo. I campioni di tuorlo con gesso e verde smeraldo presentano valori vicini al 50% e comunque superiori rispetto ai restanti campioni (Tab.13).

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	53.3
Ocra Gialla	16.3
Bianco di Zinco	16.6
Cinabro	14.5
Gesso	46.1
Verde Smeraldo	47.4
Verde di Cromo	68.8
Rosso di Cadmio	10.6

**Tabella 13** Recovery % campioni di tuorlo su vetrino estratti con TFA 1% e analizzati con BCA.

*INTONACO*

Per i campioni di tuorlo su intonaco (Tab.14) si ottengono *recovery* maggiori del 50% solamente per la stesura di tuorlo mescolato con rosso di cadmio e verde cromo.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	20.4
Ocra Gialla	12.1
Bianco di Zinco	25.2
Cinabro	20.7
Gesso	37.8
Verde Smeraldo	39.7
Verde di Cromo	52.2
Rosso di Cadmio	55.1

**Tabella 14** *Recovery %* campioni di tuorlo su intonaco estratti con TFA 1% e analizzati con BCA.

*GESSO E COLLA*

Per quanto riguarda la quantità di proteine estratte dai campioni di tuorlo stesi su gesso e colla (Tab.15) si ha un visibile aumento di *recovery*: tutti i valori sono superiori al 50% ad eccezione delle stesure con il giallo ocra, il bianco di zinco ed il verde cromo. Quest'ultimo, al contrario di quanto osservato per le stesure su vetrino ed intonaco, presenta la *recovery* più bassa (20.6%).

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	58.0
Ocra Gialla	21.0
Bianco di Zinco	40.7
Cinabro	62.9
Gesso	76.7
Verde Smeraldo	77.9
Verde di Cromo	20.6
Rosso di Cadmio	45.4

**Tabella 15** *Recovery %* campioni di tuorlo su gesso e colla estratti con TFA 1% e analizzati con BCA.

*4.2.3 Colle animali*

Nel caso della quantificazione delle proteine estratte da stesure di colle animali sarebbe ideale utilizzare come proteina standard per la costruzione della curva di calibrazione il collagene. Tuttavia essendo il collagene solubilizzante solamente in condizioni fortemente acide e ad alte temperature, si è utilizzata come proteina standard la BSA ( $R^2 = 0.99874$ ).

*VETRINO*

L'estrazione con TFA 1% per tutti i campioni di colle su vetrino, usando come proteina standard la BSA, riporta come risultato tutte le *recovery* pari a zero.

*INTONACO*

Eccetto che per il campione di colla d'ossa con bianco di zinco (119.74%) le *recovery* degli altri campioni non superano il 31%.

*GESSO E COLLA*

In questo caso ad eccezione del campione di colla di pesce con bianco di zinco (64.04%) i restanti campioni su gesso e colla non superano il 41% di proteina estratta.

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery % (su vetrino)</b>	<b>Recovery % (su intonaco)</b>	<b>Recovery % (su gesso e colla)</b>
Lapin + Ocra Gialla	0.02	7.3	11.5
Lapin + Bianco di Zinco	0.02	2.9	19.5
Lapin + Cinabro	0.09	22.5	16.7
Lapin + Gesso	0.03	26.2	1.4
Pesce + Ocra Gialla	0.03	0.0	64.0
Pesce + Bianco di Zinco	0.04	0.0	17.9
Pesce + Cinabro	0.06	22.8	19.8
Pesce + Gesso	0.03	31.0	20.2
Ossa + Ocra Gialla	0.02	27.0	19.4
Ossa + Bianco di Zinco	0.03	119.7	41.2
Ossa + Cinabro	0.03	20.7	28.3
Ossa + Gesso	0.03	14.5	19.2
Pelle + Ocra Gialla	0.03	8.7	
Pelle + Bianco di Zinco	0.02	0.0	
Pelle + Cinabro	0.04	17.5	
Pelle + Gesso	0.03	12.5	

**Tabella 16** *Recovery* % campioni di colle animali su vetrino, su intonaco e su gesso e colla estratti con TFA 1% e analizzati con BCA.

Dai dati riportati in tabella 16 si può desumere che viste le scarsissime *recovery*, soprattutto per i campioni su vetrino, l'utilizzo della BSA come proteina standard per la costruzione della retta di calibrazione per l'analisi delle colle non è adeguato.

Probabilmente le percentuali maggiori osservate per i campioni su gesso e colla sono dettate dalla presenza di colla nella preparazione la quale viene a sua volta estratta.

*4.2.4 Caseina*

Tutti i campioni delle stesure che hanno come legante la caseina estratti con TFA 1%

hanno *recovery* pari a zero perché la caseina è insolubile in condizioni acide. Per questo motivo è risultato anche impossibile costruire la curva di calibrazione con la  $\beta$ -caseina.

### 4.3 Protocollo in condizioni basiche

Visti i risultati non troppo soddisfacenti ottenuti per tutti i leganti con l'estrazione in condizioni acide, si è deciso di eseguire su alcuni campioni di albume e di tuorlo, una tripla estrazione con l' $\text{NH}_3$  2.5 M. Tuttavia, dopo aver osservato come la terza estrazione non migliorasse la *recovery*, si è deciso di eseguire solamente due estrazioni per tutti i campioni. I dati riportati nelle seguenti tabelle corrispondono alla somma delle due estrazioni. Con la seconda estrazione, eccetto casi particolari, non si estrae più del 10% di proteina.

#### 4.3.1 Albume

Oltre il 60% dei campioni d'albume estratti con  $\text{NH}_3$  riportano *recovery* maggiori del 50%. La quantità di proteina estratta è molto bassa per l'albume tal quale steso su intonaco e su preparazione a gesso e colla; valori inferiori al 40% sono stati registrati soprattutto in presenza di bianco di zinco e gesso. Tuttavia nessuna *recovery* è negativa e non si osservano valori sovrastimati. È quindi possibile constatare come i risultati ottenuti con l'estrazione con  $\text{NH}_3$  rispetto all'estrazione con TFA siano decisamente migliori e promettenti. La curva di calibrazione creata con l'OVA come proteina standard riporta  $R^2 = 0.9985$ .

#### VETRINO

Per i campioni di albume su vetrino si ottengono *recovery* superiori al 100% per i campioni con ocra gialla e con cinabro, mentre per il campione con bianco di zinco la quantità di proteina estratta è inferiore al 50%.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	90.8
Ocra Gialla	123.1
Bianco di Zinco	37.8
Cinabro	164.2
Gesso	93.7
Verde Smeraldo	74.7
Verde di Cromo	93.5
Rosso di Cadmio	70.1

Tabella 17 *Recovery %* campioni di albume su vetrino estratti con  $\text{NH}_3$  2.5M e analizzati con BCA.

*INTONACO*

I valori relativi alle stesure su intonaco sono complessivamente più bassi rispetto a quelli ottenuti per le stesure sugli altri due supporti. Percentuali estremamente basse si hanno soprattutto per i campioni di albume tal quale, con bianco di zinco, con gesso e con rosso di cadmio.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	5.1
Ocra Gialla	74.2
Bianco di Zinco	12.9
Cinabro	79.9
Gesso	8.3
Verde Smeraldo	65.9
Verde di Cromo	48.4
Rosso di Cadmio	22.0

**Tabella 18** *Recovery %* campioni di albume su intonaco estratti con NH<sub>3</sub> 2.5M e analizzati con BCA.

*GESSO E COLLA*

Le *recovery* dei campioni di albume su gesso e colla estratti con NH<sub>3</sub> sono tutte buone eccetto che per l'albume tal quale e per l'albume con bianco di zinco. Superiori al 100% sono i valori relativi all'albume con cinabro ed all'albume con gesso.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	10.4
Ocra Gialla	86.7
Bianco di Zinco	33.4
Cinabro	137.9
Gesso	112.2
Verde Smeraldo	60.0
Verde di Cromo	61.1
Rosso di Cadmio	58.3

**Tabella 19** *Recovery %* campioni di albume su gesso e colla estratti con NH<sub>3</sub> 2.5M e analizzati con BCA.

*4.3.2 Tuorlo*

Anche per i campioni di tuorlo l'estrazione con NH<sub>3</sub> 2.5 M garantisce *recovery* maggiori rispetto all'estrazione con il TFA 1%. Per più della metà dei campioni di tuorlo infatti le *recovery* sono maggiori del 50%, e non si riscontrano valori negativi o sovrastimati. Valori molto bassi corrispondono, anche per il tuorlo, alle stesure su intonaco, specialmente in presenza di bianco di zinco, gesso e rosso di cadmio. La curva di calibrazione creata con la BSA come proteina standard riporta  $R^2 = 0.99741$ .

*VETRINO*

Ottime risultano le *recovery* relative ai campioni di tuorlo su vetrino. Non si riesce tuttavia a spiegare la *recovery* così alta nel caso della stesura di tuorlo tal quale.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	144.6
Ocra Gialla	62.5
Bianco di Zinco	109.4
Cinabro	72.6
Gesso	105.8
Verde Smeraldo	50.1
Verde di Cromo	101.0
Rosso di Cadmio	77.5

**Tabella 20** *Recovery %* campioni di tuorlo su vetrino estratti con NH<sub>3</sub> 2.5M e analizzati con BCA.

*INTONACO*

La quantità di proteina estratta è invece molto più bassa per i campioni su intonaco; solo il tuorlo con ocra gialla e con verde smeraldo mostrano percentuali di poco superiori al 50%, rispettivamente del 62.8% e 58.4%.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	26.5
Ocra Gialla	62.8
Bianco di Zinco	13.7
Cinabro	37.2
Gesso	8.9
Verde Smeraldo	58.4
Verde di Cromo	46.8
Rosso di Cadmio	6.8

**Tabella 21** *Recovery %* campioni di tuorlo su intonaco estratti con NH<sub>3</sub> 2.5M e analizzati con BCA.

*GESSO E COLLA*

I campioni di tuorlo su gesso e colla mostrano *recovery* tutte superiori al 50%, tranne per la stesura di tuorlo con il bianco di zinco (29.9%) , ma inferiori al 100%.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	83.9
Ocra Gialla	59.9
Bianco di Zinco	29.9
Cinabro	63.0
Gesso	84.2
Verde Smeraldo	67.1
Verde di Cromo	72.1
Rosso di Cadmio	89.9

**Tabella 22** *Recovery %* campioni di tuorlo su gesso e colla estratti con NH<sub>3</sub> 2.5M e analizzati con BCA.

### 4.3.3 Colle animali

Visti gli scarsi risultati ottenuti utilizzando la BSA per la curva di calibrazione e l'impossibilità di impiegare il collagene standard si è deciso di costruire la curva con lo stesso tipo di colla utilizzato come legante nelle varie stesure da analizzare. Nello specifico si è usata la retta di calibrazione costruita con la colla di coniglio ( $R^2 = 0.99707$ ) anche per calcolare le *recovery* dei campioni di colla di pesce poiché le rette di calibrazione fatte con tale colla non hanno dato valori di  $R^2$  sufficientemente alti né con l'ammoniaca ( $R^2 = 0.99596$ ) né con l'SDS ( $R^2 = 0.97733$ ).

### VETRINO

Per i campioni di lapin su vetrino (Tab.23) si ottengono buoni risultati, tutti con percentuali maggiori del 50%. Solo per il campione di colla di coniglio con gesso la *recovery* del 413.7%, difficilmente spiegabile.

La quantità di proteina estratta per i campioni di colla di pesce su vetrino è ottima andando da un minimo di 77.3% ad un 128.5%.

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Lapin tal quale	117.0
Lapin + Ocra Gialla	152.8
Lapin + Bianco di Zinco	57.4
Lapin + Cinabro	122.9
Lapin + Gesso	413.7
Lapin + Verde Smeraldo	70.9
Lapin + Verde di Cromo	55.4
Lapin + Rosso di Cadmio	74.1
Pesce tal quale	120.6
Pesce + Ocra Gialla	98.1
Pesce + Bianco di Zinco	103.9
Pesce + Cinabro	170.3
Pesce + Gesso	99.8
Pesce + Verde Smeraldo	118.4
Pesce + Verde di Cromo	77.3
Pesce + Rosso di Cadmio	128.5

Tabella 23 *Recovery* % campioni di lapin e di pesce su vetrino estratti con  $\text{NH}_3$  2.5M e analizzati con BCA.

### INTONACO

Soprattutto per quanto riguarda la colla di coniglio si riscontra una maggiore difficoltà nell'estrazione per le stesure su intonaco. Solo la *recovery* del lapin con giallo ocra non si avvicina allo zero, ma il risultato altamente sovrastimato è probabilmente

dovuto ad una contaminazione esterna.

Anche nelle stesure in cui si è utilizzato come legante la colla di pesce, tra i campioni su intonaco l'unico campione che ha una *recovery* alta è quello con il giallo ocra.

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Lapin tal quale	9.0
Lapin + Ocra Gialla	160.3
Lapin + Bianco di Zinco	0.0
Lapin + Cinabro	0.0
Lapin + Gesso	0.0
Lapin + Verde Smeraldo	24.9
Lapin + Verde di Cromo	1.0
Lapin + Rosso di Cadmio	7.7
Pesce tal quale	0.6
Pesce + Ocra Gialla	99.7
Pesce + Bianco di Zinco	43.8
Pesce + Cinabro	41.9
Pesce + Gesso	16.7
Pesce + Verde Smeraldo	42.4
Pesce + Verde di Cromo	11.7
Pesce + Rosso di Cadmio	27.3

**Tabella 24** *Recovery %* campioni di lapin e pesce su intonaco estratti con NH<sub>3</sub> 2.5M e analizzati con BCA.

### GESSO E COLLA

I risultati ottenuti per i campioni delle stesure di colla di coniglio sono molto variabili (Tab.25): *recovery* bassissime per lapin tal quale e con bianco di zinco (7%), basse per lapin con verde di cromo e con rosso di cadmio, buone per lapin con cinabro, con gesso e con verde smeraldo, sovrastimate per lapin con ocra gialla.

La stessa situazione è evidente per i risultati dei campioni con colla di pesce, eccetto che per il campione con bianco di zinco che ha in questo caso una buona *recovery*.

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Lapin tal quale	7.0
Lapin + Ocra Gialla	535.7
Lapin + Bianco di Zinco	7.0
Lapin + Cinabro	105.2
Lapin + Gesso	97.4
Lapin + Verde Smeraldo	61.6
Lapin + Verde di Cromo	31.5
Lapin + Rosso di Cadmio	24.2
Pesce tal quale	0.0
Pesce + Ocra Gialla	293.9
Pesce + Bianco di Zinco	136.7
Pesce + Cinabro	124.6
Pesce + Gesso	93.6
Pesce + Verde Smeraldo	53.5
Pesce + Verde di Cromo	23.2
Pesce + Rosso di Cadmio	38.1

**Tabella 25** *Recovery %* campioni di lapin e di pesce su gesso e colla estratti con NH<sub>3</sub> 2.5M e analizzati con BCA.

L'analisi delle stesure di giallo ocre con la colla di lapin e di pesce mostrano *recovery* alte soprattutto su gesso e colla.

I risultati, per quanto riguarda i campioni di colla di pesce non sono molto attendibili in quanto sarebbe stata più corretta una quantificazione utilizzando una retta di calibrazione costruita con la medesima colla.

#### 4.3.4 Caseina

Per l'estrazione con  $\text{NH}_3$  2.5M sono stati scelti solo cinque pigmenti (giallo ocre, bianco di zinco, cinabro, verde smeraldo e gesso). La curva di calibrazione creata con la  $\beta$ -caseina come proteina standard riporta  $R^2 = 0.9965$ .

I risultati ottenuti da questa estrazione sono molto buoni, si ottengono *recovery* abbastanza alte per i campioni di tutti i tre tipi di supporto (tra 50 e 100%). Un'eccezione è data dalle stesure di caseina con bianco di zinco su intonaco e su gesso e colla, questi due campioni riportano infatti *recovery* basse, rispettivamente del 24% e del 30.7%.

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery % (su vetrino)</b>	<b>Recovery % (su intonaco)</b>	<b>Recovery % (su gesso e colla)</b>
Ocre Gialla	58.4	47.8	86.8
Bianco di Zinco	103.6	24.1	30.8
Cinabro	92.3	91.8	51.2
Gesso	97.2	41.5	49.4
Verde Smeraldo	104.2	68.9	69.4

**Tabella 26** *Recovery %* campioni di Caseina su vetrino, intonaco e gesso e colla estratti con  $\text{NH}_3$  2.5M e analizzati con BCA.

Questi risultati erano abbastanza prevedibili in quanto è nota l'elevata solubilità della caseina in ambiente alcalino.

## 4.4 Protocollo in condizioni denaturanti

### 4.4.1 Albume

Con i campioni di albume si hanno delle grandissime difficoltà di estrazione per le stesure su intonaco.

Per quanto riguarda le stesure su vetrino i risultati sono simili ed a volte maggiori di quelli ottenuti con ammoniacca. Questo vale anche per i campioni delle stesure su gesso e

colla, tra i quali però risultano molto basse le *recovery* dei campioni di albume con giallo ocra e con verde smeraldo. La curva di calibrazione creata con l'OVA come proteina standard riporta  $R^2 = 0.99664$ .

#### VETRINO

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	177.4
Ocra Gialla	114.6
Bianco di Zinco	84.0
Cinabro	166.8
Gesso	76.6
Verde Smeraldo	115.2
Verde di Cromo	97.8
Rosso di Cadmio	14.9

**Tabella 27 Recovery % campioni di albume su vetrino estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.**

#### INTONACO

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	4.7
Ocra Gialla	0.0
Bianco di Zinco	1.5
Cinabro	0.0
Gesso	52.4
Verde Smeraldo	0.0
Verde di Cromo	0.0
Rosso di Cadmio	0.0

**Tabella 28 Recovery % campioni di albume su intonaco estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.**

#### GESSO E COLLA

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	8.5
Ocra Gialla	3.3
Bianco di Zinco	23.0
Cinabro	112.1
Gesso	79.5
Verde Smeraldo	1.9
Verde di Cromo	53.5
Rosso di Cadmio	74.7

**Tabella 29 Recovery % campioni di albume su gesso e cola estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.**

#### 4.4.2 Tuorlo

Osservando i risultati ottenuti con l'estrazione con l'SDS anche in questo caso come per l'albume, sono evidenti difficoltà di estrazione per i campioni delle stesure di tuorlo con i vari

pigmenti su intonaco, ad eccezione che per i campioni con bianco di zinco e giallo ocre. I campioni di tuorlo con bianco di zinco su vetrino e su gesso e colla hanno *recovery* altissime. La curva di calibrazione creata con la BSA come proteina standard riporta  $R^2 = 0.99156$ .

#### VETRINO

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	83.3
Ocra Gialla	54.2
Bianco di Zinco	196.3
Cinabro	66.8
Gesso	75.6
Verde Smeraldo	70.3
Verde di Cromo	78.5
Rosso di Cadmio	60.8

**Tabella 30** *Recovery %* campioni di tuorlo su vetrino estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.

#### INTONACO

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	16.5
Ocra Gialla	103.5
Bianco di Zinco	98.3
Cinabro	4.7
Gesso	15.6
Verde Smeraldo	15.4
Verde di Cromo	7.7
Rosso di Cadmio	21.4

**Tabella 31** *Recovery %* campioni di tuorlo su intonaco estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.

#### GESSO E COLLA

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	61.3
Ocra Gialla	77.3
Bianco di Zinco	153.5
Cinabro	69.2
Gesso	63.3
Verde Smeraldo	11.2
Verde di Cromo	25.1
Rosso di Cadmio	32.1

**Tabella 32** *Recovery %* campioni di tuorlo su gesso e colla estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.

#### 4.4.3 Colle animali

L'estrazione con l'SDS 2 mM per i campioni di lapin riporta buoni risultati per quanto riguarda le stesure su vetrino. Le *recovery* dei campioni delle stesure su gesso e colla sono tutte

superiori al 50% ad eccezione del campione di colla di coniglio tal quale e del lapin con rosso di cadmio. Le estrazioni dei campioni di intonaco riportano valori bassi ma spesso maggiori rispetto a quelli ottenuti con l'estrazione con ammoniacca.

Per quanto riguarda i campioni di colla di pesce estratti con SDS si riscontrano maggiori difficoltà di estrazione. Buone o troppo alte sono le *recovery* dei campioni su vetrino, bassissime o pari a zero quelle riguardanti i campioni su intonaco, quasi tutte maggiori del 50% quelle dei campioni su gesso e colla. La curva di calibrazione creata con la colla di coniglio riporta  $R^2 = 0.99295$ .

### VETRINO

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Lapin tal quale	135.9
Lapin + Ocra Gialla	93.2
Lapin + Bianco di Zinco	115.1
Lapin + Cinabro	120.6
Lapin + Gesso	105.0
Lapin + Verde Smeraldo	123.1
Lapin + Verde di Cromo	120.0
Lapin + Rosso di Cadmio	87.7
Pesce tal quale	106.0
Pesce + Ocra Gialla	90.5
Pesce + Bianco di Zinco	183.3
Pesce + Cinabro	174.6
Pesce + Gesso	13.7
Pesce + Verde Smeraldo	144.5
Pesce + Verde di Cromo	127.2
Pesce + Rosso di Cadmio	136.1

**Tabella 33 Recovery % campioni di lapin e di pesce su vetrino estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.**

### INTONACO

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Lapin tal quale	31.2
Lapin + Ocra Gialla	54.2
Lapin + Bianco di Zinco	80.7
Lapin + Cinabro	45.3
Lapin + Gesso	11.1
Lapin + Verde Smeraldo	31.2
Lapin + Verde di Cromo	34.5
Lapin + Rosso di Cadmio	28.1
Pesce tal quale	1.6
Pesce + Ocra Gialla	0.0
Pesce + Bianco di Zinco	0.0
Pesce + Cinabro	35.9
Pesce + Gesso	10.3
Pesce + Verde Smeraldo	20.3
Pesce + Verde di Cromo	0.0
Pesce + Rosso di Cadmio	15.7

**Tabella 34 Recovery % campioni di lapin e di pesce su intonaco estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.**

## GESSO E COLLA

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Lapin tal quale	24.7
Lapin + Ocra Gialla	82.4
Lapin + Bianco di Zinco	61.6
Lapin + Cinabro	64.2
Lapin + Gesso	82.6
Lapin + Verde Smeraldo	54.3
Lapin + Verde di Cromo	63.0
Lapin + Rosso di Cadmio	42.6
Pesce tal quale	29.4
Pesce + Ocra Gialla	0.0
Pesce + Bianco di Zinco	58.9
Pesce + Cinabro	80.8
Pesce + Gesso	47.4
Pesce + Verde Smeraldo	86.4
Pesce + Verde di Cromo	74.9
Pesce + Rosso di Cadmio	60.6

Tabella 35 Recovery % campioni di lapin e di pesce su gesso e colla estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.

## 4.4.4 Caseina

I valori delle *recovery* riguardanti i campioni estratti con SDS sono relativamente buoni; per quanto riguarda le stesure di caseina su vetrino si hanno buoni risultati ad eccezione dei campioni di caseina con giallo ocra e di caseina con bianco di zinco. Le stesure con giallo ocra e con bianco di zinco mostrano valori più alti sul supporto di intonaco e uguali su supporto di gesso e colla. La curva di calibrazione creata con la  $\beta$ -caseina come proteina standard riporta  $R^2 = 0.99588$ .

## VETRINO

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	203.5
Ocra Gialla	39.8
Bianco di Zinco	31.1
Cinabro	117.7
Gesso	91.0
Verde Smeraldo	147.8
Verde di Cromo	113.0
Rosso di Cadmio	92.7

Tabella 36 Recovery % campioni di caseina su vetrino estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.

*INTONACO*

<b>Legante + Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	36.8
Ocra Gialla	95.3
Bianco di Zinco	65.2
Cinabro	72.8
Gesso	10.8
Verde Smeraldo	53.6
Verde di Cromo	34.8
Rosso di Cadmio	23.6

**Tabella 37** Recovery % campioni di caseina su intonaco estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.

*GESSO E COLLA*

<b>Pigmento</b>	<b>Recovery %</b>
Assente	19.6
Ocra Gialla	42.0
Bianco di Zinco	35.9
Cinabro	12.6
Gesso	15.2
Verde Smeraldo	14.9
Verde di Cromo	38.7
Rosso di Cadmio	16.2

**Tabella 38** Recovery % campioni di caseina su gesso e colla estratti con SDS 2 mM e analizzati con BCA.

## CAPITOLO 5

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il tipo di lavoro eseguito risulta molto problematico in quanto si sono create, nei modelli pittorici eseguiti in laboratorio, una grande quantità di combinazioni tra legante, pigmenti e supporto. Si riscontra quindi una difficoltà nella valutazione di tutti i parametri e nella ricerca di un andamento comune, poiché si possono instaurare interazioni tra legante e pigmento, tra legante e supporto e tra legante, pigmento e supporto.

Si è quindi deciso di utilizzare, per l'analisi dei risultati, un approccio che prenda in considerazione ogni tipo di legante suddiviso per supporto e confrontando per ogni categoria le interazioni dei vari pigmenti a seconda del protocollo d'estrazione utilizzato.

#### 5.1 Albume

##### 5.1.1 Vetrino

Le *recovery* ottenute per le stesure d'albume su vetrino con i diversi pigmenti è diverso a seconda del tipo di protocollo usato per l'estrazione. Dagli istogrammi si può notare che in condizioni alcaline ed in presenza di denaturanti (Fig.18) la quantità di proteine estratte è abbastanza simile; in entrambi i casi in presenza di cinabro si ottiene una *recovery* più alta rispetto agli altri pigmenti, fatto che non avviene invece utilizzando il protocollo di estrazione in condizioni acide. Controllando gli effetti dell'interferenza che dà il cinabro con il BCA (Tab.7) si nota che questo pigmento ha un'assorbanza di 0.01, valore che si ottiene generalmente anche con una soluzione di BSA 20 µg/mL. Si può quindi supporre che valori sovrastimati per i campioni di cinabro possano essere dovuti al prelievo di alcune particelle di pigmento assieme al surnatante. Altra differenza significativa è il diverso comportamento del rosso di cadmio: nell'estrazione con TFA 1%

risulta dare una delle *recovery* più alte (46.6%), nell'estrazione con SDS 2 mM risulta invece una delle più basse (14.9%).

Dai valori riportati per l'estrazione con  $\text{NH}_3$  l'unica *recovery* abbastanza bassa è riferita al campione di albume con bianco di zinco.

Per l'estrazione con l'SDS, come già osservato, la *recovery* più bassa corrisponde al campione di albume con rosso di cadmio. Una volta precisate queste diversità l'andamento degli ultimi due istogrammi può ritenersi abbastanza simile.

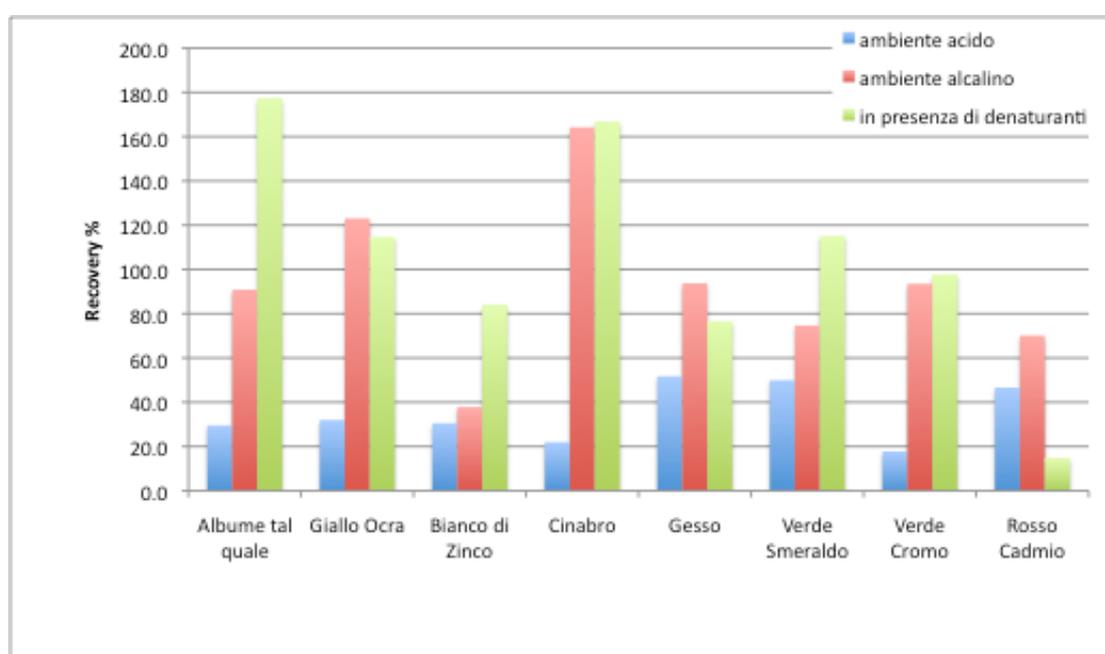


Figura 18 Istogramma delle *recovery* dei campioni di albume su vetrino estratti con TFA 1%,  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

### 5.1.2 Intonaco

Per tutti i protocolli di estrazione i valori di *recovery* sono nettamente inferiori per i campioni di albume su intonaco rispetto a quelli delle stesse stesure su vetrino. Questo può essere causato dal fatto che il prelievo di campioni su intonaco è molto più complicato rispetto al prelievo su vetrino in quanto risulta inevitabile prelevare anche una certa quantità di supporto.

Per l'estrazione con TFA 1% valori estremamente bassi sono relativi al campione di albume e bianco di zinco mentre per quanto riguarda l'estrazione con  $\text{NH}_3$  oltre al bianco

di zinco anche l'albuma tal quale e l'albuma con gesso riportano problemi di estrazione. Caso a parte è l'estrazione con SDS dove le *recovery* sono tutte zero o quasi, ad eccezione del campione con gesso.

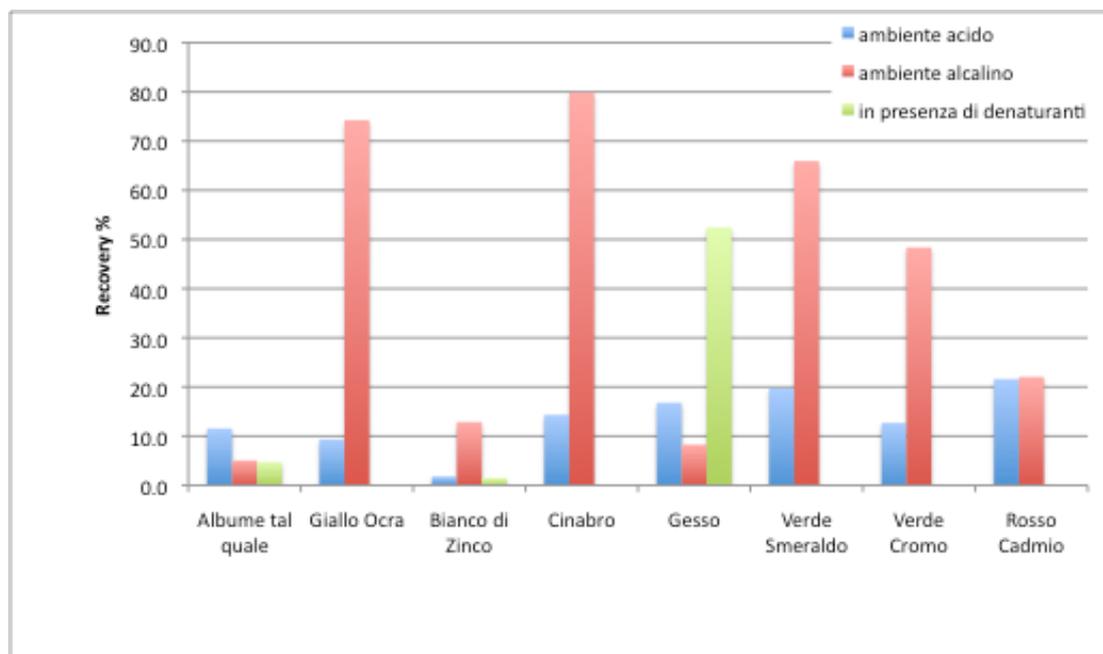


Figura 19 Istogramma delle *recovery* dei campioni di albuma su intonaco con TFA 1%, NH<sub>3</sub> 2.5 M e SDS 2 mM.

### 5.1.3 Gesso e colla

La quantità di proteina estratta dai campioni d'albuma stesi su gesso e colla mostra andamenti diversi a seconda del protocollo estraente scelto. L'estrazione con TFA 1% porta a risultati bassi per tutti i campioni (minori del 50%), ma ancora più bassi per i campioni di albuma con bianco di zinco e con giallo ocra. Con NH<sub>3</sub> si hanno invece risultati decisamente migliori ma sempre bassi per quanto riguarda l'albuma con bianco di zinco e l'albuma tal quale. Con l'SDS infine, oltre ai campioni di albuma tal quale, con bianco di zinco e con giallo ocra, anche il campione di albuma con verde smeraldo presenta una *recovery* molto bassa (1.9%). Sia con l'utilizzo del protocollo alcalino che con l'uso del denaturante il campione che riporta valori di proteina estratta maggiori è quello con il cinabro. Considerando che il cinabro (HgS) tende a formare complessi stabili mercurio-proteina di diversi pesi molecolari, promuovendo inoltre *cross-linking*, idrolisi ed ossidazione delle proteine stesse (Duce, 2012), ci si aspetterebbe recuperi molto più bassi

rispetto agli altri pigmenti. Si ritiene pertanto che i risultati ottenuti siano dovuti ad una probabile interferenza con il BCA già descritta precedentemente, legata al prelievo di qualche granello di pigmento assieme al surnatante.

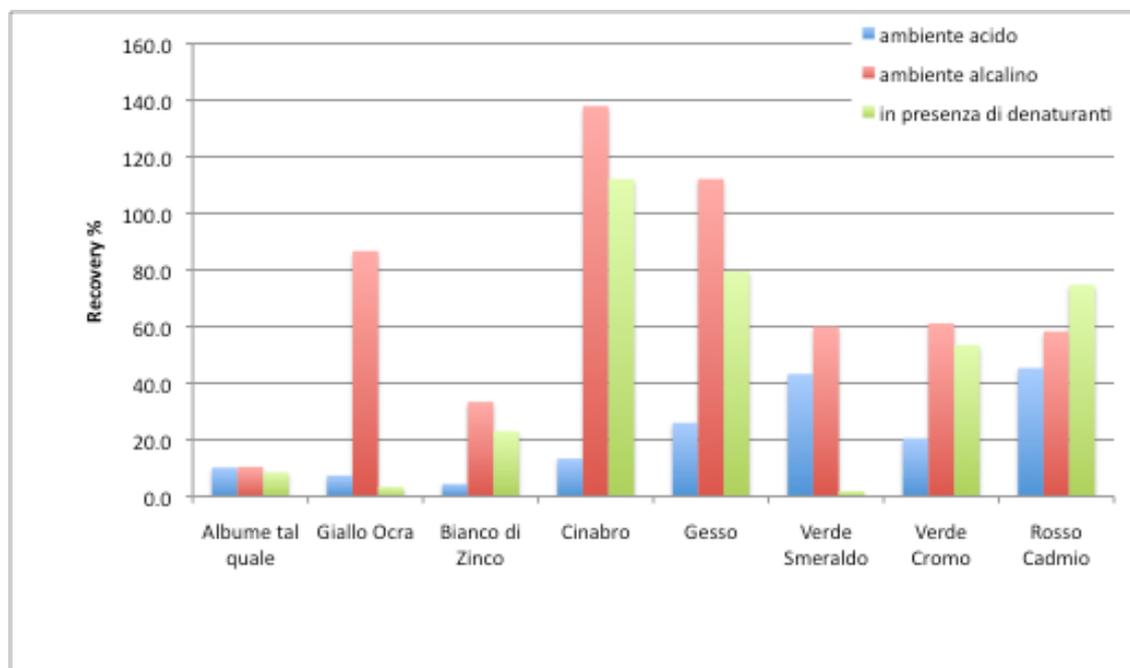


Figura 20 Istogramma delle *recovery* dei campioni di albume su vetrino gesso e colla con TFA 1%, NH<sub>3</sub> 2.5 M e SDS 2 mM.

### Osservazioni

Il fatto che per i campioni di albume estratti con TFA i valori di *recovery* più alti si siano ottenuti, per tutti i tipi di supporti, per i campioni di albume con rosso di cadmio e verde smeraldo, potrebbe essere giustificato nel caso del rosso di cadmio dall'interferenza che dà con il BCA (Tab.7) e nel caso del verde smeraldo dalla sua composizione a base di rame che potrebbe dare in qualche modo interferenza con i reagenti del kit colorimetrico. In ogni caso i valori relativi all'estrazione in condizioni acide sono molto minori rispetto a quelli ottenuti con gli altri protocolli. Nel caso particolare delle estrazioni con NH<sub>3</sub> e con SDS la quantità di proteina estratta per i campioni di albume tal quale su intonaco è molto bassa, quasi nulla, mentre per i campioni di albume con pigmenti su intonaco e su gesso e colla si ottengono *recovery* accettabili. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il legante tal quale tenderebbe a formare un film molto compatto mentre i granuli di pigmento potrebbero in qualche modo creare una "trama" di spazi vuoti diminuendo il fenomeno di *cross-linking*.

## 5.2 Tuorlo

### 5.2.1 Vetrino

Analizzando i risultati delle diverse estrazioni dei campioni di tuorlo su vetrino si notano andamenti molto diversi. Per quanto riguarda l'estrazione effettuata con TFA 1% si hanno buoni valori di proteina estratta per le stesure di tuorlo tal quale e di tuorlo con verde cromo. Per gli altri due protocolli, invece, si sono ottenuti buoni risultati per tutti i campioni (da 50 a 200%). Osservando il comportamento del tuorlo quando steso mescolato ai pigmenti, in entrambi i casi si hanno le *recovery* più alte per il tuorlo con bianco di zinco (circa 200%). Questo fatto può essere giustificato se si considera che le stesure di tuorlo con bianco di zinco trattate con  $\text{NH}_3$  e SDS sono più recenti di altre stesure preparate alcuni mesi o addirittura un anno prima. La proteina non ha avuto pertanto il tempo di fare *cross-linking*, inoltre sempre osservando le interferenze dei vari pigmenti con il BCA (Tab.7) risulta che il bianco di zinco con questo reagente abbia un'assorbanza di 0.016 quindi probabilmente il valore di proteina viene sovrastimato a causa di un possibile prelievo di qualche particella di pigmento assieme al surnatante.

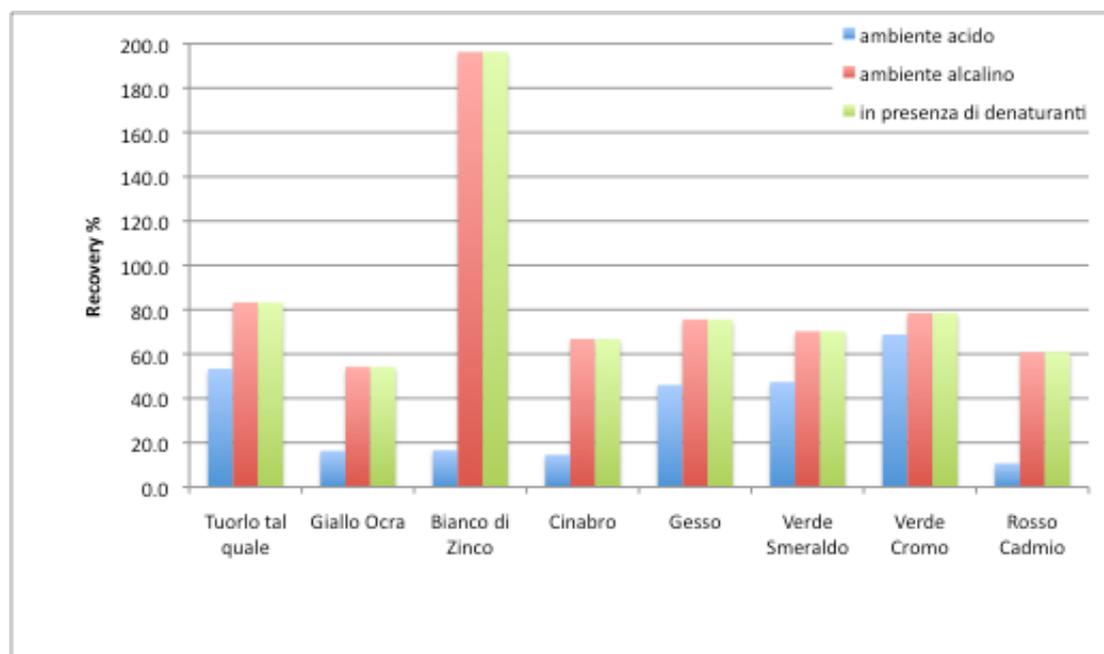


Figura 21 Istogramma delle *recovery* dei campioni di tuorlo su vetrino estratti con TFA 1%,  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

### 5.2.2 Intonaco

Anche per le stesure di tuorlo su intonaco si notano comportamenti diversi dei campioni di legante pigmentato a seconda del protocollo utilizzato (Fig.22).

Con l'estrazione per mezzo di TFA 1% i pigmenti con una *recovery* maggiore sono il rosso di cadmio e il verde cromo (rispettivamente 55.1 e 52.2%), mentre il tuorlo con ocre gialla possiede la *recovery* minore (12.1%). Quest'ultima combinazione, ovvero tuorlo con ocre gialla, rappresenta la *recovery* maggiore per quanto riguardano i risultati ottenuti con gli altri due protocolli. Osservando i risultati relativi all'estrazione con ammoniaca, si osservano valori molto bassi per i campioni di tuorlo con rosso di cadmio, gesso e bianco di zinco. Nel caso del protocollo con SDS la stesura di tuorlo con bianco di zinco è invece l'unica a riportare *recovery* quasi del 100% assieme a quella di tuorlo e giallo ocre.

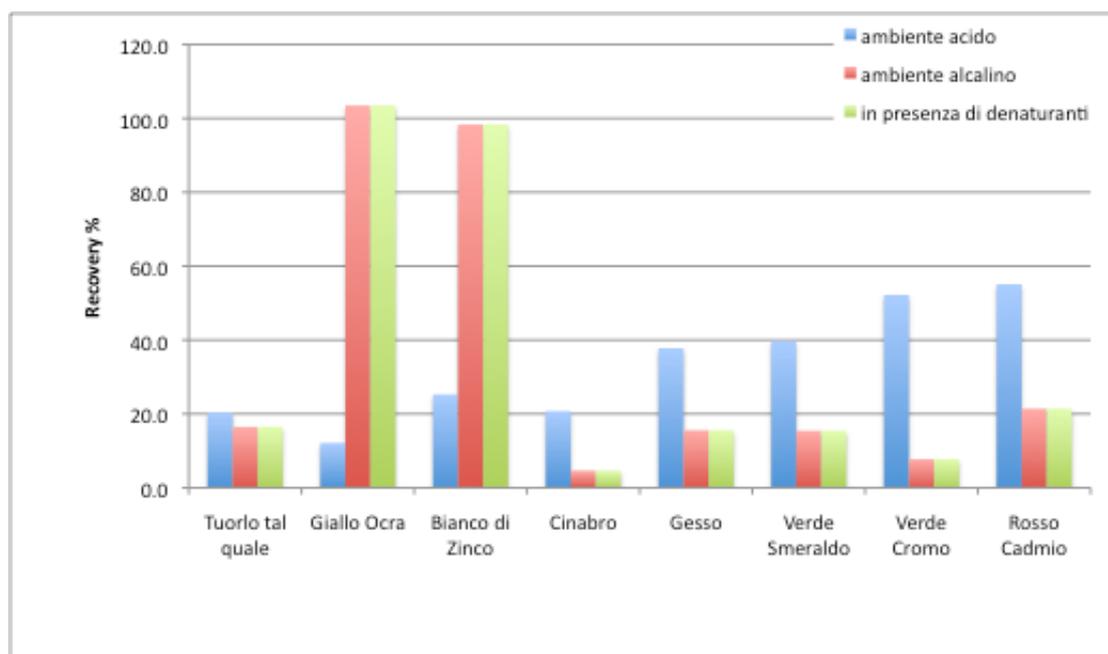


Figura 22 Istogramma delle *recovery* dei campioni di tuorlo su intonaco estratti con TFA 1%, NH<sub>3</sub> 2.5 M e SDS 2 mM.

### 5.2.3 Gesso e colla

I valori ottenuti dall'estrazione con TFA 1% mostrano una buona *recovery* (tra 50 e 80%) solo per i campioni di tuorlo tal quale, mescolato con cinabro, gesso e verde smeraldo. Osservando i due istogrammi riguardanti l'estrazione in ambiente alcalino ed in

presenza di denaturanti è immediatamente evidente un diverso comportamento del campione di bianco di zinco: nel caso del trattamento con  $\text{NH}_3$  è il campione che mostra *recovery* minore (< 30%) mentre nel caso del trattamento con SDS è quello che riporta *recovery* molto maggiore rispetto agli altri campioni. I restanti campioni analizzati con  $\text{NH}_3$  riportano tutti *recovery* molto buone, mentre per quanto riguarda i campioni trattati con SDS si osservano *recovery* relativamente basse (sotto il 40%) per i campioni di verde smeraldo, verde cromo e rosso cadmio.

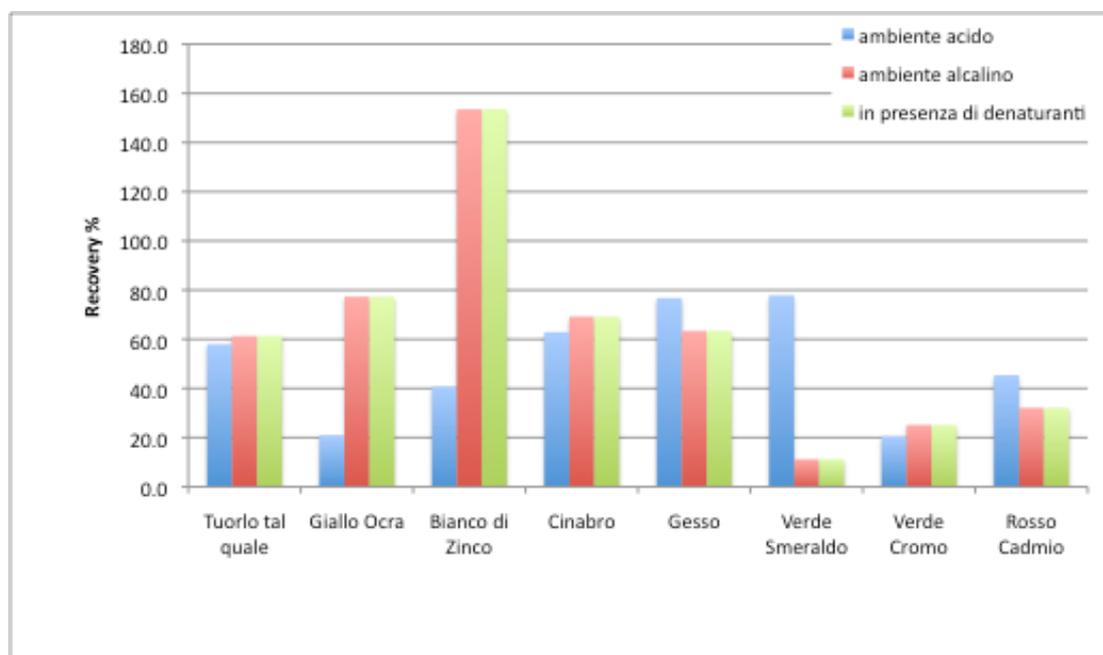


Figura 23 Istogramma delle *recovery* dei campioni di tuorlo su intonaco estratti con TFA 1%,  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

### Osservazioni

Facendo un confronto fra le *recovery* del tuorlo tal quale su intonaco e su gesso e colla, con i valori ottenuti per i medesimi campioni di albume, è possibile osservare un netto miglioramento nei risultati. Questo può essere dovuto al fatto che il tuorlo ha una consistenza molto diversa dall'albume e quindi le sue stesure si riescono a campionare più facilmente riducendo di molto la quantità di materiale inorganico proveniente dal supporto nel campione.

I campioni di tuorlo con bianco di zinco su tutti e tre i supporti trattati con SDS hanno *recovery* altissime superiori al 100% e, per tale motivo, poco probabili. Poiché con i

campioni d'albume non si sono ottenuti i medesimi risultati, si ipotizza un'interferenza specifica tra tuorlo, bianco di zinco ed SDS che porta alla sovrastima del dato.

### 5.3 Caseina

#### 5.3.1 Vetrino

I campioni trattati con  $\text{NH}_3$  riportano valori molto soddisfacenti di recupero proteico. Risultati che trovano spiegazione nell'ottima solubilità in ambiente alcalino della caseina stessa. Anche l'ambiente in cui è presente l'SDS è un ambiente alcalino essendo disciolto in carbonato d'ammonio ma in questo caso si riscontrano delle difficoltà per quanto riguarda i valori relativi ai campioni di bianco di zinco e di giallo ocre (al di sotto del 50%) e sovrastimati nel caso della caseina tal quale e con verde smeraldo (203.5 e 147.8%); buoni i valori dei campioni con verde cromo e rosso cadmio trattati con SDS (113 e 92.7%).

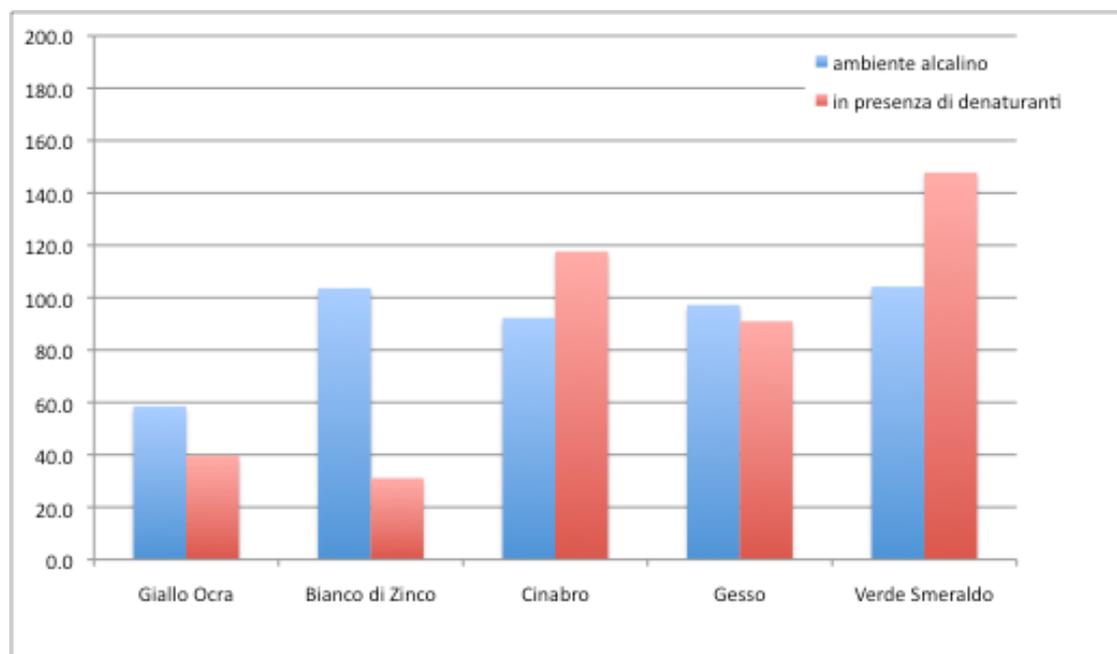


Figura 24 Istogramma delle *recovery* dei campioni di caseina su vetrino estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

#### 5.3.2 Intonaco

Osservando i valori per i campioni estratti con  $\text{NH}_3$  si osserva, come nel caso di tutti

i campioni su intonaco, una drastica diminuzione delle *recovery* rispetto alle stesure su vetrino. Questo è dovuto al fatto che il prelievo del campione è sempre più difficoltoso su intonaco rispetto agli altri supporti.

Anche per quanto riguarda il trattamento con SDS le *recovery* risultano molto più basse rispetto a quelle dei campioni su vetrino per lo stesso motivo precedentemente spiegato. Estremamente bassa (< 20%) è la *recovery* della stesura di caseina e gesso; al di sotto del 50% sono però anche le *recovery* di caseina tal quale, con verde cromo e con rosso cadmio.

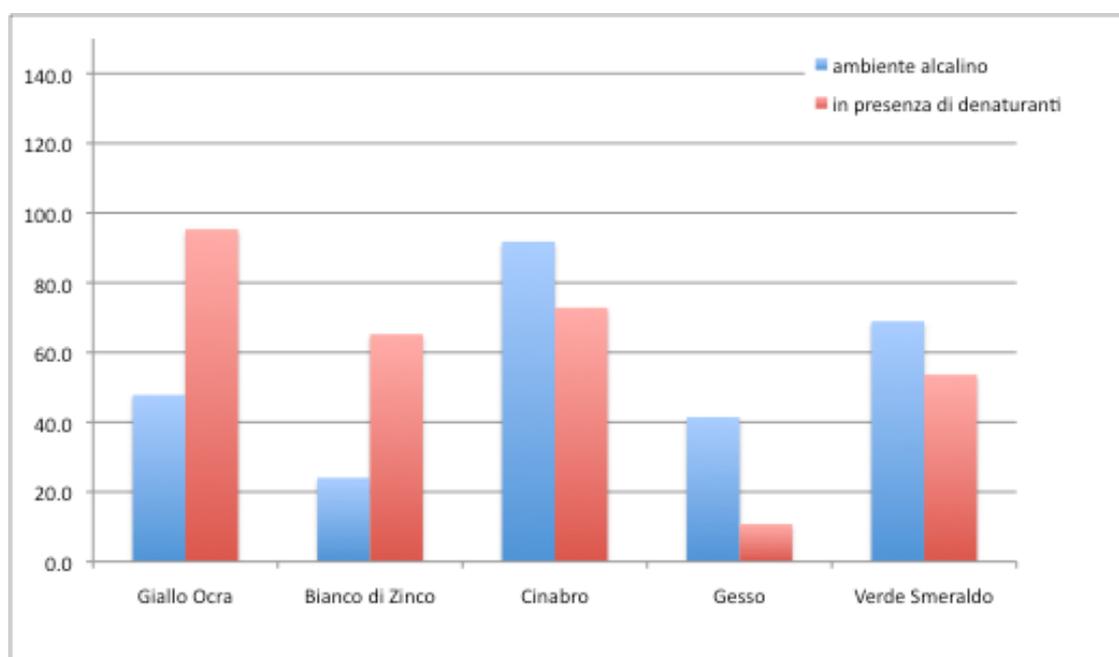


Figura 25 Istogramma delle *recovery* dei campioni di caseina su intonaco estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

### 5.3.3 Gesso e colla

Le *recovery* dei campioni estratti con  $\text{NH}_3$  presentano *recovery* buone, eccetto che per il bianco di zinco (30.8%), minori rispetto a quelle dei campioni su vetrino ma sempre maggiori di quelle relative ai campioni su intonaco.

Molto basse (minori del 45%) risultano tutte le *recovery* relative al trattamento con agente denaturante (Fig.26).

Osservazioni

Pur essendo la caseina molto solubile in ambiente alcalino si sono riscontrati buoni risultati solo nel caso delle stesure su vetrino.

Strano è il comportamento nel caso dei leganti stesi con pigmenti quali bianco di zinco e giallo ocra estratti con SDS. Mentre per le stesure su vetrino si ottengono *recovery* minori rispetto agli altri campioni, per le stesure su intonaco e su gesso e colla sono invece quelli che riportano *recovery* maggiori.

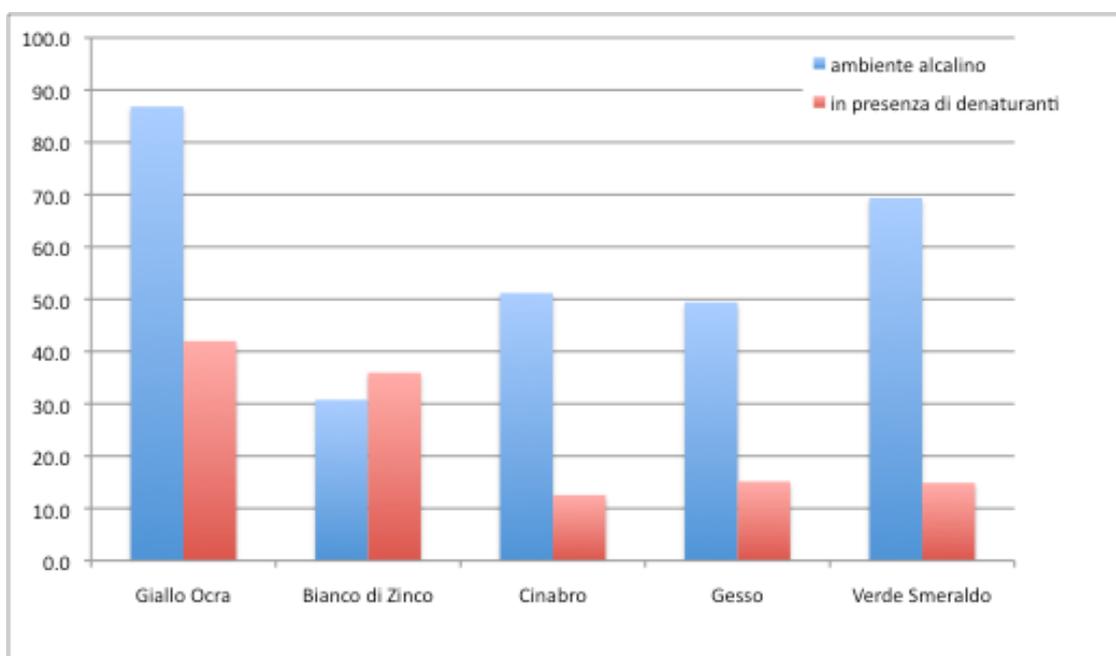


Figura 26 Istogramma delle *recovery* dei campioni di caseina su gesso e colla estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

5.4 Colle animali

5.4.1 Vetrino

Nel caso dell'estrazione con TFA 1% dei campioni di colle stese su vetrino si ottengono *recovery* pari a zero (Fig.27). Questo è dovuto all'utilizzo della BSA come proteina standard per la costruzione della retta di calibrazione, la quale si è mostrata non adeguata per la quantificazione del collagene. Per le estrazioni eseguite con  $\text{NH}_3$  sui campioni di colla di coniglio, per cui si è usata la medesima colla per la costruzione della curva di calibrazione, i valori sono tutti buoni ad eccezione di una sovrastima del campione

di gesso probabilmente dovuta ad una contaminazione. Anche per quanto riguarda i campioni di pesce, le *recovery* calcolate usando la colla di coniglio per la costruzione della retta di calibrazione sono buone, si ha solo un valore leggermente sovrastimato che corrisponde a quello del cinabro, probabilmente dovuto al prelievo di qualche granulo del pigmento assieme al surnatante.

Anche per quanto riguarda i campioni di lapin estratti con SDS sono buoni i valori delle *recovery* che per tutti i campioni superano l'80%. Diverso è il comportamento riguardante i campioni di pesce per i quali le *recovery* sono buone per tutti i campioni eccetto che quella del gesso, inferiore al 20 % e quelle di bianco di zinco e cinabro che risultano sovrastimate.

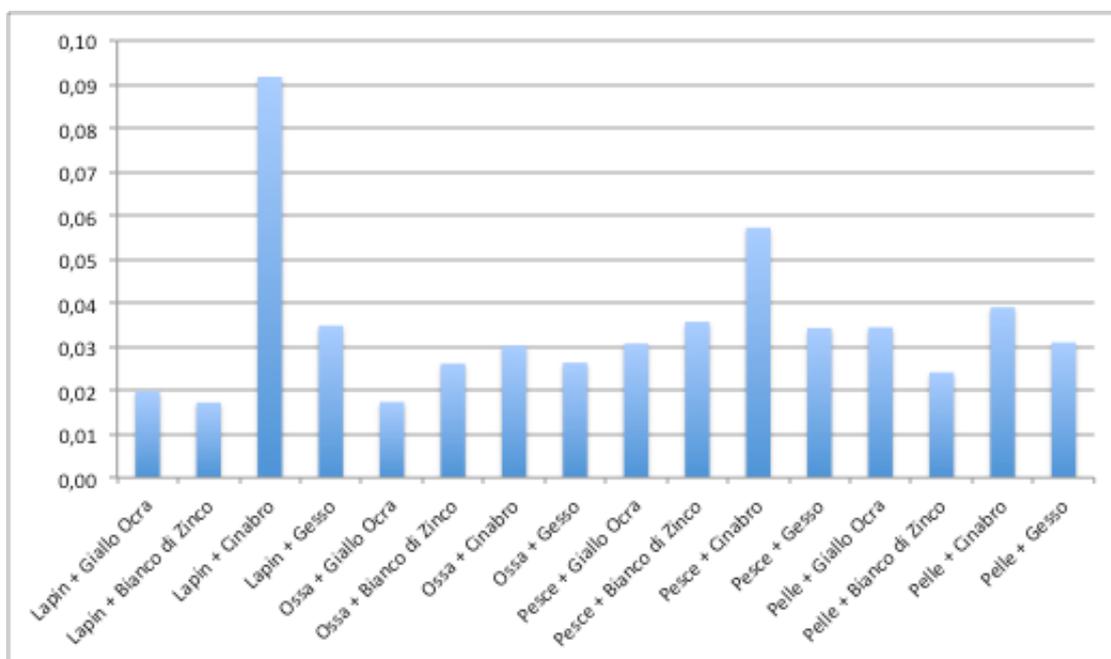


Figura 27 Istogramma delle *recovery* dei campioni di colla su vetrino estratti con TFA1%.

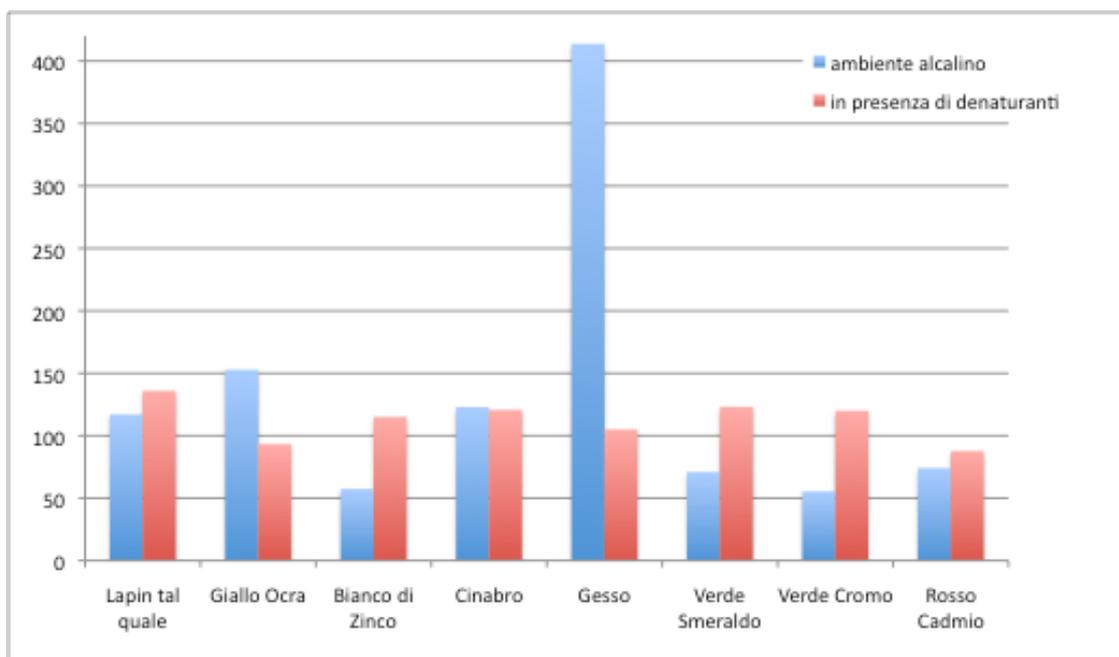


Figura 28 Istogramma delle *recovery* dei campioni di lapin su vetrino estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

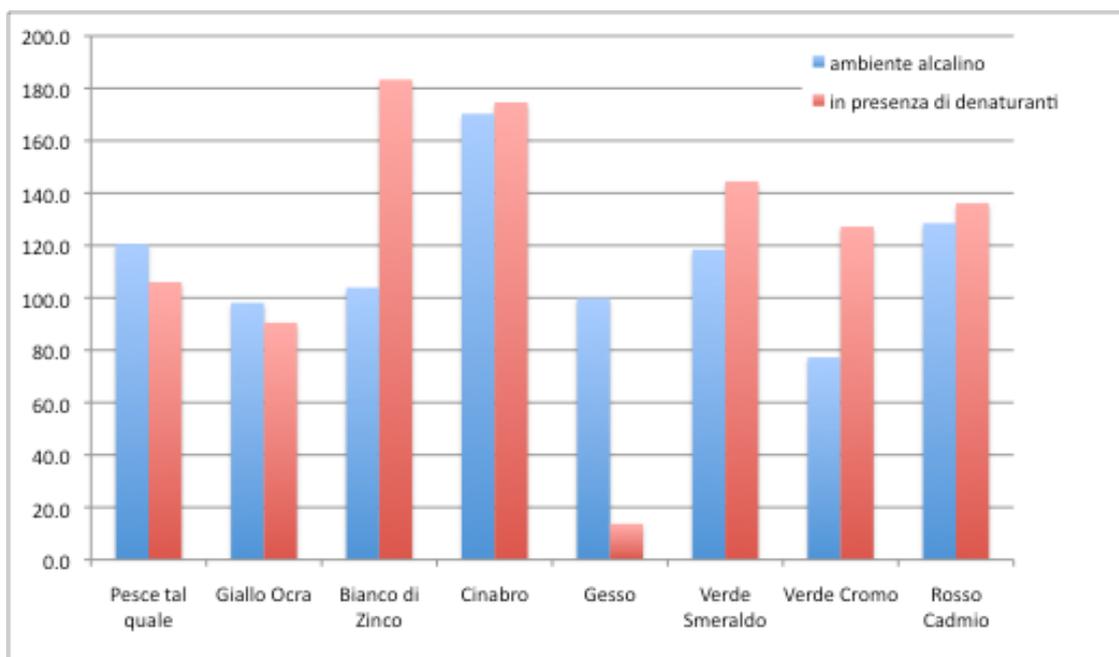


Figura 29 Istogramma delle *recovery* dei campioni di pesce su vetrino estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

#### 5.4.2 Intonaco

Per l'estrazione in ambiente acido si osservano gli stessi problemi visti per i campioni su vetrino infatti le *recovery*, calcolate utilizzando come curva di calibrazione

quella costruita con la BSA, sono tutte basse ad eccezione di una sovrastimata che corrisponde alla colla d'ossa con bianco di zinco (Fig.30). Non migliora molto il risultato per l'estrazione con  $NH_3$  dei campioni di lapin, quasi tutte le *recovery* sono infatti nulle o comunque al di sotto del 30%, l'unico campione ad avere *recovery* alta perché sovrastimata è quello con giallo ocra.

Migliori, ma comunque basse sono le *recovery* per i campioni di pesce estratti con  $NH_3$ , l'unico campione a presentare un recupero elevato di proteina è quello con giallo ocra.

Per i campioni di colla di coniglio trattati con SDS la situazione migliora leggermente rispetto a quelli trattati con  $NH_3$  infatti, eccetto il campione con gesso (circa 10 %) tutti gli altri valori sono compresi tra 30 e 80%. Peggiora invece la situazione per i campioni di colla di pesce trattati con SDS, per i quali le *recovery* sono tutte inferiori al 35% e molte pari a zero.

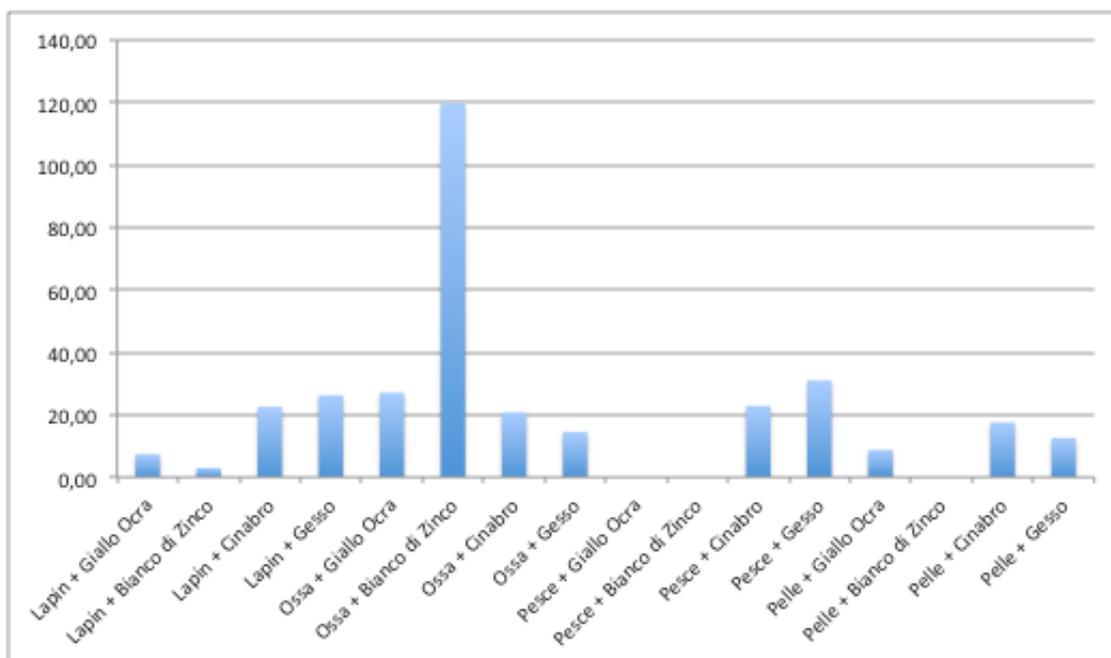


Figura 30 Istogramma delle *recovery* dei campioni di colla su intonaco estratti con TFA1%.

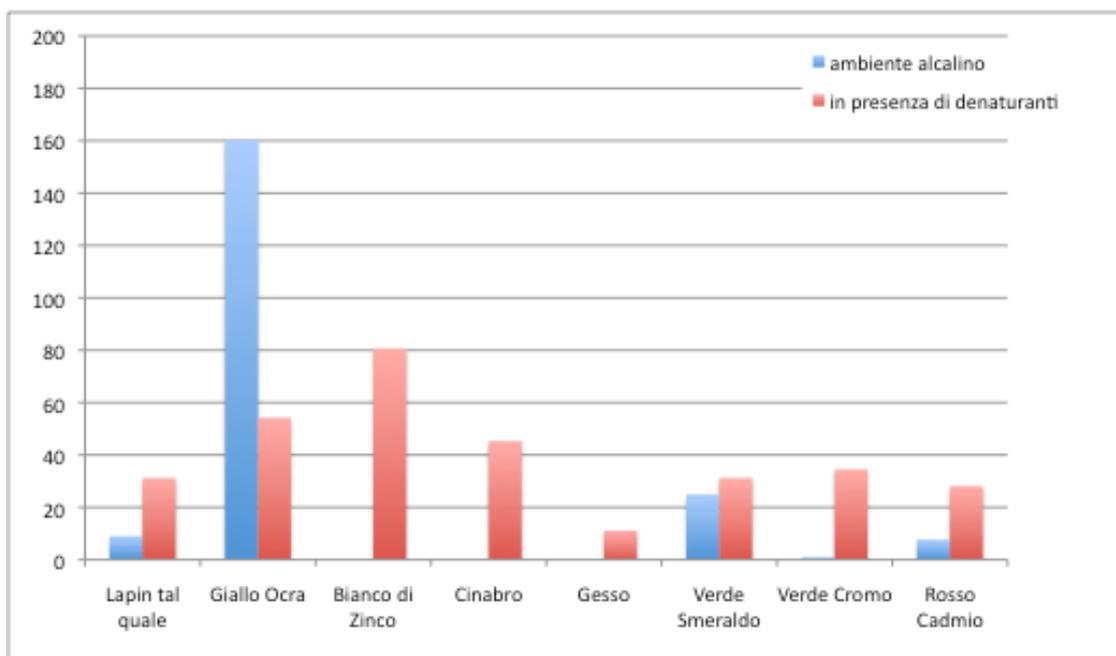


Figura 31 Istogramma delle *recovery* dei campioni di lapin su intonaco estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

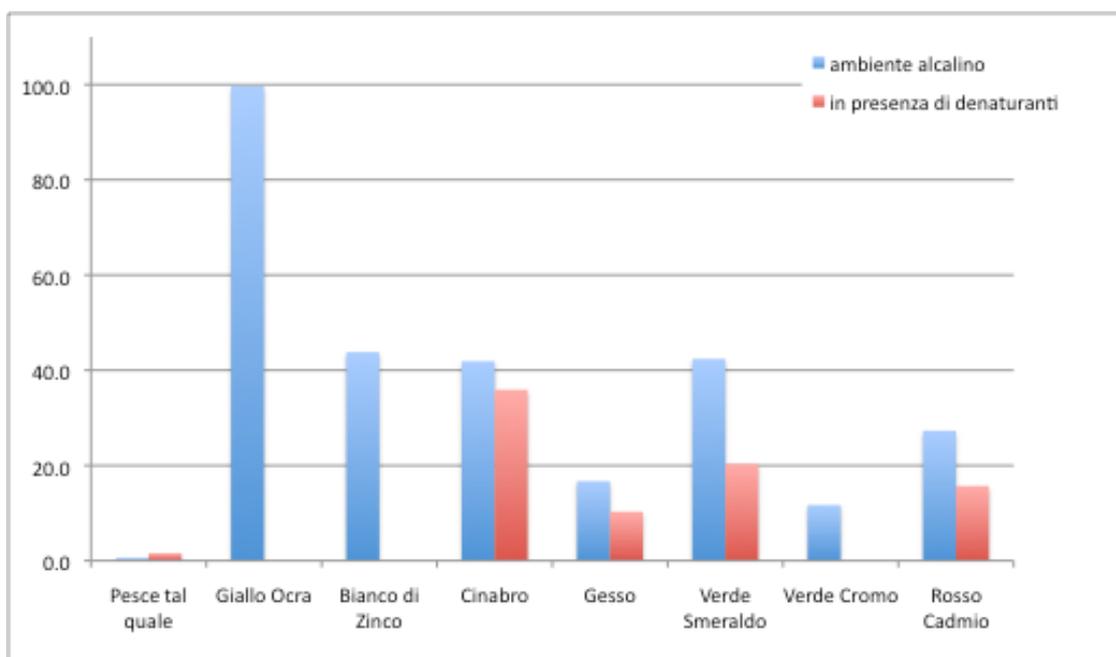


Figura 32 Istogramma delle *recovery* dei campioni di pesce su intonaco estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

### 5.4.3 Gesso e colla

Il trattamento con TFA 1% dei campioni su gesso e colla ha riportato percentuali lievemente maggiori rispetto agli altri due supporti (Fig.33). Tali risultati possono essere

giustificati se si considera che durante la fase d'estrazione viene portato in soluzione anche il collagene proveniente dalla preparazione (a base appunto di colla animale), il quale porterà ad una sovrastima nella quantificazione della proteina proveniente solamente dal legante pittorico. I valori riportati per i campioni di colla di coniglio sono buoni solo per cinabro, gesso e verde smeraldo, i restanti valori sono molto bassi e quello riguardante il giallo ocre è sovrastimato (>500%) sicuramente dovuto ad un prelievo di preparazione. Anche il valore del campione di colla di pesce con giallo ocre estratto con NH<sub>3</sub> risulta sovrastimato; si ottengono invece buone *recovery* ad eccezione della colla di pesce tal quale, in presenza di verde di cromo e rosso di cadmio. Molto buone sono le *recovery* dei campioni di lapin estratti con SDS infatti solo la colla di coniglio tal quale e con il rosso cadmio possiedono *recovery* inferiori al 50%. Per quanto riguarda i campioni di pesce invece sono buoni i valori di tutti i campioni ad eccezione del pesce tal quale, con giallo ocre e con gesso.

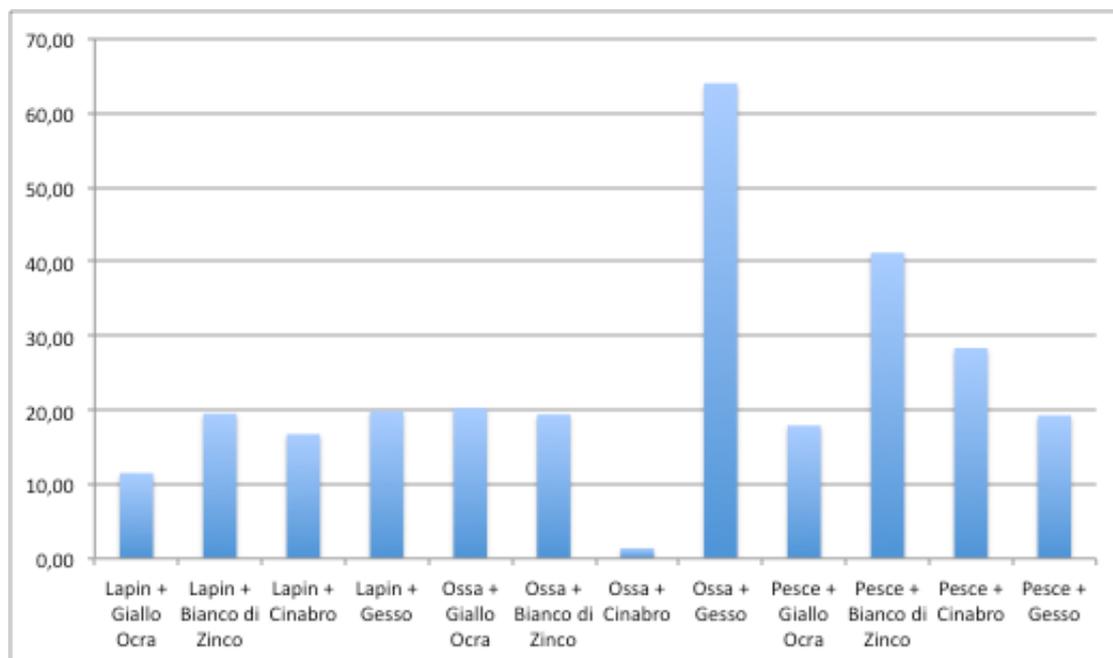


Figura 33 Istogramma delle *recovery* dei campioni di colla su gesso e colla estratti con TFA1%.

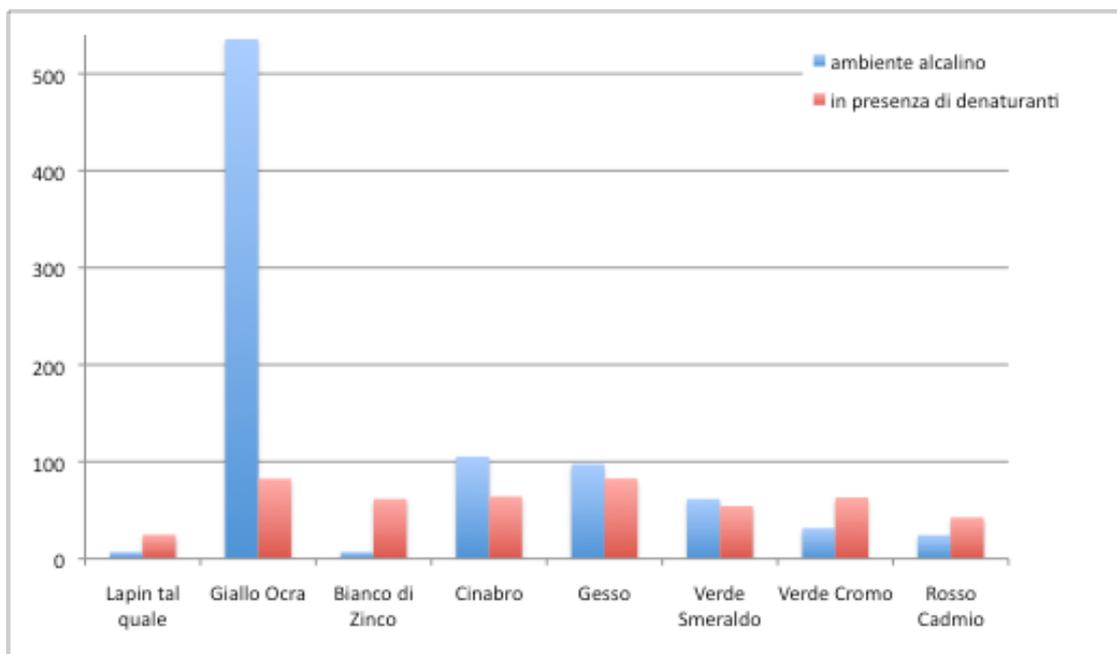


Figura 34 Istogramma delle *recovery* dei campioni di lapin su gesso e colla estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

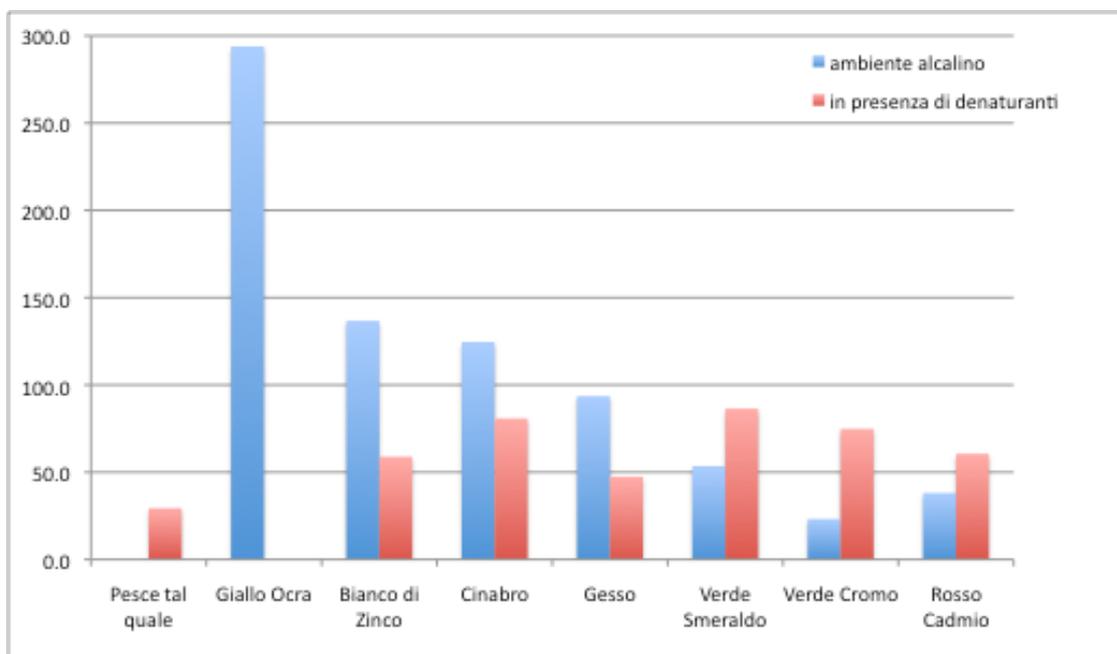


Figura 35 Istogramma delle *recovery* dei campioni di pesce su gesso e colla estratti con  $\text{NH}_3$  2.5 M e SDS 2 mM.

### Osservazioni

Dai dati discussi è evidente che l'utilizzo della BSA come proteina standard per la

costruzione della retta di calibrazione non è idoneo, migliore è l'utilizzo della medesima colla di cui è costituito il campione da analizzare o comunque l'impiego di una colla animale.

Con l'estrazione in ambiente alcalino si sono ottenute *recovery* basse per quanto riguarda il campione di colla tal quale sia per il coniglio che per il pesce, eccetto che per i campioni su vetrino. Si può inoltre constatare come per entrambi i leganti ci sia stata una sovrastima dei campioni contenenti giallo oca nel caso di estrazione con l' $\text{NH}_3$ .

Il protocollo che prevede l'utilizzo del denaturante ha permesso in linea generale di ottenere dei risultati soddisfacenti.

## **5.5 Conclusioni**

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo quello della ricerca della metodica migliore per l'estrazione dei leganti pittorici di natura proteica da modelli complessi quali sono i modelli pittorici reali. Tale complessità è data principalmente dalla grande quantità di sostanze che possono interferire con le proteine quali ad esempio pigmenti e composti inorganici presenti nella preparazione. Si rende quindi necessario separare la componente proteica da quella inorganica in modo da poterla poi identificare attraverso i vari metodi analitici i quali necessitano di una quantità ragionevole di proteina da analizzare.

Tramite analisi con spettrofotometria UV-VIS, in seguito alla scelta del kit colorimetrico BCA, si sono valutate tre metodiche di estrazione diverse: in ambiente acido (TFA 1%), in ambiente alcalino ( $\text{NH}_3$  2.5M) ed in presenza di denaturanti (SDS 2mM). Poiché i modelli pittorici realizzati in laboratorio hanno voluto ricreare la complessità di quelli reali, sono state riprodotte varie combinazioni tramite l'impiego di tre supporti (vetrino, intonaco e gesso e colla) e sette pigmenti (oca gialla, bianco di zinco, cinabro, gesso, verde smeraldo, verde cromo e rosso cadmio), oltre alle diverse tipologie di leganti proteici (tuorlo, albume, caseina e colle animali). Proprio a causa delle suddette molteplici combinazioni risulta difficile individuare un andamento generale che descriva il comportamento di ciascun legante proteico con i diversi pigmenti, supporti e protocolli di estrazione. Sicuramente dai risultati si è evinto che per tutte le metodiche utilizzate c'è stata una minor estrazione dei leganti nel caso di campioni su intonaco rispetto a quelli su

vetrino e gesso e colla, fatto giustificato principalmente da una difficoltà al momento del prelievo del campione. Si può anche ipotizzare che tali risultati siano dovuti alla diversa procedura di essiccamento del legante su vetrino in cui l'acqua evapora soltanto, rispetto agli altri due supporti dove l'acqua viene anche adsorbita. Il fatto che per alcune stesure su gesso e colla si ottengano *recovery* più alte e spesso superiori al 100%, può essere giustificato in quanto nella soluzione estratta è presente anche quella componente proteica (collagene) proveniente dalla preparazione, la quale viene facilmente asportata durante il campionamento. Nel caso di *recovery* molto basse ottenute per campioni su vetrino è possibile ipotizzare che, essendo la stesura poco omogenea, il campione prelevato potrebbe contenere meno legante rispetto a quello calcolato nel rapporto iniziale pigmento/legante a seconda del punto di prelievo. Si è poi osservato che i pigmenti che danno problemi in termini di *recovery* particolarmente basse sono generalmente il bianco di zinco, che porta spesso ad una sottostima, e il cinabro che tende invece a sovrastimare. Questo comportamento non è tuttavia stato riscontrato per tutti i leganti, ma bisogna poi rifarci ad ogni singolo caso. Un'analisi migliore per lo studio delle interferenze dei singoli pigmenti con le diverse proteine contenute nei leganti proteici potrebbe essere condotto tramite HPLC-ICP-MS. L'HPLC identifica le proteine monitorando i legami peptidici, mentre l'ICP-MS identifica i metalli presenti nei pigmenti; individuando così se l'andamento di quantità di proteina e quantità di metalli è lo stesso si riesce ad individuare quali ioni metallici si attaccano a determinate proteine.

Ad una valutazione complessiva della metodica estrattiva migliore si può escludere senza alcun dubbio quella in ambiente acido. I due protocolli in ambiente alcalino e in presenza di denaturanti hanno dato risultati abbastanza simili e generalmente promettenti, ma mentre l'ammoniaca non riporta difficoltà estrattive l'SDS invece, come si è visto in casi specifici, riporta *recovery* molto più basse rispetto a quelle ottenute con estrazione in ambiente alcalino.

Secondo il presente studio la metodica migliore per l'estrazione di leganti pittorici incogniti di natura proteica è pertanto quella che segue un protocollo alcalino a base di  $\text{NH}_3$  2.5M.

## BIBLIOGRAFIA

Amandola G., Terreni V., *Analisi chimica strumentale e tecnica*. Masson Scuola, **1995**.

Bonaduce I., Cito M., Colombini M.P., The development of a gas chromatographic-mass spectrometric analytical procedure for determination of lipids, proteins and resins in the same paint micro-sample avoiding interferences from inorganic media. *Journal of Chromatography A*, 2009, **1216**, 5931-5939.

Bradford M.M., A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**, 248-254.

Campanella L. et al., *Chimica per l'arte*. Zanichelli Ed., **2007**.

Cennini C. (**1473**) *Il libro dell'arte*. Neri Pozza Editore, Vicenza, 2003.

Colombini M.P., Fuoco R., Giacomelli A., Muscatello B., Characterization of proteinaceous binders in wall painting samples by microwave-assisted acid hydrolysis and GC-MS determination of aminoacids. *Studies in conservation*, 1998, **43**, 33-41.

Colombini M.P., Modugno F., Giacomelli A., Two procedures for suppressing interference from inorganic pigments in the analysis by gas chromatography-mass spectrometry of proteinaceous binders in paintings. *Journal of Chromatography A*, 1999, **846**, 101-111.

Compton S.J., Jones C.G., Mechanism of dye response and interface in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 1985, **151**, 369-374.

Copeland R.A., *Methods for Protein Analysis*. Chapman & Hall, **1994**.

Duce C., Ghezzi L., Onor M., Bonaduce I., Colombini M.P., Tinè M.R., Bramanti E., Physico-chemical characterization of protein-pigment interactions in tempera paint

reconstructions: casein/cinnabar and albumin/cinnabar. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, **402**, 2183-2193.

Fremout W., Dhaenens M., Saverwyns S., Sanyova J., Vandenabeele P., Deforce D., Moens L., Tryptic peptide analysis of protein binders in works of art by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2010, **658**, 156-162.

Gautier G., Colombini M.P., GC-MS identification of proteins in wall painting samples: A fast clean up procedure to remove copper-based pigment interferences. *Talanta*, 2007, **73**, 95-102.

Gudixsen K.L., Gitlin I., Whitesides G.M., Differentiation of proteins based on characteristic patterns of association and denaturation in solutions of SDS. *PNAS*, 2006, **103**, 7968- 7972.

Hickman D., Sims T.J., Miles C.A., Bailey A.J., de Mari M., Koopmans M., Isinglass/collagen: denaturation and functionality. *Journal of Biotechnology*, 2000, **79**, 245-257.

Karpowicz A., Ageing and deterioration of proteinaceous media. *Studies in conservation*, 1981, **26**, 153-160

Manzano E., Bueno A.G., Gonzales-Casado A., del Olmo M., Mortars, pigments and binding media of wall paintings in the ‘Carrera del Darro’ in Granada, Spain. *Journal of Cultural Heritage*, 2000, **1**, 19-28.

Matteini M., Moles A., La chimica nel restauro – I materiali dell’arte pittorica. Nardini Ed. **2003**.

Olivo R., Shimokomaki M., No Caminho da Pesquisa – 2a Edição, Editoria Imprint, *Cocal do Sul*, 2002, vol. **1**, 155 p.

Pierce BCA Protein Assay Kit. Thermo Scientific

Rampazi L., Andreotti A., Bonaduce I., Colombini M.P., Colombo C., Toniolo L.,

Analytical investigation of calcium oxalate films on marble monuments. *Talanta*, 2004, **63**, 967-977.

Robinson J.W., Frame E.M.S., Frame II G.M., Undergraduate instrumental analysis - Sixth edition, Marcel Dekker, **2005**.

Ronca F., Protein determination in polychromed stone sculptures, stuccoes and gesso grounds. *Studies in Conservation*, 1994, **39**, 107-20.

Skoog D.A., West D.M., Holler J.F., Crouch S.R., Fondamenti di chimica analitica. EdiSES Ed., **2005**.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, **150**, 76-85.

Stryer L., Biochimica. Zanichelli, **1975**.

Tokarski C., Martin E., Rolando C., Cren-Oliv C., Identification of proteins in Renaissance paintings by proteomics. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**, 1494-1502.

Vagnini M., Pitzurra L., Cartechini L., Miliani C., Brunetti B.G., Sgamellotti A., Identification of proteins in painting cross sections by immunofluorescence microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **392**, 57-64.

Wiechelman K.J., Braun R.D., Fitzpatrick J.D., Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 1988, **175**, 231-237.

Wolf K.L., Sobral P.J.A., Telis V. R.N., Characterizations of Collagen Fibers for Biodegradable Films Production, **2006**, 801-802.