



Corso di Laurea Magistrale
in Scienze chimiche per la conservazione e il restauro
(LM-54 Scienze chimiche, ord. 270/04)

Tesi di Laurea

La caratterizzazione delle sostanze organiche naturali presenti in antichi medicamenti.

Il caso della Spezieria della Scala a Roma

Relatrici

Prof.ssa Francesca Caterina Izzo

Prof.ssa María Luisa Vázquez de Ágredos Pascual

Laureanda

Giulia Carolina Lodi

Matricola 844773

Correlatori

Prof.ssa. Pilar Campíns-Falcó

Prof.ssa Rosa Herráez-Hernández

Dott. Giuseppe Borsato

Anno Accademico

2018 / 2019

Indice

SCOPO DELLA TESI	5
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	7
1.1 L'ANTICA SPEZIERIA DELLA SCALA	7
1.2 ACCENNI ALLA STORIA DELL'USO DI ERBE MEDICINALI	16
1.3 STATO DELL'ARTE SULLO STUDIO DI ANTICHI MEDICAMENTI	17
1.4 LE SOSTANZE ORGANICHE CHE COSTITUISCONO I MEDICAMENTI	21
1.4.1 CARBOIDRATI	21
1.4.2 PROTEINE	23
1.4.3 RESINE NATURALI	24
2.2.4 OLII E GRASSI	26
BIBLIOGRAFIA	28
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI	31
2.1 CAMPIONI	31
2.2 TECNICHE D'INDAGINE UTILIZZATE	32
2.2.1 MICROSCOPIA OTTICA	32
2.2.1.1 MICROSCOPIA OTTICA A EPI-FLUORESCENZA	33
2.2.2 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IN RIFLESSIONE TOTALE ATTENUATA (FTIR-ATR)	34
2.2.3 SPETTROFOTOMETRIA IN RIFLETTANZA DIFFUSA	37
2.2.4 CROMATOGRAFIA LIQUIDA (IT-SPME-CAPLC-DAD)	38
2.2.5 GAS CROMATOGRAFIA ABBINATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA (GC-MS)	40
2.2.6 RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)	45
2.3 ANALISI CONDOTTE SUI CAMPIONI	48
BIBLIOGRAFIA	50
CAPITOLO 3 RISULTATI E DISCUSSIONE	53
3.1 ANALISI PRELIMINARI	53
MICROSCOPIA OTTICA E A FLUORESCENZA E SPETTROMETRIA IN RIFLETTANZA DIFFUSA	53
3.1.1. MICROSCOPIA OTTICA E A FLUORESCENZA SUI CAMPIONI APPARTENENTI ALLA CATEGORIA VEGETALI	55
3.1.2 RIFLETTANZA DIFFUSA DEI CAMPIONI ORGANICI VEGETALI	61

3.1.3 MICROSCOPIA OTTICA E A FLUORESCENZA SUI CAMPIONI APPARTENENTI ALLA CATEGORIA CARBOIDRATI	65
3.1.4 RIFLETTANZA DIFFUSA DEI CAMPIONI ORGANICI CARBOIDRATI	67
3.1.5 MICROSCOPIA OTTICA E A FLUORESCENZA SUI CAMPIONI APPARTENENTI ALLA CATEGORIA PROTEINE	68
3.1.6 RIFLETTANZA DIFFUSA DEI CAMPIONI ORGANICI PROTEINE	71
3.1.7 MICROSCOPIA OTTICA E A FLUORESCENZA SUI CAMPIONI APPARTENENTI ALLA CATEGORIA RESINE O GOMME	72
3.1.8 RIFLETTANZA DIFFUSA DEI CAMPIONI ORGANICI RESINE O GOMME	79
3.1.9 MICROSCOPIA OTTICA E A FLUORESCENZA SUI CAMPIONI APPARTENENTI ALLA CATEGORIA LIPIDI E MISTI	81
3.1.10 RIFLETTANZA DIFFUSA DEI CAMPIONI ORGANICI LIPIDI E MISTI	84
3.2 INDAGINE CHIMICO-FISICA	85
3.2.1 VEGETALI E CARBOIDRATI	85
3.2.2. RESINE O GOMME	104
3.2.3 LIPIDI, MISTI E PROTEINE,; LS139 SEN SYNAP ALB, LS142 BABAM ODINTALG, LS26 BEZOAR, LS223 LADON	137
3.3 CONSIDERAZIONI FINALI	138
3.3.1 USI E PROVENIENZA DEI MEDICAMENTI STUDIATI	147
3.3.2 UTILIZZO DEI COMPOSTI ORGANICI STUDIATI IN ARTE	151
BIBLIOGRAFIA	153
<u>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</u>	158

Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi mira alla caratterizzazione di antichi farmaci rinvenuti presso la sala di vendita della Spezieria della Scala a Roma risalente al '700. La ricerca è parte di un progetto più ampio ed interdisciplinare volto non solo alla caratterizzazione dei prodotti farmaceutici conservati al suo interno ma anche alla musealizzazione dell'antica Spezieria, nell'ottica di valorizzare l'enorme patrimonio culturale lì custodito.

Le precedenti campagne d'analisi hanno permesso di suddividere i campioni prelevati in sette gruppi; uno di questi è quello dei "composti organici" che rappresenta una parte essenziale delle sostanze conservate all'interno della spezieria ed è anche l'oggetto di questa tesi, svolta in collaborazione con l'Universidad de Valencia.

Dalla ricerca bibliografica si evince che alcune delle sostanze organiche naturali usate nella preparazione dei medicinali talvolta venivano impiegate anche in ambito artistico. Nell'elaborato si cercherà infatti di confermare questa doppia accezione utilizzando le analisi come supporto.

Al fine di identificare i composti e costruire un quadro il più ampio e dettagliato possibile, sono state utilizzate diverse tecniche analitiche quali la microscopia ottica, la microscopia a fluorescenza, la spettrofotometria in riflettanza diffusa, la spettroscopia FT-IR in modalità ATR e due diversi tipi di cromatografia: liquida (IT-SPME-CapLC-DAD) e a gas (GC-MS).

Nello specifico, tutti i campioni appartenenti al gruppo dei composti organici sono stati indagati servendosi delle tecniche di microscopia, di spettrofotometria e di spettroscopia che hanno permesso di suddividere i campioni in cinque sottoclassi. Le cromatografie sono state utilizzate per studiare in maniera più approfondita tre delle cinque sottoclassi; i campioni appartenenti alla categoria dei "vegetali" e dei "carboidrati" sono stati analizzati tramite cromatografia liquida (IT-SPME-CapLC-DAD) mentre quelli che rientrano nella categoria "resine e gomme" sono stati analizzati tramite gas cromatografia accoppiata con spettrometro di massa che permette di individuare le molecole più abbondanti presenti nel campione. Inoltre la composizione terpenica di alcuni campioni è stata analizzata in maniera più approfondita tramite la risonanza magnetica nucleare (NMR), incrociando i dati ottenuti con quelli della letteratura si tenta di risalire al genere della pianta da cui provengono le secrezioni.

L'uso di diverse tecniche analitiche è un grande potenziale e consente di indagare i campioni in molteplici aspetti, raccogliendo un set completo di dati che vengono confrontati e integrati tra loro.

Oltre alla parte diagnostica in cui viene eseguita la caratterizzazione dei farmaci settecenteschi appartenenti al gruppo dei composti organici l'elaborato presenta anche una parte di ricerca storica e archeobotanica in cui si ricerca una possibile corrispondenza tra il nome sull'etichetta e i componenti del prodotto farmaceutico stesso. Servendosi della letteratura in merito è stato possibile confermare la correlazione tra il nome scritto sull'etichetta e l'antico medicamento conservato all'interno del contenitore in vetro.

Capitolo 1 Introduzione

1.1 L'antica spezieria della Scala

L'antica spezieria della Scala si trova a Trastevere, in piazza della Scala 23, al primo piano del Convento dei Carmelitani Scalzi, adiacente alla Chiesa di Santa Maria della Scala¹.

Per entrare nel convento bisogna varcare la porta arcata e suonare il campanello della prima porta a sinistra che si scorge in Fig.1-a.

Salendo le scale si arriva davanti all'ingresso vero e proprio dell'antica spezieria: una porta di legno intarsiata con sopra una scritta in latino dal Libro della sapienza, cap. XVI, ver. XII (Fig. 1-b).



Figura 1: a) Ingresso della farmacia e del convento; b) Iscrizione in latino sopra la porta d'ingresso della spezieria, "Né l'erba né la miscela (di queste erbe) li guarì, ma la tua parola, oh signore, sana ogni cosa".

La Spezieria di Santa Maria della Scala è la più antica di Roma ed anche d'Europa, non in quanto erboristeria, ma come fucina di scienza medica e di rimedi perché è stato un luogo di

¹ La Chiesa di Santa Maria della Scala fu eretta tra il XVI e il XVII secolo su commissione di Papa Clemente VIII che affidò il progetto di Francesco Cipriani da Volterra. L'edificio barocco e sorge nell'area in cui prima c'era un'icona raffigurante la "Madonna col Bambino" posta sul muro adiacente a una scala, da qui il nome Santa Maria della Scala [1].

ricerca e di scienza. Tant'è che in questo luogo è nata una scuola carmelitana di medicina e di spezieria.

Durante i primi anni del 1600 una comunità di carmelitani scalzi si stabilì nel convento e iniziò a coltivare erbe aromatiche e medicamentose, iniziando così una modesta pratica erboristica a loro uso e consumo. Per preparare i medicinali però utilizzavano anche sostanze vegetali e risorse minerali provenienti sia dall'Est che dalle Indie Occidentali, ciò non sorprende dal momento che, tra il XVII e il XVIII secolo, l'ordine religioso a cui apparteneva questa farmacia conventuale esercitava il maggior controllo sulle rotte commerciali sia in Estremo Oriente che nel Nuovo Mondo [1, 2]. Decisero di aprire le porte al pubblico alla fine del 1600 e nel tempo acquisirono enorme fama per la loro eccellente competenza sia nel riconoscere le specie vegetali con proprietà medicinali sia nell'isolare i principi attivi riuscendo a combinarli tra loro creando nuove ricette medicamentose. Papi, principi e cardinali utilizzarono i medicinali preparati nel cuore di Trastevere tanto che la spezieria è conosciuta anche come "Farmacia dei Papi"². L'attività durò fino al 1954, anno in cui cessarono la produzione di farmaci, ma chiusero definitivamente nel 1978 quando la farmacia si trasferì al piano terra del convento, all'interno del chiostro che venne coperto e restaurato appositamente per accoglierla [1,2].

Questo gioiello nel cuore di Roma è come se fosse racchiuso in uno scrigno dove il tempo sembra essersi fermato all'epoca in cui è stata interrotta la vendita. È un luogo di valore preziosissimo sia a livello storico che artistico, conserva ancora oggi nei suoi locali strumenti originali e arredi d'epoca (1700 circa). Una volta entrati il colpo d'occhio è sorprendente: un bellissimo soffitto affrescato con al centro lo stemma dell'ordine domina l'ambiente. Dal soffitto sembra scendere un tendaggio circondato da festoni di fiori colorati (Fig.2), i mobili posti alle pareti sono tutti di legno massiccio e sembrano avere la funzione di incorniciare lo spazio. Sotto ai nostri piedi invece c'è il pavimento di maioliche colorate.

² Nel 1829 fornirono i farmaci a Papa Pio VIII, alla sua famiglia e la Guardia svizzera, ed in seguito anche a Papa Gregorio XVI, che nel 1838 rinnovò i privilegi della farmacia [2].

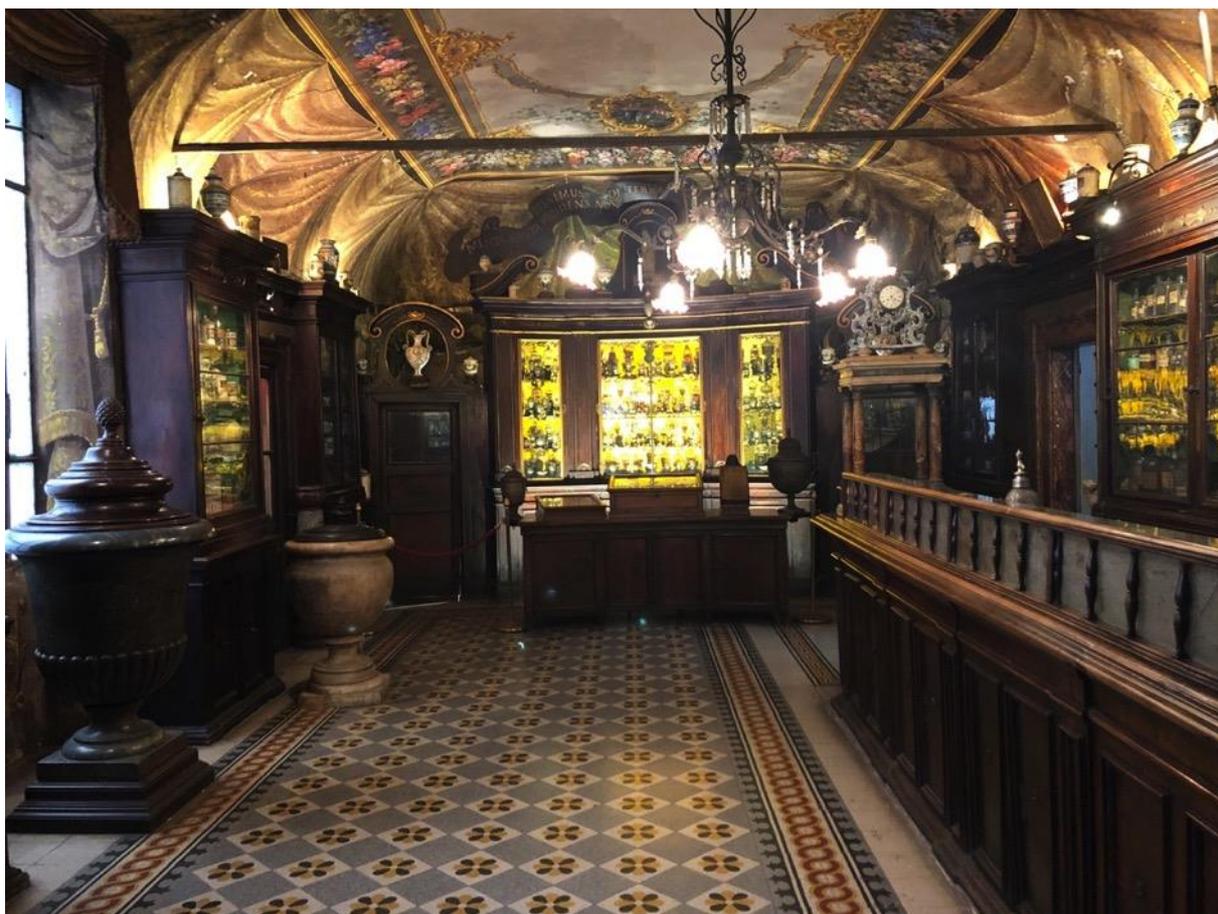


Figura 2: Sala di vendita

In fondo alla sala, esattamente di fronte all'ingresso, si trova la **vetrina principale** (Fig. 3) che cattura immediatamente lo sguardo perché illuminata dalla luce naturale che filtra da una finestra posta sul retro. Il tutto acquista un aspetto magico grazie all'effetto lastra di alabastro dato dal colore con cui sono dipinti i vetri di chiusura sul retro dell'armadio.

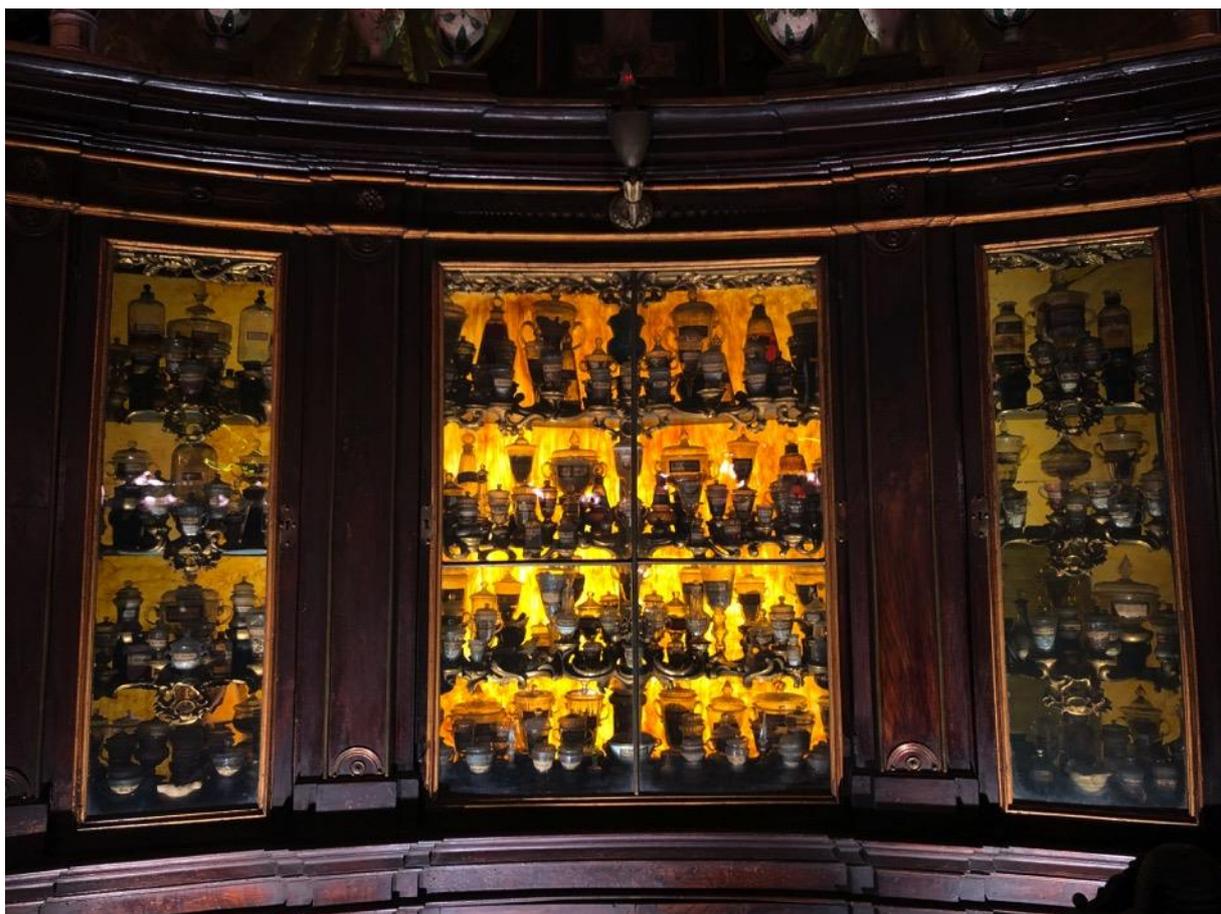


Figura 3: Vetrina principale

All'interno sono collocati vasi in vetro di Murano, ritratti in Fig. 4, ancora colmi di prodotti galenici (l'oggetto di questo lavoro di tesi) esalanti aromi e profumi, e probabilmente con principi ancora attivi [3]. I contenitori sono disposti ad albero della vita, questa composizione permetteva allo speziale/al farmacista di prendere direttamente ciò che gli serviva senza dover toccare altri contenitori perché ognuno di questi è indipendente e accessibile. Si tratta di elementi pronti per preparare i rimedi (composti) [1].



Figura 4: Recipienti in vetro che contengono i medicinali

Sopra la vetrina principale si può notare una scritta in latino che cita un versetto delle sacre scritture “Altissimus de terra creavit medicamentae et vir prudens non abhorrebit illa”, visibile in figura 5, che significa: "Dalla terra l'Altissimo creò i medicinali e l'intelligenza umana non la può aborrire”.

Davanti alla vetrina principale si trova un **bancone di legno** (Fig.5-a). Dentro la teca si trova uno splendido Erbario (conosciuto come *Trattato delli semplici*) che documenta la serietà della scuola erboristica della spezieria. Sul frontespizio è riportata la frase “Herbis non verbis medicorum est pellerere morbos” un inno all'erboristeria. Sono circa 240 pagine in cui Fra'Basilio³ ha descritto le diverse tipologie di piante allegandone rispettivamente un esempio essiccato [1].

³ Fra'Basilio della Concezione (1727- 1804) è stato uno dei più importanti speziali che ha lavorato presso La Scala, dove fondò una prestigiosa scuola per farmacisti, che non dovevano essere per forza frati ma potevano essere anche laici. Al primo piano, all'ingresso della farmacia sulla destra è esposto un dipinto attribuito al Ghezzi che testimonia la veridicità di queste informazioni. Fra Basilio e i suoi discepoli sono rappresentati durante una lezione circondati da alambicchi e mortai, scaffali con grossi libri e armadi con i vasi contenenti sali ed erbe. A Frate Basilio vengono attribuite anche diverse invenzioni, prima fra tutte l'Acqua Antipestilenziale di S. Maria della Scala, un miracoloso medicamento contro la peste bubbonica la cui composizione risulta essere ancora sconosciuta. Viene attribuita a lui anche l'invenzione dell'Acqua di Melissa, un estratto di droghe per curare isterismo e convulsioni, mal di stomaco, mal di testa, palpitazioni, addirittura alito cattivo e mal di denti. Questi medicinali sono conservati ancora oggi in grosse ampolle di vetro all'interno degli armadi della spezieria [1,2,3].

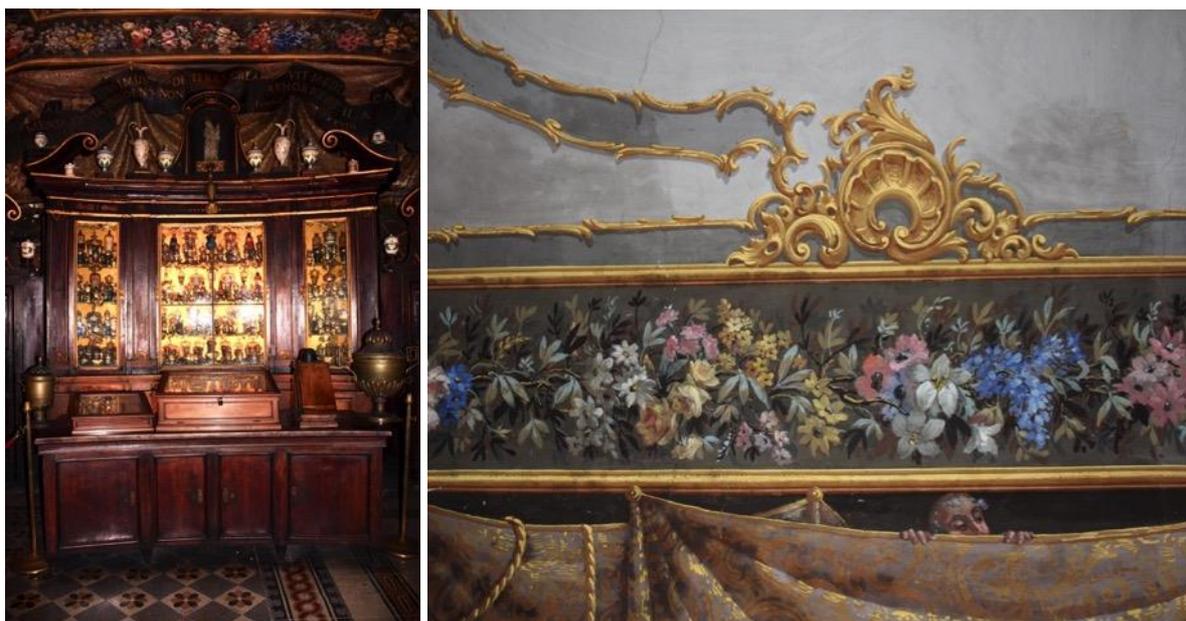


Figura 5: a) Vetrina principale con il bancone dello speziale; b) particolare degli affreschi sul soffitto

Sul lato sinistro del locale, di fronte al banco di vendita, si trova un grande vaso scuro dov'è visibile l'incisione *Theriaca*⁴, un antidoto la cui formula migliorata conta circa 57/60 elementi tra cui erbe, polvere di oro, pietre preziose (perle, mirra dell'India, Nardo). L'ingrediente principale era la carne di vipera a cui si attribuivano proprietà antitossiche [1,2].

Questo "farmaco" veniva usato per curare ictus cerebrale, dissenteria, impotenza sessuale, febbre e dolori; è stato prescritto dai medici per circa diciotto secoli. Tutti questi ingredienti si trovavano all'interno della farmacia e molti di questi sono lì conservati ancora oggi [1]. Nel secondo vaso si trova una crema di canfora, conservata lì da circa 20/30 anni. Non appena si alza il coperchio si viene investiti da un odore fortissimo, quasi pungente.

⁴ La *theriaca* è un antico farmaco ideato da Andromaco, medico di Nerone, poi perfezionato da Critone, medico dell'imperatore Traiano. Galeno, il Medico di Marco Aurelio, nella sua ricetta personale della teriaca inserì anche l'oppio e la valeriana come componente sedativa [4]. La storia insegna che Mitriade VI (132-63 a.C.), re di Ponto, consumava abitualmente la *theriaca* per paura di morire a causa del morso di una vipera, diventò quindi immune al veleno e quando, in seguito a una sconfitta in battaglia, decise di togliersi la vita per avvelenamento, non gli fu possibile perché era ormai diventato immune [5]. Dal XV-XVI secolo la teriaca veneziana era considerata la migliore perché era il porto più importante del mediterraneo, e quindi le sostanze provenienti da lontano arrivavano prima a Venezia e poi venivano distribuite nel resto d'Italia, dove gli ingredienti arrivavano dopo un lungo viaggio. Probabilmente i veneziani si tenevano gli ingredienti migliori. Il popolo si radunava in piazza San Marco per assistere a una cerimonia pubblica per la preparazione della teriaca. Per la preparazione di questo farmaco nell'antica spezieria di Santa Maria della Scala era necessario ottenere la firma di 3 firmatari: il delegato del Papa, il delegato del superiore provinciale dei carmelitani e il rappresentante dell'associazione dei farmacisti [1].

Dopo i due grandi vasi, sempre sul lato destro della sala si trova l'ingresso del **Laboratorio Galenico**⁵, un laboratorio di analisi, dove i frati preparavano i loro rimedi. Sono ancora presenti alambicchi di distillazione, mortai e ampolle.

Sul lato destro della sala di vendita si trova il bancone destinato alla vendita ai cui lati poggiano due eleganti bilance: una sostenuta da un baldacchino in pietra e ceramica e l'altra adattata ad un arco trionfale di marmo.

Tra il **bancone di vendita** e la **vetrina dei veleni**⁶ c'è l'ingresso dello **studio** dei frati dove si consultavano con i medici dopo che questi, visitati i pazienti, avevano scritto le loro ricette, in genere a base di droghe vegetali. Qui gli speciali leggevano i testi, consultavano gli erbari, predisponevano la preparazione delle ricette, ricevevano sia i viperai (contadini che di inverno raccoglievano i rettili in letargo) che i fornitori di sanguisughe.

Appena si entra nello studio si nota uno schedario dei medici, un bancone su cui si trovano un microscopio ottico d'epoca, una bilancia di precisione, pipette e burette.

In alto si trova una locandina pubblicitaria datata 1900 per celebrare i 200 anni della spezieria. In mezzo c'è il numero di telefono della farmacia.

Tra le due finestre si trova un armadio con dipinti animali (come castoro, faina, cervo) e piante (probabilmente alcune tra quelle utilizzate dai frati). Lì sono riposte grandi scatole di legno di sandalo (ottimo per la conservazione perché non viene attaccato dai tarli), alcune delle quali conservano antichi medicinali semplici come le corna di cervo, che venivano grattugiate e utilizzate per creare medicinali per favorire la fertilità. Nella vetrina sono conservati alcuni testi antichi. È quel che resta della biblioteca del convento dopo l'esproprio del 1870 ad opera del neocostituito regno d'Italia. Gli antichi volumi (più di 5000 volumi) sono stati portati via insieme a quelli delle altre biblioteche conventuali e formarono il primo nucleo della biblioteca Nazionale che oggi di trova in viale Castro Pretorio a Roma [1, 2].

Sulla scrivania in fondo allo studio c'è la litografia, pietra incisa al contrario che utilizzavano per scrivere le ricette. Sopra si trova il ritratto di padre Basilio.

Sulle ante del lungo armadio sono raffigurati i maggiori esponenti della medicina mediterranea occidentale e mediorientale islamica i cui trattati descrivono le proprietà e gli

⁵ Dal nome del medico Galeno di Pergamo, da cui deriva la galenica, arte di preparazione di farmaci (cfr. nota 10).

⁶ Questi elementi sono molto pericolosi, per questo erano sistemati in una vetrina a parte riservata. Il sostantivo *φάρμακον* in greco può significare sia medicina, intesa come antidoto, sia veleno, la proprietà benefica o dannosa dipendeva dal dosaggio, per questo era necessario prestare molta attenzione al dosaggio altrimenti potevano indurre la morte [6].

usi dei medicinali: Ippocrate⁷, Mitridate⁸, Dioscoride⁹, Galeno¹⁰, Avicenna¹¹ e Paracelso¹² [2].

Nella parte interna delle ante dell'armadio sono rappresentati i ritratti delle persone di rilievo e l'anno in cui hanno visitato la farmacia. Aprendo le prime due ante a destra si trovano Vittorio Emanuele I e la moglie Maria Teresa d'Austria (reali di Savoia), che visitarono la spezieria nel 1802 ed erano clienti di frate Basilio. All'interno ci sono dei sali di allume di rocca (ottimo cicatrizzante), cristalli di borace, allume e magnesio lavorati a forma di croce, di obelisco, di piramide o di piante (probabilmente erano ex-voto). Aprendo le ante seguenti si trovano i ritratti la duchessa Elena d'Aosta (nelle vesti di crocerossina) e suo figlio Umberto di Savoia principe del Piemonte (poi re d'Italia solo nel mese di maggio) visitarono la farmacia rispettivamente nel 1923 e nel 1924. Infine, Maria José, moglie di Umberto che visitò la farmacia nel 1934. All'interno si trovano anche eleganti scatole di legno di sandalo nelle quali i frati conservavano le erbe medicinali essiccate raccolte nell'orto del convento o portate da contadini raccoglitori (Fig.6).

⁷ Ippocrate (460-377 a.C.), noto come il "padre della medicina", nacque nell'isola di Cos sede del tempio del dio della Medicina, Esculapio. Cambiò per sempre l'approccio alle terapie descrivendo per la prima volta le regole per raccogliere i rimedi vegetali (come belladonna, oppio, menta, ecc.), le norme da seguire durante la preparazione dei medicinali, la loro classificazione in base all'effetto (purganti, emetici, diuretici, ecc.) e i modi di utilizzo [7].

⁸ Cfr. storia di Mitridate nota 4.

⁹ Dioscoride (I secolo d.C.) fu un botanico, farmacista e medico greco. È noto per la sua opera *De Materia Medica* datata circa 60 d.C., composta da 5 volumi in cui descrive tutti i medicinali conosciuti all'epoca (di origine vegetale, animale e minerale) secondo la classificazione stilata da Ippocrate, dove i farmaci sono elencati in base al loro utilizzo terapeutico: purganti, astringenti, anestetici ecc. Quest'opera è rimasta un testo di riferimento fino al XVIII secolo [8, 9].

¹⁰ Galeno (129-200 d.C.) fu il più grande medico dell'antichità, dopo Ippocrate. Nacque a Pergamo e studiò ad Alessandria. Fondò a Roma una scuola di medicina, dove introdusse anche lezioni di anatomia e fisiologia ottenendo enorme fama. Catalogò i farmaci in tre gruppi: i farmaci elementari, quelli complessi e quelli con azione specifica (ex. lassativi, diuretici, ecc.). Era fermamente convinto che chi prescriveva i medicinali li dovesse preparare in prima persona [10].

¹¹ Avicenna (980-1037) fu un medico persiano. La sua opera più famosa è il *Canone della Medicina*, che tradotta in latino fu letta in Europa fino al 1700. In questo testo inserì anche una raccolta di medicinali (semplici) e preparati farmaceutici (composti). Composti chimici come l'allume e il solfato di ferro furono introdotti in medicina grazie a lui [11].

¹² Paracelso Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493-1541), fu medico, filosofo naturale, alchimista e astrologo svizzero. Sosteneva che i migliori insegnamenti medici provenissero dalla sua esperienza personale e non dai testi di Ippocrate, Galeno e Avicenna. Applicò astrologia e alchimia alla medicina tanto da sostenere che la malattia fosse causata dallo squilibrio tra zolfo, sale e mercurio. Reintrodusse l'oppio come terapia, individuò lo zinco, il nitrato d'argento e i sali di antimonio come precursori di farmaci [12].



Figura 6: Scatole in legno di sandalo conservate dell'armadio nello studio

Risale invece al XVII secolo il **liquorificio**, il cui ingresso è adiacente a quello dell'antica spezieria. Lì sono conservati un frantoio originale, una pilloliera, presse per l'estrazione delle essenze, ampolle, alambicchi, vasi, imbottigliatrici, centrifughe, torchi e setacci [13, 14].

Ormai i principi attivi delle droghe erano isolati per via chimica e sostituivano nelle preparazioni le droghe vegetali e le altre sostanze di origine naturale¹³ [1,4].

L'antica Farmacia è oggi un museo affidato in custodia all'ordine dei Carmelitani Scalzi dall'Agenzia del demanio (beni demaniali- filiale del Lazio), e ci documenta come fosse organizzata una grande spezieria del '600 che è possibile visitare facendone richiesta ai Frati Carmelitani Scalzi.

¹³ Un esempio è l'isolamento della morfina ad opera di Friedrich Sertürner, un farmacista tedesco che estrasse questo alcaloide attivo dalla pianta di papavero da oppio nel dicembre 1804 a Paderborn (Germania) [4]. In medicina viene utilizzata come antidolorifico per dolori acuti e cronici [15].

1.2 Accenni alla storia dell'uso di erbe medicinali

Documentandosi riguardo l'utilizzo di composti organici come medicinali nei secoli occorre sottolineare il fatto che per oltre 3000 anni gli esseri umani hanno usato piante medicinali per curare malattie [16]. Le piante medicinali erano sfruttate come combustibile, abbigliamento, rifugio e fonte di nutrimento, il loro utilizzo su larga scala ha permesso ai popoli di culture diverse di conoscerne le proprietà e per questo di utilizzarle come prodotti per la cura del corpo, cosmetici e come risorsa medica per trattare le malattie. Le conoscenze sulle piante medicinali sono state trasmesse di generazione in generazione diventando una delle più antiche scienze in paesi come Cina, Grecia, Egitto e India [17].

Il primo scritto che è prova dell'uso di piante medicinali per la preparazione di medicinali è stato trovato su una lastra di argilla sumerica di Nagpur risalente a circa 5000 anni fa [17]. La medicina tradizionale cinese faceva uso di medicinali di origine vegetale e animale già intorno al 1100 a.C. Ad oggi ne riconosce più di 13.000 di cui 1900 rimedi diversi venivano utilizzati già alla fine XVI secolo [16]. Anche gli antichi greci usavano piante medicinali per il trattamento di malattie, questo è confermato dagli scritti di Ippocrate [17].

La prima farmacopea europea nota, *De Materia Medica*, composta da cinque volumi è stata scritta da Dioscoride nel I secolo d.C. (crf. nota 9). Gli erboristi di questo periodo iniziale sono stati identificati in molte popolazioni indigene in tutto il mondo, anche in America (del Nord e del Sud), in India e in Australia [16].

Nel periodo medievale in seguito, la fitoterapia fiorì sia nel mondo islamico che in quello cristiano [16]. Fino al XVIII secolo l'uso delle medicine a base di erbe era interamente basato sull'empirismo: i professionisti sapevano che cosa funzionasse, ma non perché o come. Solo alla fine del XVIII secolo iniziarono a studiare le azioni dei farmaci e il modo in cui facevano effetto. William Withering¹⁴ nel 1780 fu uno dei primi a studiare e isolare il principio attivo in un rimedio a base di erbe. La scienza della farmacologia si sviluppò lentamente nel corso del secolo successivo [16].

¹⁴ William Withering (1741-1799) isolò la digitale dalla *Digitalis*, descrivendone l'estrazione da varie parti della pianta, i suoi effetti successivi e il modo ottimale di usarlo per curare i pazienti. La utilizzò per curare la cardiopatia [16].

1.3 Stato dell'arte sullo studio di antichi medicinali

A oggi più di un decimo delle piante (oltre 50 000 specie) è utilizzato in prodotti farmaceutici e cosmetici [16]. Lo studio di questi composti è importante da un punto di vista storico, antropologico e sociale. L'analisi chimica di questi materiali può fornire informazioni eccezionali riguardanti sia le conoscenze farmaceutiche e tecnologiche sia le pratiche nel loro utilizzo. In particolare, le analisi relative alle sostanze e alle miscele organiche sembrano essere di fondamentale importanza per identificare i materiali, comprenderne l'origine e il loro utilizzo e fornire ulteriori informazioni anche relative alla vita di tutti i giorni. Sono questi i temi di numerose ricerche e lavori riguardanti la caratterizzazione di antichi cosmetici e residui archeologici [18].

In letteratura si trovano diverse pubblicazioni che fanno luce sulla provenienza e sull'utilizzo dei medicinali che sono rimasti all'interno dei contenitori per secoli. Per esempio, nell'articolo scritto dal Dr. E. Riva nel 2001 vengono collezionati diversi passi di trattati antichi in cui si parla della canfora e della sua estrazione [19]. Mentre lo studio riguardante antichi unguenti condotto da Gamberini et al. (2011) cita la Farmacopea Augustana di Occo, *Abrégé de Matière médicale et de Thérapeutique* di C. Binz o la Farmacopea Hispanica facendo riferimento ad antichi testi in cui vengono riportate antiche ricette [20]. Un recente studio eseguito da Mackonochie e Heinrich ha come oggetto i medicinali conservati all'interno di una farmacia del XIX secolo, che sono stati analizzati e confrontati con testi scritti dell'epoca per comprendere quanto si conosceva sui medicinali di origine botanica nella Gran Bretagna del XIX secolo. Il confronto dei contenuti con i testi del XIX secolo ha indicato che nessuna singola fonte storica fornisce un quadro completo del consumo di droga botanica al momento [21]. Tutte le informazioni riguardanti l'utilizzo e la storia degli antichi farmaci sono un sostegno davvero fondamentale per l'interpretazione dei dati analitici e diventano di importanza fondamentale quando si cerca di proseguire con un progetto che preveda la riproposizione delle antiche ricette [20].

In letteratura si trovano diversi articoli che parlano della caratterizzazione dei materiali, soprattutto di antichi cosmetici [18, 22, 23, 24, 25], degli studi su residui organici di materiali contenuti in recipienti ceramici egiziani [26] o ritrovati all'interno di un antico plumpekanne etrusco [27].

La letteratura scientifica specifica fornisce studi analitici molto limitati sui rimedi farmaceutici e sui farmaci dell'età moderna. Sembra quindi che questo studio (come l'intero progetto sulla spezieria della Scala) sia pionieristico per quanto riguarda la caratterizzazione chimico-fisica è eseguita su medicinali settecenteschi provenienti da un'antica spezieria.

La collezione di antichi medicinali conservati all'interno della Spezieria di Santa Maria della Scala non è mai stata l'oggetto di studio di altri progetti di ricerca, se non di quello ampio ed interdisciplinare diretto dalla Professoressa María Luisa Vázquez de Ágredos Pascual, di cui questo lavoro di tesi fa parte.

Da un primo studio storico-artistico svolto da Vázquez de Ágredos Pascual et al. (2017) si evince che gli antichi medicinali sembrano essere le stesse sostanze minerali, vegetali e animali che sono state utilizzate a scopo terapeutico nell'antica Grecia e dell'antica Roma, filtrate attraverso la notevole influenza dell'Egitto e del Vicino Oriente, da Sumeri ai Babilonesi. Ciò sembra trovare conferma poiché queste sostanze e le loro proprietà curative sono menzionate in molte fonti storiche, da Ippocrate a Galeno. Le etichette apposte sui contenitori degli antichi farmaci in alcuni casi presentano riferimenti a credenze mitologiche greco-romane¹⁵, mentre in altri riportano il nome scientifico [28].

Questa ricerca si è posta quindi l'obiettivo di studiare archeometricamente i farmaci, i pigmenti e le fragranze conservati presso la Spezieria di Santa Maria della Scala. Le analisi preliminari svolte tramite XRF, Raman e FTIR hanno permesso di suddividere i medicinali in sette gruppi: (1) le formulazioni complesse, (2) i farmaci preparati con mercurio, (3) i farmaci preparati con antimonio, (4) i farmaci preparati con ferro, (5) i composti organici, (6) i sali usati e (7) le gemme [2].

Il gruppo più abbondante è quello dei sali che è stato analizzato tramite FTIR e XRPD. Da queste analisi Vazquez et al. (2018) e Cavallo et al. (2018) sono giunti alla conclusione secondo cui il costituente principale sia il solfato di potassio (K_2SO_4) e che questi sali possano anche essere stati usati come componenti per altri farmaci, incluse formulazioni complesse. A sostegno di questa ipotesi sono state trovate fonti scritte risalenti al XVII e XVIII secolo, tali come Farmacopea ad uso dei poveri (1794), in cui viene spiegato chiaramente che i sali erano ampiamente usati per curare le malattie dei poveri [8]. Ma non solo, questo studio conferma che la farmacia vendeva medicinali o principi per medicinali, materiali artistici e anche prodotti per produzione di pigmenti (allume-K o borato) [29].

I medicinali, i materiali pittorici e gli usi rituali di alcune di queste sostanze sono attestati sia da Plinio il Vecchio che da Galeno nei rispettivi trattati [28]. La vendita di materiali per artisti nelle farmacie/spezierie era una pratica molto comune in Italia prima del XV secolo quando

¹⁵ Sono state trovate corrispondenze tra i nomi riportati sulle etichette e i nomi di divinità greco-romane e pianeti ad esempio "Antymon. Diaphor Mart", "Magist. Mart. " e " Tinta. Mart. Pom.", includono tutti un riferimento a Marte (Marte). Non mancano anche riferimenti a luoghi sacri (ex. "Terr. Lemn." allude alla sacra Terra di Lemno che veniva preparata dalle sacerdotesse devote alla dea Diana ogni anno presso il suo santuario nell'isola che porta questo nome. Questo farmaco era prescritto per il trattamento dell'epilessia, denominata "malattia sacra" nel Corpus Hippocraticus, data l'associazione dell'epilessia con la Luna e quindi con Artemisia- Diana) [28].

una professione specifica chiamata *vendecolori* (venditori di pigmenti) è stata istituita a Venezia che divenne il centro più importante in cui gli artisti e gli agenti potevano ottenere materiali artistici. Anche in area germanica i pigmenti degli artisti erano disponibili in farmacia durante il Medioevo [29].

Una delle conclusioni più interessanti di questo studio è che molte sostanze identificate avevano sia un'applicazione medicinale che un uso artistico anche se l'abbondanza di solfati e altri sali come i cloruri, carbonati, fosfati, borati e solfuri indicano che il commercio di materiale artistico non era la pratica principale in farmacia [29].

I progetti relativi alla Spezieria sopracitati sono stati svolti in collaborazione con diversi enti.

Presso il *Laboratorio de análisis y diagnóstico de obras de arte de la Universidad de Valencia* sono state scattate le fotografie in luce diffusa di tutti i campioni servendosi del microscopio ottico (MO). Presso il *Laboratoire d'archéologie moléculaire et structurale (LAMS), Sorbonne Universités* sono stati analizzati i campioni per ottenere informazioni di tipo elementale utilizzando la fluorescenza a raggi X (XRF), ma anche per rivelare legami intermolecolari e la presenza di gruppi funzionali specifici servendosi della spettroscopia infrarossa. I solidi cristallini sono stati studiati presso *l'Institute of Materials and Constructions DACD-SUPSI* utilizzando la tecnica di diffrazione a raggi X (XRD).

Infine la ricerca riguardante la caratterizzazione dei composti organici è stata condotta in parte presso l'Università Ca' Foscari di Venezia (Dipartimento di Scienze Ambientali e Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi) ed in parte l'Universidad de Valencia (*Departamento de Química Analítica*).

Il gruppo dei composti organici presenti all'interno dell'antica spezieria non è mai stato studiato prima d'ora. Sono stati registrati gli spettri infrarossi di alcuni campioni presso il LAMS, *Laboratoire d'Archeologie Moléculaire et Structurale, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, UMR 8220, 4 Place Jussieu 75005 Paris, France* prima che l'Università Ca' Foscari entrasse a far parte del progetto. Il lavoro di interpretazione è stato eseguito dalla sottoscritta con la supervisione delle professoresse P. Campíns-Falcó e R. Herráez-Hernández, MINTOTA group, Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spagna, della mia relatrice, la Prof.ssa F.C. Izzo, Dipartimento di scienze ambientali, Università Ca' Foscari di Venezia e della Prof.ssa M. L. Vázquez de Ágredos Pascual, Departamento de

Geografía y Historia, Universidad de Valencia, la responsabile dell'intero progetto di investigazione.

Ogni medicamento è diverso dagli altri, ciò comporta una difficoltà in più perché bisogna trattare ogni campione come se fosse a sé stante. Non bisogna vedere questo fatto come uno svantaggio ma come un'opportunità perché dietro al nome scritto sull'etichetta si apre un mondo a parte. A questo proposito è bene sottolineare che sono state eseguite ulteriori ricerche bibliografiche riguardanti lo studio dell'origine e dell'uso dei farmaci lì conservati e, per rendere più discorsiva la trattazione, si è deciso di riportare le informazioni riguardanti i medicinali nel capitolo 3.

Ci si pone quindi l'obiettivo di verificare le informazioni ottenute tramite le indagini analitiche svolte.

I farmaci non presentano somiglianze chimiche, fisiche, strutturali o biologiche. Non esiste quindi alcuna giustificazione scientifica per trattare collettivamente i prodotti farmaceutici come un insieme coerente di sostanze chimiche. I prodotti farmaceutici sono spesso considerati come strutture chimiche complesse, ma possono anche essere semplici molecole aromatiche come l'anestetico, il propofol (2,6-diisopropilfenolo). L'unico fattore comune che accomuna i prodotti farmaceutici è il *loro uso* [16].

Si possono utilizzare diverse parti delle piante medicinali come i semi, le radici, le foglie, i frutti, la corteccia, i fiori, gli essudati o anche l'intera pianta. I composti attivi nella maggior parte delle piante medicinali hanno effetti terapeutici diretti o indiretti e sono usati come agenti medicinali. I componenti della pianta possono interagire l'uno con l'altro e questa interazione può essere utile per entrambi o avverso per uno di essi o eliminare gli effetti nocivi di entrambi [17].

1.4 Le sostanze organiche che costituiscono i medicinali

La composizione chimica dei materiali organici naturali varia secondo le specie di origine animale o vegetale, tale complessità aumenta poiché spesso ci si trova davanti ai loro prodotti di trasformazione, dovuti principalmente all'invecchiamento. Per questo motivo, considerando l'eterogeneità dei campioni, si è deciso di riportare le informazioni bibliografiche riguardo le sostanze nel capitolo 3 dove sarà eseguita la trattazione specifica dei campioni più rappresentativi.

In questa sezione sono riportate le informazioni più generali relative ai composti che sono stati trovati all'interno degli antichi medicinali.

1.4.1 Carboidrati

I carboidrati, detti anche glicidi, sono poli-idrossialdeidi e poli-idrossichetoni, ovvero aldeidi e chetoni a cui vengono aggiunti dei gruppi ossidrilici. Sono descritti dalla formula $C_n(H_2O)_n$, dove $n \geq 3$, e sono suddivisi in base al numero delle unità ripetitive:

- monosaccaridi (composti da una sola unità ripetitiva),
- disaccaridi (composti da due unità ripetitive),
- trisaccaridi (composti da tre unità ripetitive),
- oligosaccaridi (composti da 4 a 10 unità ripetitive),
- polisaccaridi (composti da molte unità ripetitive, in genere più di 10)

Mono, di, tri e oligosaccaridi sono anche chiamati carboidrati semplici, mentre i polisaccaridi possono essere denominati anche carboidrati complessi [30]. Sono i composti maggiormente presenti in natura, infatti sono presenti all'interno delle piante (costituendone circa il 3/4 in peso), ovvero nelle fibre vegetali e nelle gomme vegetali, nel legno, nei gusci dei crostacei, nei tessuti connettivi degli animali e negli acidi nucleici. Vengono utilizzati dalle piante come fonte di energia.

Tabella 1: Caratteristiche dei carboidrati

Solubilità	Solubili in acqua e in solventi polari protici Poco solubili in etanolo Insolubili in solventi non polari (ex. Cloroformio, benzene)
Proprietà	Filmogene

Il disaccaride più diffuso nel regno vegetale è il saccarosio, ovvero lo zucchero da cucina. Viene ricavato dalla barbabietola da zucchero ed è composto da una molecola α -D-glucopiranosica legata a una di β -D-fruttofuranosica, il legame glicosidico interessa entrambi gli atomi di carbonio anomeric¹⁶, infatti non avendo nessun gruppo aldeidico libero si tratta di uno zucchero non riducente [30, 31]. Nelle piante sono presenti due importanti polisaccaridi entrambi polimeri del glucosio: l'amido e la cellulosa.

L'amido è costituito principalmente da amilosio (20-25%) e amilopectina (75-80%), la loro idrolisi completa porta alla formazione del D-glucosio. L'amilosio e amilopectina sono dei polisaccaridi, il primo è a catena lineare ed è composto da unità glucosidiche connesse da legami α -1,4-glicosidici; la seconda è costituita da unità di glucosio legate da legami α -1,4-glicosidici e anche α -1,6-glicosidici che generano ramificazioni. Le piante immagazzinano il glucosio sotto forma di amido che è presente in radici, bulbi, tuberi e semi di tutti i tipi di piante [30, 32].

La cellulosa è costituita da fibre, ovvero da fasci di catene lineari composte da unità di glucosio legate tra loro da legami β -1,4-glicosidici. Questa conformazione fa sì che la fibra sia scarsamente solubile in acqua [30, 31]. cellulosa derivano le fibre tessili quali il cotone (cellulosa quasi pura), rayon (cellulosa modificata chimicamente) e rayon viscosa (cellulosa rigenerata).

All'interno dei polisaccaridi si trova anche l'eparina composta da catene solfonate di N-acetil-D-glucosammina, acido-D-glucuronico, D-glucosammina, acido L-ioduronico, legati tra loro da legami α -1,4- e β -1,4-glicosidici. In medicina viene utilizzato come anticoagulante.

Alla classe dei polisaccaridi appartengono anche le gomme e le mucillaggini vegetali, essudati resinosi prodotti in seguito a un trauma o a una malattia. Nel primo caso, se la corteccia viene danneggiata fuoriesce un liquido gommoso che si indurisce all'aria; nel secondo caso invece, le fibre ossidate vengono trasformate in carboidrati.

La loro struttura chimica è la stessa ed è molto complessa e non del tutto chiara, la differenza sta nel comportamento in acqua. Dalla letteratura si evince che i componenti principali siano monosaccaridi e sali di potassio, calcio e magnesio in percentuale diversa¹⁷ in base alla provenienza delle piante. Tutte però hanno caratteristiche simili:

¹⁶ Prende il nome di carbonio anomero l'atomo C₁ che diventa uno stereocentro nella forma emiacetalica data dalla reazione di aldeidi e alcoli.

¹⁷ Gomma arabica (0% xilosio, 30% arabinosio, 13% ramnosio, 0% fucosio, 0% glucosio, 45% mannosio, 0% galattosio, 12% acido galatturonico, 0% acido glucuronico).

Tabella 2: Caratteristiche delle gomme vegetali (carboidrati)

Solubilità	Solubili in acqua (differenza con le resine vegetali) Insolubili in solventi organici
Proprietà	Leganti Adesive Reversibilità in acqua anche dopo l'invecchiamento
Aspetto	Struttura amorfa e compatta più o meno trasparenti Incolore (se molto pure) giallognolo o bruno (se con impurezze)

1.4.2 Proteine

Le proteine sono polimeri ad alto peso molecolare ($PM \geq 5000$) molto importanti in biologia perché svolgono un ruolo fondamentale in tutti gli organismi viventi: le cellule animali e vegetali sono costituite da proteine che sono presenti in qualità di enzimi, anticorpi e ormoni. Sono composte da lunghe catene di α -amminoacidi collegati tramite un legame tra il gruppo α -amminico di un amminoacido e il gruppo α -carbossilico dell'altro, che prende il nome di legame peptidico [33]. Gli amminoacidi sono costituiti da un gruppo funzionale amminico ($-NH_2$) (base) e uno carbossilico ($-COOH$) (acido) che reagiscono tra loro formando i sali chiamati *zwitterioni*. Gli amminoacidi che sono identificati nelle proteine sono 20 e si differenziano in base alla natura delle loro catene laterali (polari, non polari, acide, basiche) [30].

Anche i semi delle piante leguminose e cereali contengono proteine i cui estratti acquosi trovano applicazione come adesivi. Tra i prodotti utilizzati in campo artistico è necessario menzionare l'uovo, la colla animale e quella di pesce, il latte e la caseina, tutti elementi che hanno proprietà leganti e adesive [32]. Le proteine sono costituenti principali anche della pergamena e quindi fungono da supporto e possono anche essere impiegati come sostanze pulenti quando si parla di pulitura enzimatica.

Gomma adragante (15% xilosio, 35% arabinosio, 3% ramnosio, 7% fucosio, 12% glucosio, 0% mannosio, 10% galattosio, 14% acido galatturonico, 4% acido glucuronico).

Ciliegio (7% xilosio, 35% arabinosio, 3% ramnosio, 0% fucosio, 6% glucosio, 37% mannosio, 0% galattosio, 13% acido galatturonico, 4% acido glucuronico).

Gomma gutta (PRESENTE xilosio, COMP.PRINC. arabinosio, 0% ramnosio, 0% fucosio, 0% glucosio, PRES. mannosio, COMP.PRINC. galattosio, 0% acido galatturonico, PRES. acido glucuronico).

1.4.3 Resine naturali

Le resine naturali sono delle sostanze polimeriche, ovvero essudati provenienti da piante o secrezioni di insetti. Possono provenire sia dalla normale produzione di una pianta sana (resine fisiologiche) che da un processo di difesa a seguito di un trauma o dell'attacco di un agente patogeno (resine patologiche) [34]. Sono conosciute fin dall'antichità e grazie alle loro proprietà (Tabella 9) vengono utilizzate in larga scala all'interno di formulazioni per adesivi, stucchi e vernici, anche in ambito pittorico e nel restauro di opere d'arte. Mescolandole con olio o altri leganti si ottengono le "vernici grasse", che grazie alle loro proprietà filmogene, adesive e idrorepellenti rendono trasparenti e proteggono le superfici pittoriche [31]. Inoltre, queste sostanze venivano largamente usate come medicinali poiché sono composte da molecole con struttura steroidea che quindi hanno effetti antinfiammatori [30].

Le caratteristiche chimico-fisiche principali delle resine naturali si possono riassumere così:

Tabella 1.3: Caratteristiche delle resine vegetali

Solubilità	Insolubili in acqua (differenza con le gomme vegetali) Solubili in solventi organici
Proprietà	Filmogene Adesive Idrorepellenti
Infiammabilità	Bruciano con fiamma fuliginosa
Aspetto	Struttura amorfa (quando sono in forma solida) Viscosi e appiccicosi (allo stato fuso)

- La composizione delle resine naturali è in generale molto complessa: si tratta di miscele di sostanze costituite da molecole semplici (a catena più o meno lunga) e da altre molecole decisamente più complesse. Le prime contengono una varietà di composti che sono prevalentemente di natura terpenica¹⁸ come gli *oli essenziali* (idrocarburi terpenici e i loro derivati alcolici ed eteri), gli *acidi resinosi* (struttura complessa di tipo terpenico con atomi di C variabili) a cui si aggiungono gli *acidi*

¹⁸ I terpeni sono idrocarburi insaturi (formula generale $(C_5H_8)_x$, con $x \geq 2$), possono essere aciclici o ciclici e sono largamente diffusi nelle piante, insieme ai loro derivati (alcoli, aldeidi e acidi che prendono il nome di terpenoidi). Derivano dalla condensazione di 2 o più molecole di isoprene.

aromatici (non sempre presenti) e i *reseni* (sostanze polimeriche ancora poco conosciute, chimicamente inerti) [35, 36].

I composti conosciuti che costituiscono le resine naturali si dividono in diverse tipologie:

- monoterpeni (contengono 10 atomi di carbonio per molecola),
- sesquiterpeni (15 atomi di C),
- diterpeni (contenenti 20 atomi di C)
- triterpeni (30 atomi di C), con gruppi funzionali differenti: alcolici, carbossilici e carbonilici.

In letteratura viene riportato che nella maggior parte delle resine sono presenti mono e sesquiterpeni, ma questi composti non possono essere considerati utili ai fini dell'identificazione e della classificazione delle resine dal momento che, solo raramente¹⁹, sono presenti all'interno dei campioni antichi, in quanto sono molto volatili.

L'origine della resina è invece identificabile tramite la presenza di di- o triterpeni che, al contrario dei mono- e dei sesqui-, non si trovano mai all'interno della stessa resina e che quindi caratterizzano due diverse tipologie di resina.

Per questo si è deciso di riportare solo la composizione chimica delle resine provenienti da essudazioni di alberi viventi e dei loro derivati (oleoresine e balsami):

- **Resine diterpenoidi:** formate da acidi abietadienici (acido palustrico, levopimarico, abietico, neoabietico), acidi pimaradienici (acido sandaracopimarico, isopimarico, pimarico) e acidi labdanici (acido turosolico, agatico, agatolico, comunico) e composti labdanici neutri (mannolo, epimannolo, larixolo e larixolo acetato), rispettivamente a struttura tricyclica (le prime due famiglie) e bicyclica solo per quanto riguarda i labdani. Gli acidi labdanici, al contrario dei composti labrdanici neutri, solitamente non vengono rivelati in campioni antichi perché il doppio legame coniugato della catena lineare è molto reattivo e dà inizio a reazioni di polimerizzazione. Fanno parte di questa classe la resina di pino, trementina veneta, la sandracca e il balsamo canadese.
- **Resine triterpenoidi:** composte da molecole a struttura tetracyclica (a struttura dammaranica o eufanica) o pentacyclica (a struttura ursanica o oleanica). Alcune resine appartenenti a questa classe sono mastice e dammar.

¹⁹ L'avverbio "raramente" rappresenta il fatto che possano esserci dei casi in cui i campioni vengono conservati in condizioni molto particolari che non hanno permesso la scomparsa di tali composti.

Esiste un'altra tipologia di classificazione delle resine naturali in base all'origine e alla consistenza (riportata nell'elenco seguente):

- **Oleoresine o balsami:** si tratta di essudati resinosi che sono prodotti in seguito a un'incisione nella corteccia di diverse specie di alberi viventi. Contengono un'elevata quantità di olii essenziali liquidi che donano una consistenza morbida e appiccicosa. Vi è però una differenza di base a livello di composizione tra i due composti: le oleoresine sono costituite esclusivamente da resine e olii essenziali mentre nei balsami sono presenti anche alcoli, esteri e acidi aromatici.
- **Resine:** essudati resinosi di alberi viventi, hanno una consistenza solida più o meno dura. Fanno parte di questa classe la resina mastice, dammar, colofonia, sandracca, benzoino e sangue di drago.
- **Resine fossili:** materiali resinosi di origine fossile, degli essudati di alberi non viventi che quindi sono piuttosto duri. Vengono chiamate anche copali.
- **Resine animali:** in realtà sarebbe meglio usare il singolare perché ne esiste una sola e prende il nome di gommalacca o shellac [37, 38, 39].

2.2.4 Olii e grassi

Gli olii e i grassi fanno parte della normale dieta degli esseri umani e in antichità erano usati come illuminanti, come base di profumi e in unguenti per creare medicinali e prodotti cosmetici; si ritrovano anche in unguenti usati per pratiche rituali o di sepoltura. Non è quindi difficile ipotizzare che questi materiali possano essere identificati all'interno di campioni provenienti da un contesto archeologico [32]. Appartengono entrambi alla classe dei lipidi, ma la differenza risiede nello stato in cui si trovano generalmente a temperatura ambiente: gli olii, infatti, si trovano allo stato liquido, mentre i grassi in quello solido.

Per quanto riguarda la struttura chimica sono formati da trigliceridi, ovvero esteri del glicerolo e tre molecole di acidi grassi a catena lineare lunga.

Tabella 4: Caratteristiche di olii e grassi

Solubilità	Insolubili in acqua Solubili in solventi organici aprotici non polare (ex. Acetone, cloruro di metilene e etere dietilico)
Proprietà	Filmogene

In ambito artistico è necessario menzionare in particolare la categoria degli olii siccativi che in tempi più recenti è stata studiata con successo anche dal punto di vista della polimerizzazione. Inoltre, erano impiegati anche come combustibili per lampade.

Le proprietà fisiche dei trigliceridi sono determinate dal tipo di proporzione degli acidi grassi che si legano alla composizione triglicerica di base.

Gli acidi grassi sono catene carboniose più o meno lunghe che presentano un gruppo carbossilico. Si possono dividere in acidi grassi saturi e insaturi. Quelli saturi non presentano doppi legami nella catena carboniosa, mentre quelli insaturi presentano doppi legami e si suddividono in monoinsaturi e polinsaturi. I doppi legami si trovano sempre in conformazione *cis*, solo se invecchiati possono trovarsi anche nella configurazione *trans* [30,31].

Bibliografia

- [1] Intervista a Padre Tauro, il frate carmelitano che ci ha accompagnato nella visita all'antica spezieria della scala svolta in data 30.11.2018.
- [2] M. L. Vázquez de Ágredos Pascual et al., *Tradition and renovation in the ancient drugs of the Spezieria di Santa Maria Della Scala between scientific knowledge and magical thought*, European Journal of Science and Theology, 2018, vol. 14 (2), pp. 3-12.
- [3] { <https://smariadellascala.it/speziera-antica> } (10.12.2018)
- [4] H. Coenen, AW. Sertüner, *On the year of morphine discovery in Paderborn by Sertürner*, Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges, 1954, vol. 287 (4), pp. 165-80.
- [5] Cassio Dione (a cura di Alessandro Stroppa), *Storia romana*, Milano, Rizzoli editore, 1995.
- [6] G. Devoto e G. C. Oli, *Dizionario della lingua italiana, voce: farmaco*, Le Monnier, 2006.
- [7] A. Jori, *Medicina e medici nell'antica Grecia. Saggio sul "Peri téchnes" ippocratico*, Bologna-Napoli, il Mulino editore, 1996.
- [8] G. Galeazzi, *Farmacopea ad uso dei poveri*, Milano, 1794.
- [9] J. De Maleissye, *Storia dei veleni. Da Socrate ai giorni nostri*, Bologna, Odoya editore, 2008.
- [10] V. Boudon-Millot (traduzione a cura di M. L. Garofalo), *Galeno di Pergamo. Un medico greco a Roma*, Carrocci editore, 2016.
- [11] O. Lizzini, *Avicenna*, Roma, Carocci editore, 2012.
- [12] P. Meier (a cura di), *Paracelso, medico e profeta*, Roma, Salerno Editrice, 2000.
- [13] { <https://www.pigierre.com/project/antica-speziera-di-santa-maria-della-scala> } (10.12.2018)
- [14] { <https://www.romafelix.it/speziera-di-santa-maria-della-scala/> } (10.12.2018)
- [15] T. J. Meine et al., *Association of intravenous morphine use and outcomes in acute coronary syndromes: results from the Crusade Quality Improvement Initiative*, Am. Heart J., 2005, vol. 149 (6), pp. 1043–9.
- [16] D. Taylor, *The Pharmaceutical Industry e Future of Drug Development*, Pharmaceuticals in the Environment , 2015, pp. 1-33.
- [17] F. Jamshidi-Kia, Z. Lorigooini, H. Amini-Khoei, *Medicinal plants: past history and future perspective*, J Herbmec Pharmacol. 2018, vol. 7(1), pp.1-7.

- [18] E. Ribechini et al., *Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials*, Anal Bioanal Chem., 2011, Vol 401, pp. 1727–1738.
- [19] Dr. E. Riva, *Camphor a very rare perfume*, History and Science, 2001.
- [20] M. C. Gamberini et al., *Spectral analysis of pharmaceutical formulations prepared according to ancient recipes in comparison with old museum remains*, Anal. Bioanal. Chem., 2011, vol. 401, pp. 1839–1846.
- [21] M. Mackonochie e M. Heinrich, *Materia medica chests: Investigating the 19th century use of botanicals by different medical professions*, Journal of Herbal Medicine, Available online 6 January 2019.
- [22] J. Pérez-Arantegui et al., *Colorants and oils in Roman make-ups—an eye witness account*, Trends in Analytical Chemistry, 2009, Vol. 28 (8).
- [23] I. Tapsoba et al., *Finding Out Egyptian Gods' Secret Using Analytical Chemistry: Biomedical Properties of Egyptian Black Makeup Revealed by Amperometry at Single Cells*, Anal. Chem., 2010, vil. 82, pp. 457–460.
- [24] M. Cotte et al., *New insight on ancient cosmetic preparation by synchrotron-based infrared microscopy*, Analytica Chimica Acta, 2005, vol. 553, pp.105–110.
- [25] M.C. Gamberini et al., *MicroRaman and infrared spectroscopic characterization of ancient cosmetics*, Vibrational Spectroscopy, 2008, vol. 47, pp. 82–90.
- [26] M. P. Colombini et al., *Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt)*, Microchemical Journal, 2005, vol. 79, pp. 83– 90.
- [27] F. Mizzoni et al., *Study of the organic residue from a 2600-year old Etruscan plumpekanne*, Spectrochimica Acta Part A, 2007, vol. 68, pp. 377–381.
- [28] M.L Vázquez de Ágredos Pascual et al., *Science, art and mythological greco-roman beliefs in the ancient pharmacy of santa maria della scala, rome*, 9th European symposium on religious art, restoration & conservation, Proceedings book, 2017, pp.116-120.
- [29] G. Cavallo e M.L. Vazquez, *X-ray powder diffraction of mineral pigments and medicines from the 17th century pharmacy (Spezieria) Santa Maria della Scala in Rome, Italy*, Powder Diffr., 2018, pp. 1-9.
- [30] Brown et al, *Chimica organica*, EdiSes, 2010.
- [31] R. Beninatto and O. De Lucchi, *Chimica Organica per Artisti e Restauratori: Sostanze Naturali*. 2016.
- [32] J. S. Mills and R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworth-Heinemann, 2003Loudon, chimica organica, Napoli EdiSes editore 2010.
- [33] Loudon, *Chimica organica*, Napoli EdiSes editore 2010.

- [34] M. Hovaneissian et al. (2006), *Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin*, C. R. Chimie 2006, vol.9, pp. 1192–1202.
- [35] A.Casoli, M.P. Colombini, M. Matteini et al. *Chimica per l'arte. La chimica dei materiali pittorici*. Zanichelli, 2014.
- [36] Andreotti A., Bonaduce I., Colombini M.P., Gautier I., Modugno F., Ribechini E., *Combined GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipid, Waxy, Resinous and Proteinaceous Materials in a Unique Paint Microsample*. Anal. Chem. 2006, 78, pp. 4490-4500.
- [37] M. Matteini, A. Moles. *La chimica nel restauro. I materiali dell'arte pittorica*. Nardini editore, 1989.
- [38] Osete-Cortina L. and Domenech-Carbò M. T., *Analytical characterization of diterpenoid resins present in pictorial varnishes using pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry with on line trimethylsilylation*, Journal of Chromatography A 2005, vol. 1065, pp. 265–278.
- [39] Russo M. V. and Avino P., *Natural products such as adhesives in oil paintings*, Natural Product Research, 2016.

Capitolo 2 Materiali e Metodi

Come già evidenziato in precedenza il progetto di Santa Maria della Scala è un progetto ampio ed interdisciplinare volto non solo alla caratterizzazione degli antichi medicinali, ma anche alla musealizzazione dell'antica spezieria.

I campioni prelevati dai contenitori provenienti dall'originaria sala di vendita dall'antica spezieria di Santa Maria della Scala sono 232, 48 sono quelli che non ci sono pervenuti quindi il set finale conta 184 campioni.

Come riportato del capitolo precedente gli studi eseguiti nel 2017 hanno portato a una prima suddivisione dei campioni in sette categorie: formulazioni complesse, composti mercuriali, composti antimoniali, composti ferrosi, composti organici, sali e gemme [1, 2]. Disponendo inoltre della maggior parte degli spettri IR (registrati presso il LAMS a Parigi) è stato possibile iniziarne l'interpretazione e nel frattempo anche cominciare la campagna di registrazione degli spettri dei farmaci che mancavano all'appello (sia appartenenti al gruppo dei composti inorganici sia di quelli organici). Questi ulteriori dati hanno permesso di inserire all'interno dei vari gruppi altri campioni: per quanto concerne quello dei composti organici il numero totale dei campioni è pari a 39.

2.1 Campioni

Nella seguente tabella è riportata la lista dei campioni oggetto dello studio.

Tabella 1: Lista dei campioni

Gruppo 5	Composti organici	LS5 Tint. di Cascarilla, LS101 Cascaril, LS7 Estratto di Coca, LS23 Albumina, LS26 Bezoar, LS27 Diapenthe, LS37 Gumin. Kui?, LS39 Resin Mechioar, LS48 Mirabol Citrin, LS56 Gran Paradis, LS59 Lans. Fel. Rubr., LS63 Diagrid, LS67 Croc. Mart. Ap., LS81 Benzoin, LS88 Gumm. Gut, LS92 Mechoacan, LS103 Magist Mart, LS111 Gumm. Dragant, LS112 Santonico, LS115 Lig. Aloe, LS119 Res Guajac, LS130 Gum Lacc, LS139 Sen synap alb, LS141 Paolinia, LS142 Babam odintalg, LS143 Viper Pulv., LS 164 Lig. Aspal, LS171 Sarcocoll, LS174 Balsam S.Ton, LS198 Fung Malit, LS192 Anis Stelat, LS193 Guaiaco Resin, LS201 Oss. Cord. Cerv., LS223 Ladon, LS225 (senza nome), LS227 Carb amm.pyro oleos, LS230 (nome illeggibile), LS232 Resin Scamon.
----------	-------------------	--

Le frazioni organiche sono chiamate anche biomateriali e si tratta prevalentemente di lipidi, proteine, resine vegetali, polisaccaridi, coloranti organici e di una varietà di estratti vegetali che fin dall'antichità sono stati i componenti principali di cosmetici e prodotti farmaceutici.

2.2 Tecniche d'indagine utilizzate

Per la caratterizzazione dei composti organici degli antichi medicinali sono state impiegate tecniche d'indagine morfologica (MO) e molecolare (spettroscopia FT-IR). Per uno studio più approfondito, le diverse sottoclassi sono state studiate attraverso tecniche cromatografiche e di risonanza magnetica.

La collezione di antichi medicinali conservati all'interno della Spezieria di Santa Maria della Scala non è mai stata l'oggetto di studio di altri progetti di ricerca, se non di quello ampio ed interdisciplinare diretto dalla Professoressa María Luisa Vázquez de Ágredos Pascual, di cui questo lavoro di tesi fa parte. Come già riportato nel capitolo 1 altri gruppi di ricerca hanno partecipato e continuano a lavorare a questo progetto. A questo proposito è necessario sottolineare che alcuni spettri IR utilizzati per l'indagine sono stati registrati presso il LAMS (Sorbonne Université, Parigi), ma che i dati ottenuti da questo tipo di analisi ma anche dal resto delle tecniche impiegate sono frutto del mio lavoro e sono inediti.

2.2.1 Microscopia Ottica

La microscopia ottica è una tecnica molto utile per eseguire un'analisi preliminare per studiare la morfologia del campione e verificarne l'omogeneità. Si possono dedurre diverse informazioni come la natura amorfa o meno del materiale, la forma e la granulometria del campione oppure la sua stratigrafia [3].

Per lo studio dei campioni è stato utilizzato uno stereo microscopio Leica EZ4 HD con uno zoom 4,4:1 e 7 LED che permettono tre tipi di illuminazione incidente, obliqua e trasmessa. La fotocamera digitale ad alta definizione è integrata. Grazie al software Leica LAS EZ è possibile acquisire le immagini direttamente sul computer. Questa indagine è stata svolta presso il Laboratorio de analisis y diagnostico de obras de arte dell'Universidad de Valencia.

È stato utilizzato anche il microscopio ottico ECLIPSE E200LED MV Series, Nikon Corporation, (Tokyo, Giappone) con illuminazione a campo chiaro e un obiettivo 10x, che può essere utilizzato anche come microscopio a epi-fluorescenza. Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato il software Nis Elements 4.20.02 (Nikon Corporation). Questa indagine è stata condotta presso il Departamento de Química Analítica dell'Universidad de Valencia.

2.2.1.1 Microscopia ottica a epi-fluorescenza

Nella microscopia ad epi-fluorescenza il campione viene irraggiato da una sorgente a raggi ultravioletti e, una volta eccitato, emette fluorescenza e genera quello che viene definito un fascio di emissione, che viene rivelata dallo stesso obiettivo da cui è passato quello di eccitazione. La componente di eccitazione viene separata da quella emessa attraverso un filtro posizionato tra obiettivo e rivelatore [4].

La tecnica della microscopia a fluorescenza è diventata uno strumento essenziale nella biologia e nelle scienze biomediche, così come nella scienza dei materiali perché in grado di rivelare la presenza di molecole con una fluorescenza caratteristica. Stokes per primo nel IX secolo notò la fluorescenza rossa della fluorite se irraggiata da un fascio di luce UV. Negli anni successivi si scoprì che molti materiali come minerali, cristalli, resine, droghe grezze, burro, clorofilla, vitamine e composti inorganici erano fluorescenti se irradiati con quel tipo di lunghezze d'onda [5].

Il microscopio ECLIPSE E200LED MV Series, Nikon Corporation, (Tokyo, Giappone) è equipaggiato di filtri a densità neutra (ND), tutti di colore grigio, che servono a ridurre l'intensità della luce (la luminosità) in maniera uniforme senza alterare il bilanciamento cromatico. Il microscopio ha in dotazione i filtri ND4, ND8 e ND16 che riducono la luminosità rispettivamente di 1/4, 1/8 e 1/16 possono essere utilizzati anche in combinata per ridurre la luminosità fino a 1/512 [5]. Oltre a questi filtri sono presenti anche i filtri blocco che sono composti da tre componenti ottiche: un filtro di eccitazione (filtro EX), uno specchio dicroico (DM) e un filtro barriera (BA).

I filtri blocco utilizzati sono:

B-2A²⁰ : Excitation Filter Wavelengths (EX): 450-490 nm (bandpass, 470 CWL), regione spettrale della lunghezza d'onda di eccitazione: BLU.

Dichromatic Mirror Cut-on Wavelength (DM): 500 nm (longpass, LP)

Barrier Filter Wavelengths (BA): 515 nanometer cut-on (longpass, LP)

Nelle immagini raccolte usando questa combinazione di filtri è spesso visibile l'emissione di fluorescenza nelle regioni del giallo, arancione e rosso.

²⁰ La prima lettera nel codice di designazione del filtro alfanumerico proprietario Nikon indica la regione spettrale di eccitazione della lunghezza d'onda (ad esempio, UV, V, B e G, che sono semplici abbreviazioni rispettivamente per ultravioletto, viola, blu e verde). Il numero che segue il codice di eccitazione si riferisce alla larghezza del passabanda del filtro di eccitazione: ex. 1 per l'eccitazione a banda stretta, 2 per l'eccitazione a banda media e larga e 3 per l'eccitazione a banda molto ampia. Infine, una o più lettere che seguono il numero di dimensioni del passa-banda di eccitazione identificano le caratteristiche del filtro di barriera. La lettera di codice A indica un filtro barriera passa-lunghezza standard con la lunghezza d'onda di taglio più bassa [Manuale di istruzioni accessori epi-fluorescenza Nikon].

G-2A: Excitation Filter Wavelengths (EX): 510-560 nanometers (bandpass, 535 CWL), regione spettrale della lunghezza d'onda di eccitazione: Verde.

Dichromatic Mirror Cut-on Wavelength (DM): 565 nanometers (longpass, LP)

Barrier Filter Wavelengths (BA): 590 nanometer cut-on (longpass, LP)

UV-2A: Excitation Filter Wavelengths (EX): 330-380 nanometers (bandpass, 355 CWL), regione spettrale della lunghezza d'onda di eccitazione: ultravioletto.

Dichromatic Mirror Cut-on Wavelength (DM): 400 nanometers (longpass, LP)

Barrier Filter Wavelengths (BA): 420 nanometer cut-on (longpass, LP), consentendo la visualizzazione di emissione rossa, verde e blu da fluorofori eccitati nell'ultravioletto [7].

2.2.2 Spettroscopia infrarossa in riflessione totale attenuata (FTIR-ATR)

La spettroscopia infrarossa è una tecnica analitica che si basa sull'interazione tra un'onda elettromagnetica e la materia. La radiazione infrarossa, di frequenza compresa tra i 4000 e i 400 cm^{-1} è racchiusa nella regione dello spettro elettromagnetico tra il visibile e le microonde e fornisce energia sufficiente a provocare transazioni roto-vibrazionali tra gli atomi della molecola che la assorbe [8]. La risposta ottenuta mediante l'analisi infrarossa è un grafico, comunemente chiamato spettro infrarosso, che riporta in ascissa il numero d'onda (espresso in cm^{-1}) e in ordinata può presentare Trasmittanza ($T = I/I_0$) o Assorbanza ($A = \log 1/T$) [9]. I segnali registrati dipendono fortemente dalla struttura della molecola in esame, e forniscono per ogni sostanza (o gruppo di sostanze) uno spettro caratteristico. I vari gruppi funzionali, infatti, generano dei picchi precisi a specifiche lunghezze d'onda ben note, rendendo possibile, grazie a questa loro peculiare riproducibilità, il riconoscimento della struttura molecolare sottoposta all'analisi [10].

Nello spettro infrarosso si può inoltre individuare una regione, conosciuta come *fingerprint region*, in cui ogni molecola presenta dei segnali strettamente interconnessi con la sua struttura totale. Difficili da interpretare singolarmente, essi forniscono la cosiddetta "impronta digitale" della molecola e costituiscono un valido aiuto per l'identificazione. L'interpretazione spettrale è dunque facilitata da questi indicatori ma non è così immediata e del tutto risolutiva soprattutto quando si utilizza questa tecnica nell'ambito dei beni culturali. Molto spesso, infatti, si lavora con materiali costituiti da miscele di più sostanze e che hanno subito modificazioni dovute all'invecchiamento. La combinazione dei vari moti vibrazionali può

tradursi in una sovrapposizione dei segnali registrati aumentando notevolmente la difficoltà interpretativa dei dati ottenuti.

La spettrometria FTIR - ATR sfrutta il principio fisico della riflessione interna totale: il campione tal quale viene irraggiato più volte dal fascio luminoso generato dal passaggio del laser infrarosso attraverso un cristallo con elevato indice di rifrazione [8]. Il campione non viene attraversato completamente, ma solo per 0.5-2 μm . Nelle regioni dello spettro infrarosso in cui il campione assorbe energia si ha attenuazione dell'onda evanescente che poi esce dalla parte opposta del cristallo dove viene rilevata dal detector posto nello spettrometro IR.

È opportuno considerare l'effetto matrice che si verifica nel caso di molecole complesse, e a maggior ragione nel caso di miscele, è difficile associare ciascuna banda di assorbimento [11]. Infatti, quando sono presenti simultaneamente sostanze organiche e inorganiche, queste ultime possono coprire parzialmente alcuni picchi di sostanze organiche rendendo così lo spettro di difficile interpretazione.

Un altro limite della tecnica consiste nel fatto che essa non riesce a rilevare composti i cui segnali cadono al di fuori del range di misura del MIR, ossia al di sotto dei 400 cm^{-1} (ex. pigmenti neri vegetali, metalli e leghe, ossido di Pb, solfuri, cloruri e alogenuri anidri).

La spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR) permette di ottenere informazioni qualitative e semi-quantitative su composti organici ed inorganici, infatti è una tecnica particolarmente adatta alla caratterizzazione di resti inorganici e/o organici ed è fondamentale per fornire ipotesi iniziali sulle sostanze presenti [12], rivela legami intermolecolari e la presenza di gruppi funzionali specifici, per questo si tratta di una metodologia rapida per evidenziare l'impronta digitale caratteristica di diverse classi di prodotti e per distinguerli l'uno dall'altro in base all'assorbimento [13].

La pubblicazione redatta da Colombini et al. (2005), per esempio, sottolinea come la spettroscopia FT-IR sia stata utilizzata per caratterizzare i residui organici di materiali contenuti nei recipienti ceramici egiziani appartenenti alla collezione archeologica dell'Istituto Papirologico Vitelli (Firenze); questa tecnica si è dimostrata utile per rilevare i gruppi funzionali delle sostanze organiche e quindi per distinguerli²¹ [12].

La spettroscopia a infrarossi è una tecnica che, fornendo informazioni riguardanti le impronte digitali e gli spettri vibrazionali di materiali sconosciuti, richiede un confronto con gli standard. Nel caso di studi presentato da Mizzoni et al. (2007) riguardante le analisi sul residuo organico rinvenuto in un antico *plumpekanne* etrusco, sono state caratterizzate

²¹ L'analisi non si è fermata a questo primo step conoscitivo ma sono state studiate più approfonditamente le frazioni organiche eseguito servendosi della GC-MS.

spettroscopicamente alcune resine terpeniche (colofonia, sandracca, mastice e incenso) menzionate in fonti classiche (*Naturalis Historia* e *Inquiry into Plants*). Per caratterizzarle si è cercato di eseguire le misure nelle stesse condizioni sperimentali e di studiare esemplari moderni e invecchiati dello stesso materiale per creare degli standard di riferimento.

In tal caso ad esempio, è stata condotta in situ un'indagine spettroscopica preliminare utilizzando un microscopio a raggi infrarossi a trasformata di Fourier (FTIR) (IRScopell, Bruker) nell'intervallo $4000-600\text{ cm}^{-1}$, con una risoluzione di 1 cm^{-1} , accumulando almeno 200 scansioni. Per completare l'indagine spettroscopica, diversi microcampioni (circa 0,001 mg) sono stati polverizzati e dispersi in eccesso di KBr e studiati in riflettanza diffusa (DR) utilizzando uno strumento Equinox 55 (Bruker) nel range $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con 1 cm^{-1} di risoluzione con 200 scansioni o più [14].

La spettroscopia FT-IR attenuata di riflettanza totale (ATR) ha il vantaggio di non richiedere alcuna preparazione per il campione. E' stata utilizzata con successo per comprendere la formazione di saponi di piombo nei cosmetici antichi e per seguire la trasformazione dei lipidi durante la preparazione di formulazioni farmaceutiche [15] o dei lipidi che sono contenuti nella sostanza grassa trovata all'interno di vasi in ceramica del XVI secolo [16]. Le analisi condotte utilizzando questa tecnica analitica hanno permesso di identificare la natura inorganica delle inclusioni che si trovano nei campioni di adesivi provenienti da Antinoopolis [17]. Sulla base degli spettri FT-IR (e micro-Raman) è stato possibile caratterizzare anche i materiali impiegati nella preparazione di antiche polveri cosmetiche (alcuni materiali cosmetici specifici e alcuni leganti come la cera) trovate all'interno di un unguentario pompeiano situati nel deposito di "Casa Bacco". La matrice di queste polveri è una miscela complessa in cui si trovano diversi materiali inorganici e organici, alcune volte degradati, ma l'utilizzo di tecniche complementari quali FT-IR e micro-Raman permette di semplificare il lavoro e di ottenere molte informazioni [18].

I risultati FT-IR hanno anche portato alla ricostruzione dei leganti originari dalle bande che derivano dai prodotti di degradazione, hanno condotto inoltre alla determinazione dei pigmenti che sono stati preparati come prodotti cosmetici o per inchiostri o vernici [15].

Come già spiegato in precedenza, le analisi FT-IR sono state svolte in gran parte presso il LAMS, Sorbonne Université a Parigi, di cui ci sono stati forniti gli spettri già registrati. La parte rimanente è stata indagata in modalità FTIR-ATR presso l'Universidad de Valencia (Departamento de Química Analítica) utilizzando lo strumento Agilent Technologies Cary 630 FTIR con accessori per la riflessione totale attenuata con cristallo in seleniuro di zinco (Waldbronn, Germany). Gli spettri in assorbanza sono stati registrati da $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$ con una risoluzione di 4 cm^{-1} . Per la raccolta dei dati è stato utilizzato il software MicroLab FTIR di Agilent Technologies successivamente elaborati con Microsoft Excel.

2.2.3 Spettrofotometria in riflettanza diffusa

La spettrofotometria in riflettanza diffusa è una tecnica non invasiva comunemente usata per indagare preliminarmente i materiali costitutivi superficiali delle opere d'arte.

La spettroscopia di riflettanza visibile si basa sul principio dell'assorbimento selettivo della luce: il comportamento spettrale di una superficie verniciata a una sorgente che emette il range di lunghezze d'onda visibili può fornire informazioni sulla sua composizione. I risultati di questa analisi sono spettri di riflettanza in cui viene registrata sia la luce riflessa che quella diffusa: mentre l'assorbimento della luce è un fenomeno relativamente semplice, la dispersione della luce, che si incontra anche con i pigmenti, è più complessa. Ad esempio, dipende dalla differenza tra l'indice di rifrazione del pigmento e il mezzo di sospensione e la dimensione delle particelle rispetto alla lunghezza d'onda della luce incidente [19].

La luce riflessa dalla superficie del campione e la luce diffusa sono suddivise in ciascun componente di lunghezza d'onda rispettivamente dal sistema ottico di misurazione e dal sensore ottico di monitoraggio dell'illuminazione, e i segnali proporzionali all'intensità luminosa di ciascun componente vengono emessi nel circuito di elaborazione analogico [20]. La spettroscopia in riflettanza diffusa è un tipo di riflettanza superficiale il cui angolo di riflessione è indipendente dall'angolo della radiazione incidente. Questa tecnica viene spesso osservata con radiazioni che si verificano su una superficie opaca, come carta, tessuti, mentre la riflettanza speculare viene osservata con la radiazione incidente su una superficie lucida come uno specchio.

Per questo tipo di indagine ci si è serviti dello strumento Agilent Technologies Carry 630 con accessori Fiber Optic Reflectance Spectrofotometry (FORS).

Gli spettri dell'assorbanza dei campioni sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis Cary 60 dotato di una sonda a riflessione diffusa di Harrick Scientific Products (Pleasantville, NY). La sonda di riflessione diffusa ha una videocamera integrale per selezionare il punto di campionamento da analizzare fornendo un'immagine visiva. Gli spettri sono stati registrati da 200 a 800 nm. Per la raccolta e l'elaborazione dei dati è stato utilizzato il software CaryWinUV di Agilent Technologies.

2.2.4 Cromatografia liquida (IT-SPME-CapLC-DAD)

La cromatografia liquida accoppiata con rivelatore di array di fotodiodi UV-Vis consente di separare i singoli composti presenti in una miscela in base al loro equilibrio di affinità con una fase stazionaria ed una fase mobile liquida. È una tecnica che può fornire risultati qualitativi ma anche quantitativi se usata per analisi ripetitive; ha la capacità di separare composti organici che non possono essere volatilizzati e che sono termolabili come carboidrati, amminoacidi, proteine, fitofarmaci, anabolizzanti e tossine [9].

La Microestrazione in Fase Solida (SPME) è una metodologia messa appunto nei primi anni '90 in Canada che permette di compiere in breve tempo l'estrazione (e una preconcentrazione) seguita dal desorbimento di composti presenti anche in tracce in matrici liquide in soluzioni omogenee ma anche eterogenee senza richiedere l'uso di solventi. Questo metodo può essere accoppiato sia con l'HPLC (diventando SPME in-tube, come nel nostro caso) che con la GC (diventando open tubular trapping). La metodologia SPME viene ampiamente utilizzata per analisi ambientali, biologici, alimentari, cliniche e per analisi di droghe [21].

Nella tecnica In-tube SPME gli analiti sono estratti e preconcentrati sulla superficie interna della colonna capillare. L'estrazione può essere effettuata fino all'equilibrio o fino a quando l'estrazione è sufficiente. Gli analiti perciò possono essere trasferiti direttamente al sistema LC, quindi l'estrazione, la preconcentrazione, l'iniezione, la separazione e il rilevamento sono eseguiti in un'unica fase. Questa procedura di estrazione non solo riduce il tempo di analisi, ma migliora anche la precisione e l'accuratezza della procedura rispetto alle tecniche di estrazione manuale [21]. Vengono combinate insieme la miniaturizzazione, l'automazione e la riduzione del consumo di solvente rendendo così la procedura di estrazione "più sostenibile".

La combinazione di della IT-SPME con capLC-DAD trova largo impiego in analisi in campo medico, chimico, ambientale, alimentare, industriale e nelle scienze dei materiali [22]. Questa sembra essere la prima volta che viene utilizzata per indagare medicinali vegetali antichi provenienti da una spezieria europea.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata con rivelatore UV-visibile o con diode array (DAD) o alla spettrometria di massa (HPLC-MS) è stata utilizzata principalmente per l'identificazione di coloranti organici in tessuti e dipinti, lipidi in ceramica e opere d'arte archeologiche e proteine in ceramica e dipinti. Queste tecniche sono state utilizzate solo raramente per lo studio di cosmetici antichi o preparati farmaceutici [15] e il fatto che il progetto di Santa Maria della Scala racchiuda una parte dedicata a questa

tecnica è sintomo di una forte volontà di ricerca “innovativa” a livello di applicazione di una tecnica già consolidata nel tempo per applicazioni differenti.

Wen et al. (2005) hanno messo a punto un metodo per separare e quantificare tredici acidi fenolici quali acido cinnamico, presenti all'interno di composti medicinali erbacei usati nella medicina tradizionale cinese servendosi della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). La separazione e la determinazione dei componenti attivi nei farmaci grezzi e le loro preparazioni mediche sono molto difficili a causa della complessità dei prodotti naturali. Il gruppo di ricerca ha adottato tre diversi criteri per identificare l'attribuzione dei picchi: tempo di ritenzione, spettro di assorbimento ultravioletto e osservazione di un aumento dell'area di picco dopo l'aggiunta del corrispondente standard fenolico (fortificazione) [23]. Gli stessi sono stati utilizzati per la presente indagine.

Il lavoro redatto da Javanmardi et al. (2002) tratta l'analisi dei composti fenolici contenuti nel basilico della specie *Ocimum*, utilizzato nella medicina tradizionale iraniana come erba culinaria e come fonte ben nota di principi aromatici. Gli acidi fenolici in ciascun campione sono stati identificati utilizzando il tempo di ritenzione e sono stati ulteriormente quantificati confrontando l'area di picco delle serie standard [24].

Le indagini di laboratorio sono state eseguite per mezzo di una cromatografia liquida capillare (CapLC) costituita da una pompa capillare LC (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germania), una valvola a sei vie ad alta pressione (7725 Reodyne, Rohnert Park, CA, USA) contenente il capillare IT-SPME, un degasatore in linea e un rivelatore di array di fotodiodi UV-Vis, DAD (Agilent, 1260 Series) dotato di una cella di flusso 80-nL. Il rivelatore è collegato al programma HPLC ChemStation (Agilent) per l'acquisizione e il calcolo dei dati.

Il segnale analitico è stato registrato tra 190 e 700 nm e i cromatogrammi sono stati monitorati a 230 nm. Per la separazione cromatografica è stata impiegata una colonna analitica capillare Zorbax SB- C18 (150 mm x 0,5 mm, 5 µm di diametro delle particelle) (Agilent, Waldbronn, Germania).

Il rivelatore è stato accoppiato a un sistema per l'acquisizione e il trattamento dei dati Agilent, HPLC ChemStation.

L'eluizione è stata eseguita in modalità isocratica, la fase mobile è una miscela composta da AcN e H₂O 20:80 v / v%. La velocità di flusso della fase mobile era di 10 µL min⁻¹ e il volume di iniezione pari a 20µL. Il solvente AcN è stato filtrato prima dell'uso attraverso membrane di nylon da 0,45 µm (Teknokroma, Barcellona, Spagna).

Il metodo utilizzato in questo lavoro corrisponde a quello sviluppato per la microestrazione in fase solida in valvola in tubo (IT-SPME) [21]. L'anello di iniezione in acciaio inossidabile di una valvola di iniezione a sei porte è stato sostituito da un capillare estrattivo (40 cm, 0,32 mm e 3 µm di spessore di fase) di TRB-35 (Teknokroma, Barcellona, Spagna).

Tutte le soluzioni sono state filtrate con membrane di nylon da 0,45 µm (Teknokroma, Barcellona, Spagna) prima dell'uso.

Tutti i reagenti erano di grado analitico. Il grado di HPLC in acetonitrile (ACN) è stato fornito da Prolabo (Fontenay-sous-Bois, Francia).

Sono state preparate soluzioni standard di (2000 µg / mL) sciogliendo la quantità adeguata di analita in acetonitrile o in acqua. Le soluzioni di lavoro sono state preparate diluendo la soluzione madre con acqua.

L'acqua ultrapura è stata ottenuta da un sistema Nanopure II (Sybron, Barnstead, Regno Unito). Tutte le soluzioni sono state conservate al buio a 4 ° C.

PREPARATIVA

Tutti i campioni sono stati trattati con lo stesso metodo per poi essere sottoposti all'analisi IT-SPME-CapLC-DAD: pesare il campione e aggiungere H₂O in un rapporto 1: 1, ad es. se sono stati pesati 0,73 mg di campione in polvere, devono essere aggiunti 700 µL di H₂O. Per estrarre la frazione organica più polare è stata selezionata l'acqua come solvente. La dispersione è stata centrifugata con Vortex per 1 minuto e dopo è stata filtrata siringa sterile e un ago per evitare la formazione di un impaccamento. È stato impiegato un mixer vortex ZX3 (40 Hz) di VELP Scientifica (Usmate Velate, Italia).

2.2.5 Gas Cromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC-MS)

La tecnica GC-MS è una tecnica analitica cromatografica gassosa che viene accoppiata ad una spettrometria di massa per separare e determinare qualitativamente e quantitativamente matrici complesse fornendo risultati in breve tempo e con consumo di pochi microgrammi di campione [9].

Il campione viene iniettato in una colonna capillare inserita in una camera termostata e percorsa da un flusso di gas inerte (di solito elio), le molecole che compongono il campione escono separate in base all'affinità con la fase stazionaria: i composti costituenti la miscela impiegheranno tempi diversi per percorrere la colonna. Variando in modo controllato la pressione del gas di trasporto o la temperatura è possibile migliorare la separazione delle

diverse sostanze. Per modificare la polarità dei composti da analizzare, aumentarne la volatilità e facilitarne l'identificazione ci si può avvalere di diverse tecniche di derivatizzazione [9].

Le molecole eluite vengono inviate allo spettrometro di massa dove vengono frammentate e ionizzate (tramite bombardamento elettronico), vengono infine analizzate in base al loro rapporto m/z , generando così uno spettro di massa.

La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa è una tecnica molto valida per analizzare la maggior parte delle sostanze organiche. Un limite di questa tecnica consiste nella difficoltà nell'analizzare composti polari o ad elevato peso molecolare perché vengono resi volatili con difficoltà²².

Il risultato finale dell'analisi è un cromatogramma (abbondanza vs. tempo di ritenzione) a cui sono associati gli spettri di massa relativi ad ogni picco cromatografico. Gli spettri di massa sono dei grafici a righe in cui in ascissa sono riportati i rapporti massa/carica (m/z) e in ordinata è espressa l'abbondanza. Per ogni sostanza rappresentata da un picco cromatografico è associato uno spettro con più di un segnale: questo perché la formazione di uno ione molecolare è seguita da un riarrangiamento interno che porta alla formazione di ulteriori specie molecolari più stabili. La formazione di questi frammenti molecolari è molto importante per ottenere informazioni strutturali anche di molecole molto complesse.

Nell'analisi spettrometrica di massa in modalità *full scan* viene fatta una determinazione ad intervalli di tempo uguali per ogni rapporto m/z e l'intensità dei segnali relativi ad ogni massa è più attenuata. Questo tipo di analisi è utile quando il campione da analizzare è incognito e si vogliono ottenere informazioni di massima sulla composizione del campione [9].

Dall'analisi GC-MS è possibile identificare le frazioni organiche risolvendo la composizione molecolare dei materiali organici e dei loro prodotti di degradazione, monitorandone l'entità dovuta, ad esempio, ai processi di ossidazione o all'idrolisi.

La GC-MS e la gascromatografia ad alta temperatura accoppiata con spettrometria di massa (HTGC-MS) sono state utilizzate con successo per oltre due decenni per la caratterizzazione di residui organici archeologici contenenti glicerolipidi, cere naturali e resine terpeniche.

²² Questo limite può essere superato grazie all'ausilio della pirolisi analitica che permette di ottenere frammenti più volatili dei composti originali tramite riscaldamento dei campioni ad elevate temperature (500-800°C) e in atmosfera inerte. Mantenendo fisse le condizioni sperimentali (tipo di pirolizzatore, temperatura e durata di pirolisi, velocità di riscaldamento e temperatura dell'interfaccia) è possibile ottenere una discreta riproducibilità del processo di frammentazione. I composti così frammentati vengono poi inviati alla colonna gas-cromatografica e da lì allo spettrometro di massa.

Il pre-trattamento del campione solitamente viene eseguito estraendo o solubilizzando gli analiti di interesse, decomponendo i composti ad alto peso molecolare (per esempio trigliceridi) in molecole più piccole (acidi grassi e alcoli) mediante scissione di legami esterei; e infine trasformando i composti polari, ad esempio gli acidi grassi, in molecole volatili, eseguendo reazioni di derivatizzazione [15].

Nell'archeologia organica e nella chimica del patrimonio culturale, l'identificazione cromatografica è spesso basata sul rilevamento di biomarcatori. Questi ultimi sono molecole stabili presenti nel materiale originale, si conservano intatti in ambienti archeologici o formati nel corso dei secoli a causa dell'invecchiamento, per questo si definiscono diagnostiche. Hanno uno scheletro di carbonio specifico tale da essere correlati ai loro precursori biologici, consentendo così l'identificazione delle sostanze naturali da cui derivano.

Colombini et al. 2005 hanno adottato una procedura gas cromatografica con un detector spettrometro di massa (GC-MS) che è in grado di caratterizzare simultaneamente resine naturali, cere, bitume, pece e materiali lipidici all'interno di recipienti ceramici egiziani. Non sono stati trovati acidi grassi insaturi in quantità significative, infatti, non sono comuni nei resti archeologici a causa della loro tendenza alla decomposizione che è assolutamente maggiore rispetto a quelli saturi [15].

La presenza di caratteristici biomarker diterpenici ha consentito di valutare l'uso di resina di pino. La presenza simultanea di acido abietanico, retene e metil-deidroabietico, infatti, sottolinea che il materiale contiene una resina ottenuta distillando un pezzo di legno della famiglia delle *Pinaceae* [15].

La presenza di acidi monocarbossilici, acidi dicarbossilici, acidi diidrossilati a catena lunga e di specie terpeniche, invece evidenzia che, sebbene i residui organici mostrassero un'elevata eterogeneità nella composizione, consistevano principalmente in materiali di origine vegetale. In particolare, la presenza di prodotti di ossidazione di acidi grassi insaturi caratteristici suggerisce la presenza di olio prodotto dai semi di piante della famiglia delle *Cruciferae*, alcuni dei quali sembrano essere stati utilizzati nell'antico Egitto per produrre olio [12].

Durante l'indagine riguardante la composizione chimica dei contenuti originali conservati dentro ad un *unguentarium* in alabastro di origine egiziana, rinvenuto in una sepoltura etrusca a Chiusi (Toscana, Italia) e datato 150 / 125-100 a.C., si evince che spesso i campioni sono formati da miscele che si possono trovare in residui archeologici di preparati cosmetici o medicinali. L'approccio analitico utilizzato ha permesso di ottenere informazioni sulla presenza di una miscela di un olio vegetale, probabilmente moringa, e due resine vegetali, mastice e pino [13]. La resina pinacea è stata riconosciuta per la presenza dei composti diterpenoidi caratteristici (deidroabietici e degli acidi 7-oxo-deidroabietici) mentre

l'identificazione della resina mastice è stata condotta grazie alla rilevazione di triterpenoidi caratteristici, ad esempio acidi morali, oleanonici, masticadienonici e iso-masticadienonici.

La presenza in quantità elevata di acido oleico evidenzia un basso grado di ossidazione e fa presupporre che l'ossidazione del materiale organico non sia completata. Questo fenomeno può essere correlato alla chiusura dell'*unguentarium*: probabilmente era talmente ben sigillato che la terra argillosa ha impedito il contatto con l'ossigeno e ha rallentato i processi di ossidazione. Tale ipotesi è rafforzata dalla presenza di acidi mono e diidrossicarbossilici che sono considerati come gli intermedi della reazione di ossidazione che trasforma l'acido oleico in acido azelaico. È chiaro che il grado di ossidazione e il tipo di prodotti di ossidazione dipendono strettamente dalla quantità e dalla natura delle insaturazioni presenti nei materiali originali. Inoltre, i processi naturali di degradazione dei lipidi possono essere accelerati o modificati se il materiale viene esposto a condizioni di ossidazione quali alte temperature o radiazioni UV. Ciò significa che la velocità della reazione di degradazione e la natura dei prodotti di degradazione sono strettamente correlate alla composizione del materiale originale, all'uso del contenitore e alle condizioni di sepoltura [13]. Nel caso della spezieria della scala potrebbe essere interessante determinare se i contenitori in cui sono stati sigillati i campioni hanno impedito il contatto con l'ossigeno come in questo caso di studi.

Beaten et al. hanno messo a punto un metodo per identificare le frazioni lipidiche (acidi grassi liberi, alcoli, aldeidi e alcani, acidi grassi ossigenati, steroidi, monoesteri) contenute in un unguento ritrovato in un vaso in ceramica del XVI secolo [25].

Nel caso di studi condotto da Lucejko et al. (2012) è stata utilizzata la gascromatografia per indagare i materiali per imbalsamare. I risultati hanno confermato la natura e l'origine dei materiali organici che erano stati rivelati previamente tramite l'interpretazione degli spettri FTIR. La determinazione mediante GC / MS di acidi grassi a catena lunga, alcoli a catena lunga, alcani, idrocarburi policiclici terpenici, diterpeni e triterpeni, indica che i balsami delle mummie consistevano principalmente in cera d'api, pece di pino e resina mastice. L'assegnazione del picco è basata sull'interpretazione degli spettri di massa e sul confronto con composti e materiali di riferimento, presenti nella biblioteca (NIST 1.7) e con spettri riportati in letteratura [26].

John Mills e Raymond White della National Gallery di Londra hanno studiato la resina dell'età del bronzo usando GC / MS. Dall'estratto metanolo - etere (1: 9) della resina, hanno identificato quattro acidi come esteri metilici derivati: acido oleanico, acido moronico, acido masticadienonico e acido iso-masticadienonico. Dato che questi acidi sono caratteristici delle resine del genere *Pistacia*, Mills e White hanno concluso che la resina dell'età del

bronzo proviene da questo genere [27]. Ai fini del nostro studio è importante riuscire a identificare le resine dato che anche tra i composti conservati nei vasi della spezieria di Santa Maria della Scala ce ne sono alcune, probabilmente perché venivano usate, fin dai tempi antichi, per preparare incenso, medicine, cosmetici e profumi [28].

Le indagini sono state eseguite per mezzo di una gascromatografia Agilent Technologies 6890 N (Network GC System) accoppiata con uno spettrometro di massa ad impatto elettronico (70 eV) Agilent 5973 Network Mass Selective Detector, equipaggiata con una colonna DB-5MS (30 m x 0,25 mm di diametro -5% fenil metilpolisilossano).

Obiettivo: identificare frazione resinica e di acidi grassi

Preparativa: Derivatizzazione in metil esteri

Peso campione (~ 0,30 mg) +30µL di derivatizzante (MethPrep2, (Trifluoro-trimetil-fenil-ammonio), un sale quaternario di ammonio) + 10µL di standard interno (FAC-C19, (acido nonadecanoico), un acido carbossilico non presente in natura).

Metodo La Scala 2: 80 °C per 3 min, rampa di temperatura da 80 °C a 200 °C a 10 °C/min, mantenimento a 200 °C per 4 min, da 200 °C a 280 °C a 6 °C/min (mantenimento per 15 min). Flusso 1 mL/min. Volume di iniezione 1µL. Gas di trasporto Elio. Colonna: DB-5MS ~30 m x 0,25 mm di diametro (5% fenil metilpolisilossano)

Split mode. Oven: 80°C, Inlet: 280°C, T interfaccia (Aux2): 280°C, Sorgente MS: 230°C MSQuad: 150 °C.

Range di massa da 50 a 650. Solvent delay: 7.50 min

Preparativa per campioni Non derivatizzati

Peso campione (~0,9 mg + 0,3mL di solvente (DCM))

Metodo Resine 100 320 ND: 100 °C per 3 min, rampa di temperatura da 100 a 320 °C a 10°C/min. Flusso 1,2 mL/min. Volume di iniezione 2µL. Gas di trasporto Elio. Colonna: DB-5MS ~30 m x 0,25 mm di diametro (5% fenil metilpolisilossano).

Split mode. Oven: 100 °C x 3 min, Inlet: 290 °C, T interfaccia: 250 °C, Sorgente MS: 230°C, MSQuad: 230°C.

Range di massa da 50 a 650.

L'assegnazione del picco di massa è stata effettuata sul confronto con composti e materiali di riferimento analizzati, con spettri di massa della libreria (NIST) e con spettri di massa riportati in letteratura, e anche sull'interpretazione degli spettri di massa.

Obiettivo: identificare frazione monoscaccaridica

Preparativa: Idrolisi acida e metanolisi per liberare gli zuccheri seguite da un processo di derivatizzazione che permette di ottenere derivati trimetilsililati. Tale procedura è stata messa appunto da Pasqualina Consoli, Università Ca' Foscari di Venezia che ha studiato i metodi per identificare gli zuccheri semplici, riadattando una procedura già pubblicata [29].

In questo caso l'assegnazione del picco di massa è stata effettuata sul confronto con composti e materiali di riferimento analizzati, con spettri di massa della libreria (NIST) e con spettri di massa riportati in letteratura, e anche sull'interpretazione degli spettri di massa.

2.2.6 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

La Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) permette di ottenere informazioni sulla struttura di specie organiche e inorganiche.

Questa tecnica sfrutta un superconduttore immerso in elio liquido per generare un campo magnetico (nel caso dello strumento impiegato in questa ricerca di 400 MHz) costante nel tempo. Quando una sostanza viene immersa nello strumento i vari nuclei atomici, si comportano come un ago e girano su sé stessi in un moto di precessione, orientandosi lungo la direzione imposta dal campo magnetico applicato. Il campione che si intende analizzare viene inserito in modo automatizzato, quindi si effettua l'esperimento di risonanza mediante l'invio da parte del generatore di radiofrequenze di un "pulse" che ha lo scopo di portare ad un livello eccitato i nuclei atomici. Ogni nucleo risponde in modo differente all'eccitazione imposta, in funzione della struttura elettronica che lo circonda (più la densità elettronica è elevata, più l'effetto di schermo sarà maggiore e i protoni risuoneranno a frequenza inferiore). Nella parte inferiore dello strumento è presente una sonda (solenoidale o bobina) che funge da ricevitore di radiofrequenze e da rilevatore del segnale di decadimento ad induzione libera (FID), che si genera quando il nucleo torna al suo stato fondamentale. La trasformazione del FID (che è un segnale nel dominio dei tempi) nello spettro NMR

comunemente analizzato (che è nel dominio delle frequenze o ppm) avviene ad opera dell'algoritmo matematico della trasformata di Fourier [9].

Quando si parla di analisi NMR, l'esperimento più semplice ma anche quello che in genere fornisce il contenuto informativo maggiore è l' ^1H NMR monodimensionale, in cui viene registrato lo spettro protonico (^1H) del campione (intensità in funzione della frequenza). Attraverso l'analisi dello spettro si possono ottenere importanti informazioni strutturali sulle molecole in esame in genere combinando tre informazioni:

1. i valori di *chemical shifts* di ogni protone, in altre parole la posizione del segnale sullo spettro, che è funzione della schermatura sopra descritta
2. l'altezza del segnale proporzionale al numero di protoni che sottendono il segnale stesso
3. la molteplicità o forma del segnale che fornisce informazioni sui nuclei adiacenti al segnale analizzato

Un altro esperimento monodimensionale è quello del C^{13} , da cui in questo caso si ottengono i *chemical shift* degli atomi di carbonio.

Per studiare i campioni esaminati ci si è avvalsi altre tecniche bidimensionali: l'esperimento omo-nucleare COSY (COrrelation SpectroscopY) permette di analizzare più semplicemente gli accoppiamenti dello spettro protonici.

Gli esperimenti HSQC e HMBC forniscono informazioni relative a due nuclei diversi, per questo vengono definiti etero-nucleari. Tramite HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) si può vedere la diretta correlazione fra protoni e atomi di C direttamente legati. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) permette di assegnare il Chemical Shift di carboni privi di protoni, attraverso interazioni di tipo *long range*.

L'esperimento DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) consente invece di discriminare i composti presenti in una miscela sulla base del loro raggio idrodinamico, ovvero in base alle dimensioni della molecola. Lo spettro risultante è un grafico 2D con spostamento chimico sull'asse orizzontale e log (costante di diffusione) sull'asse verticale [30].

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) ottiene ottimi risultati nella caratterizzazione delle strutture molecolari e viene ampiamente utilizzata in diversi campi della chimica organica e analitica. Non è ancora stata utilizzata frequentemente nello studio del patrimonio culturale, ciò può essere dovuto al fatto che i campioni archeologici o storici spesso sono formati da miscele complesse di composti organici. Inoltre essendo una tecnica

intresicamente poco sensibile, non risulta adatta quando la disponibilità del campione è esigua come spesso accade nel campo dei beni culturali.

Con lo stato attuale della tecnica, le applicazioni più significative di NMR avvengono nell'ambito dell'analisi di materiali altamente polimerizzati, ad esempio resine fossili e legno archeologico. L'NMR è adatto non solo all'identificazione, ma anche allo studio delle alterazioni: potrebbe essere quindi una tecnica eccellente da applicare (in maniera complementare ad esempio alla massa) nell'ambito dello studio di composti organici come antichi trucchi e rimedi [15].

Specifiche strumento: NMR Bruker Ascend 400 MHz 9.4 Tesla (completamente automatizzato)

Preparativa: campione tal quale sciolto in cloroformio deuterato (LS225= 15mg, CDCl_3 = 0,5 μL)

Esperimento DOSY: 32 scansioni, $d20=0.05$ sec, $p30=1200.00$ μsec

2.3 Analisi condotte sui campioni

Nelle seguenti tabelle sono riportate le tecniche d'analisi utilizzate per ciascuno dei campioni.

È necessario fare un'anticipazione: la suddivisione in cinque sottocategorie è stata possibile solo grazie ai risultati ottenuti tramite lo studio al microscopio ottico e all'interpretazione degli spettri IR.

Tabella 2: Analisi condotte sui campioni vegetali

VEGETALI								
Numero campione	Nome campione	Fotografia in luce trasmessa	Microscopio a fluorescenza	ATR	Riflettanza diffusa	HPLC	GC-MS	NMR
LS5	Tinct. Cascarilla	X	X	X	X	X		
LS101	Cascarilla	X	X	X	X	X	X	
LS7	E.coca	X	X	X	X	X		
LS27	Diapente	X	X	X	X	X		
LS48	Mirabol Citrin	X	X	X	X	X		
LS56	Gran Paradis	X	X	X	X	X		
LS112	Santonico	X	X	X	X	X		
LS115	Lig Aloe	Troppo grande	X	X	X	X	X	
LS164	Lig. Aspal	Troppo grande	X	X	X	X		
LS198	Fung Malit	X	X	X	X	X		
LS192	Anis Stellat	Troppo grande	X	X	X	X		
LS227	Carb.Amm. Pyro oleos	Troppo grande	X	X	X	X		
LS230	No se lee	X	X	X	X	X		

Tabella 3: Analisi condotte sui campioni carboidrati

CARBOIDRATI								
Numero campione	Nome campione	Fotografia in luce trasmessa	Microscopio a fluorescenza	ATR	Riflettanza diffusa	HPLC	GC-MS	NMR
LS63	Diagrid	Troppo grande	X	X	X	X	X	
LS92	Mechoacan	Troppo grande	X	X	X	X		
LS141	Paolinia	X	X	X	X	X		
LS103	Magist. Mart	X	X	X	X	X		

Tabella 4: Analisi condotte sui campioni proteine

PROTEINE								
Numero campione	Nome campione	Fotografia in luce trasmessa	Microscopio a fluorescenza	ATR	Riflettanza diffusa	HPLC	GC-MS	NMR
LS23	Albumina	X	X	X	X			
LS143	Viper Pulv	X	X	X	X			
LS201	Oss.cord. cerv.	X	X	X	X			
LS223	Ladon	Troppo opaco	X	X	X		X	

Tabella 5: Analisi condotte sui campioni resine o gomme

RESINE O GOMME								
Numero campione	Nome campione	Fotografia in luce trasmessa	Microscopio a fluorescenza	ATR	Riflettanza diffusa	HPLC	GC-MS	NMR
LS37	Gumin Kui	X	X	X	X		X	
LS39	Resin Mechioar	X	X	X	X		X	X
LS81	Benzoin	X	X	X	X		X	X
LS88	Gum Gut.	X	X	X	X		X	
LS111	Gum. Dragant.	Troppo grande	X	X	X		-	
LS119	Res. Guajac	X	X	X	X		X	X
LS193	Guiaco Resina	X	X	X	X		X	X
LS130	Gum. Lacc	Troppo grande	X	X	X			
LS171	Sarcocoll	Troppo grande	X	X	X		X	X
LS174	Balsam S.Ton	X	X	X	X		X	
LS178	Sin Etiqueta	X	X	X	X		X	
LS225	Sin identificar	Troppo grande	X	X	X		X	X
LS232	Resin Scamon	X	X	X	X		X	

Tabella 6: Analisi condotte sui campioni lipidi o misti

LIPIDI O MISTI								
Numero campione	Nome campione	Fotografia in luce trasmessa	Microscopio a fluorescenza	ATR	Riflettanza diffusa	HPLC	GC-MS	NMR
LS139	Sen synap Alb	Troppo grande	X (Macinato)	X	X		X	
LS26	Bezoar	X	X	X	X		X	
LS59	Lans. Fer Rubr.	X	X	X	X			
LS142	Babam odintalg	X	X	X	X		X	
LS67	Croc. Mart. Ap	X						

Bibliografia

- [1] M.L. Vázquez de Ágredos Pascual et al., *Science, art and mythological greco-roman beliefs in the ancient pharmacy of santa maria della scala, rome*, 9th European symposium on religious art, restoration & conservation, Proceedings book, 2017, pp.116-120.
- [2] M. L. Vázquez de Ágredos Pascual et al., *Tradition and renovation in the ancient drugs of the Spezieria di Santa Maria Della Scala between scientific knowledge and magical thought*, European Journal of Science and Theology, 2018, vol. 14 (2), pp. 3-12.
- [3] Ribechini et al. (2009), Py-GC/MS, GC/MS and FTIR investigations on late Roman-Egyptian adhesives from opus sectile: New insights into ancient recipes and technologies, *Analytica Chimica Acta* 2009, vol. 638, pp. 79–87.
- [4] Rost, F. and Oldfield, R., *Fluorescence microscopy., Photography with a Microscope*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2000.
- [5] K. R. Spring and M. W. Davidson, *Introduction to Fluorescence Microscopy*, <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>.
- [6] Manuale di istruzioni accessori epi-fluorescenza Nikon.
- [7] A. Scordato, S.Schwartz - Bioscience Department, Nikon Instruments, Inc., 1300 Walt Whitman Road, Melville, New York, 11747, J. D. Griffin, N. S. Claxton, M. J. Parry-Hill, T. J. Fellers, K. M. Vogt, I. D. Johnson, S. H. Neaves, O. Alvarado, L. Parsons Jr., M. A. Soddors, R. L. Ludlow, and M. W. Davidson - National High Magnetic Field Laboratory, 1800 East Paul Dirac Dr., The Florida State University, Tallahassee, Florida, 32310, *Fluorescence Filter Combinations- Nikon Fluorescence Filter Sets*-<https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/nikon-fluorescence-filter-sets>
- [8] Stuart B.H., *Analytical Techniques in Materials Conservation*. John Wiley & Sons, 2007.
- [9] Skoog D.A., Leary J.J., *Chimica analitica strumentale*. EdiSES,1995.
- [10] Luigi Campanella, et. al. *Chimica per l'arte*. Zanichelli. 2007. p.512.
- [11] M. Hovaneissian et al., *Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin*, C. R. Chimie 2006, vol. 9, pp. 1192–1202.
- [12] Colombini 2005, *Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt)*, *Microchemical Journal* 2005, vol.79, pp. 83– 90.
- [13] Colombini et al., *An Etruscan ointment from Chiusi (Tuscany, Italy): its chemical characterization*, *Journal of Archaeological Science* 2009, vol. 36, pp. 1488–1495.

- [14] Mizzoni et al., *Study of the organic residue from a 2600-year old Etruscan plumpekanne*, Spectrochimica Acta Part A 2007, vol. 68 pp. 377–381.
- [15] Ribechini et al., *Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials*, Anal Bioanal Chem 2011, vol. 401, pp.1727–1738.
- [16] Beaten et al., *Application of a multi-analytical toolset to a 16th century ointment: Identification as lead plaster mixed with beeswax*, Microchemical Journal 2010, vol.95, pp.227–234.
- [17] Ribechini et al., *Py-GC/MS, GC/MS and FTIR investigations on late Roman-Egyptian adhesives from opus sectile: New insights into ancient recipes and technologies*, Analytica Chimica Acta 2009, vol. 638, pp. 79–87.
- [18] Gamberini et al., *MicroRaman and infrared spectroscopic characterization of ancient cosmetics*, Vibrational Spectroscopy 2008, vol. 47, pp. 82–90.
- [19] Ruth Johnston-Feller. *Color science in the examination of museum objects, Nondestructive procedures*, Getty Conservation Institute; 2001 citato da Tiziana Cavaleri et al., *Pigments and mixtures identification by Visible Reflectance Spectroscopy*, Procedia Chemistry 2013, Vol. 8, pp. 45 – 54.
- [20] Tiziana Cavaleri et al., *Pigments and mixtures identification by Visible Reflectance Spectroscopy*, Procedia Chemistry, 2013, vol. 8, pp. 45 – 54.
- [21] Y. Moliner-Martinez et al., *Recent advances of in-tube solid-phase microextraction*, Trends in Analytical Chemistry, 2015, Vol. 71, pp.205–213.
- [22] R. A. González-Fuenzalida et al., *Evaluation of Superparamagnetic Silica Nanoparticles for Extraction of Triazines in Magnetic in-Tube Solid Phase Microextraction Coupled to Capillary Liquid Chromatography*, Nanomaterials 2014, vol. 4, pp.242-255.
- [23] Wen et al., *A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines*, J. Agric. Food Chem. 2005, vol.53, pp. 6624-6629.
- [24] J. Javanmardi et al., *Chemical Characterization of Basil (Ocimum basilicum L.) Found in Local Accessions and Used in Traditional Medicines in Iran*, Agric. Food Chem., 2002 vol. 50, pp. 5878-5883.
- [25] Beaten et al., *Application of a multi-analytical toolset to a 16th century ointment: Identification as lead plaster mixed with beeswax*, Microchemical Journal 2010, 95, pp. 227–234.
- [26] Lucejko et al., *An analytical approach based on X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry to characterize Egyptian embalming materials*, Microchemical Journal 2012, vol.103, pp. 110–118.

- [27] Mills J.S. and White R., *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworth-Heinemann, 2003 Loudon, chimica organica, Napoli EdiSes editore 2010.
- [28] Harfield et al., *Identification of a Late Bronze Age Resin*, *Anal. Chem.*, 1990, vol. 62 (1), pp. 41-45A.
- [29] I. Bonaduce et al., *Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of plant gums in samples from painted works of art*, *J. Chromatogr. A*, 2007, vol. 1175, pp. 275–282.
- [30] N.E. Jacobsen, *NMR spectroscopy explained. Simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology*. Wiley & Sons editore, 2007.

Capitolo 3 Risultati e discussione

3.1 Analisi preliminari

Microscopia ottica e a fluorescenza e spettrometria in riflettanza diffusa

In questa sezione vengono riportati i risultati delle analisi preliminari per indagare tutti i 39 campioni appartenenti alla categoria dei composti organici.

Servendosi di due diversi tipi di microscopia, quella ottica e quella a fluorescenza, è stato possibile svolgere indagini morfologiche da cui si evince che si tratta di materiali differenti tra loro, per dimensioni e per durezza, per trasparenza e opacità. Alcuni di questi sono di piccole dimensioni o sono polveri quindi necessitavano di uno studio accurato a ingrandimenti maggiori. Altri invece, essendo di grandi dimensioni, si sarebbero potuti suddividere in sottocategorie direttamente ad occhio nudo. Tra questi spiccano dei pezzetti di forma e odore caratteristici: l'anice stellato.

Molti dei campioni solidi sono composti da una parte più grande e solida e da piccole scaglie in gradazione di colore che provengono da lati diversi dello stesso campione. Le fotografie riportate in tabella 1 sono solo una selezione delle fotografie scattate a ciascun campione²³.

Lo studio preliminare condotto mediante lo stereomicroscopio e con il microscopio ottico è stato fondamentale per capire se ci si trovava davanti a campioni omogenei o eterogenei. In generale si può dire che i campioni siano per la maggior parte eterogenei e che si trovino in uno stato di conservazione abbastanza buono non presentando particolari forme di degrado sulla superficie.

In rari casi però, come si può vedere dalle fotografie riportate nelle tabelle sottostanti, la superficie del campione non è esattamente omogenea, soprattutto per quanto riguarda la sottocategoria delle resine e gomme. Osservando i campioni con il microscopio ottico si distinguono alcune bolle ma anche qualcosa che assomiglia a polvere di natura diversa rispetto al resto del campione. Questa "polvere" permane anche provando ad eliminarla con il pennello: sembra essere inglobata nel campione. Trattandosi di medicinali risalenti al XVIII secolo è presumibile che si tratti di piccole alterazioni. Nelle seguenti tabelle sono riportate anche delle brevi descrizioni di ciascun campione.

²³ Le foto sono state scattate prevalentemente con l'obiettivo 10X. È stato utilizzato anche l'obiettivo 50x ma ad ingrandimenti così alti l'immagine rivela il problema della messa a fuoco su piani diversi: questa risulta complicata perché i campioni sono costituiti da molteplici sfaccettature e se si desidera mettere a fuoco un punto quello subito dietro sarà assolutamente fuori fuoco. In sintesi, pur trattandosi di uno strumento professionale che permette di mettere a fuoco su piani diversi, quando si decide di indagare più approfonditamente la superficie ci si imbatte in un'immagine che non presenta a fuoco ogni parte del campione.

Servendosi del microscopio a fluorescenza si indaga la presenza o meno di clorofilla all'interno dei campioni presi in esame, ovvero i campioni organici. La clorofilla ha una fluorescenza caratteristica di colore rosso (Fig. 1) e per confronto visivo è possibile verificare o meno la sua presenza.

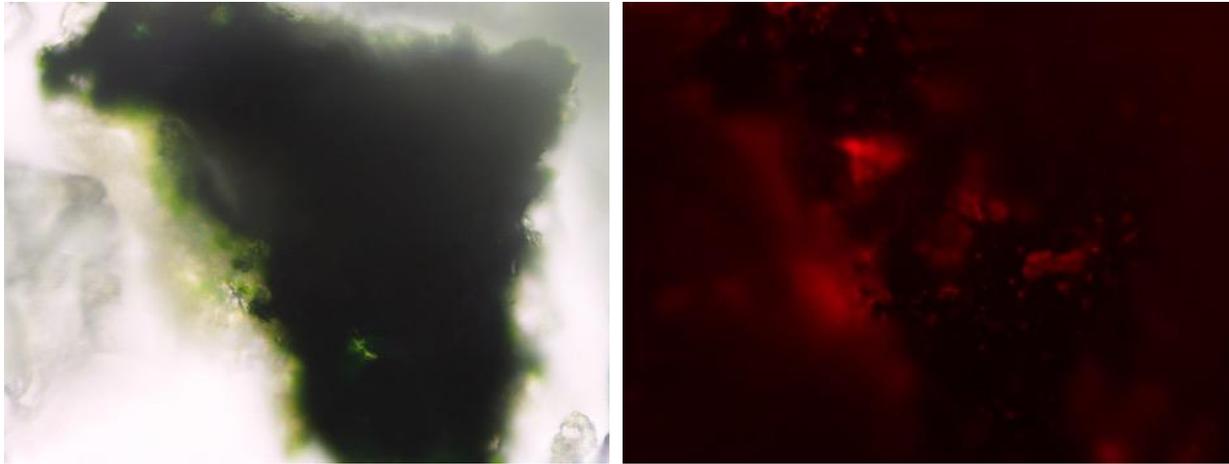


Figura 1: Fluorescenza caratteristica della clorofilla visibile mediante microscopia a fluorescenza dello standard di alga spirulina, ricca di clorofilla

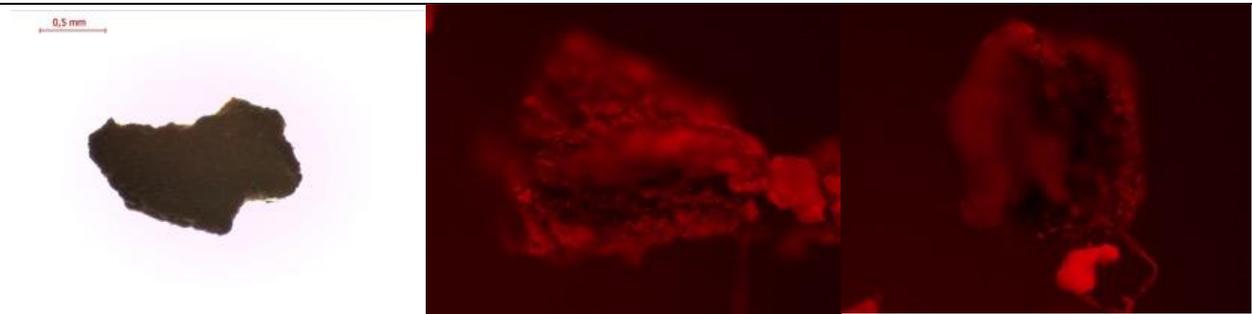
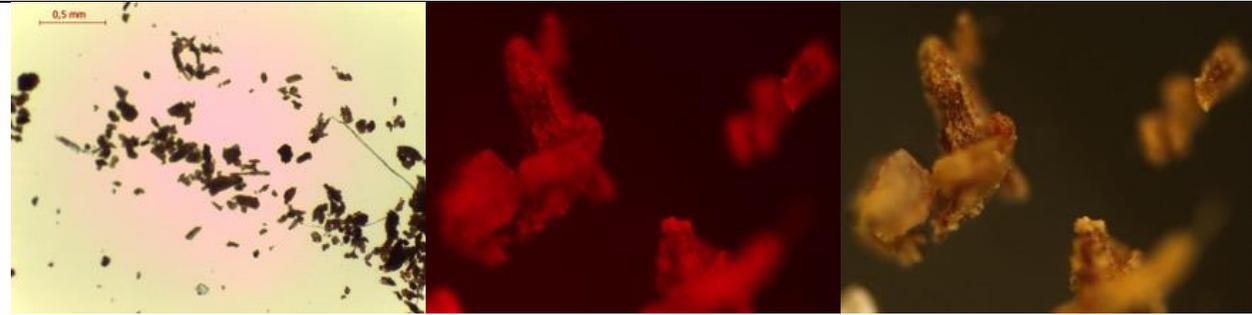
L'indagine svolta con il microscopio a fluorescenza con filtri B-2A, G-2A, UV-2A è stata condotta su tutti i campioni a parte su LS67. Nelle tabelle sottostanti viene riportata una selezione delle immagini più significative scattate con questo strumento (Tabelle 1, 4, 6, 8, 10).

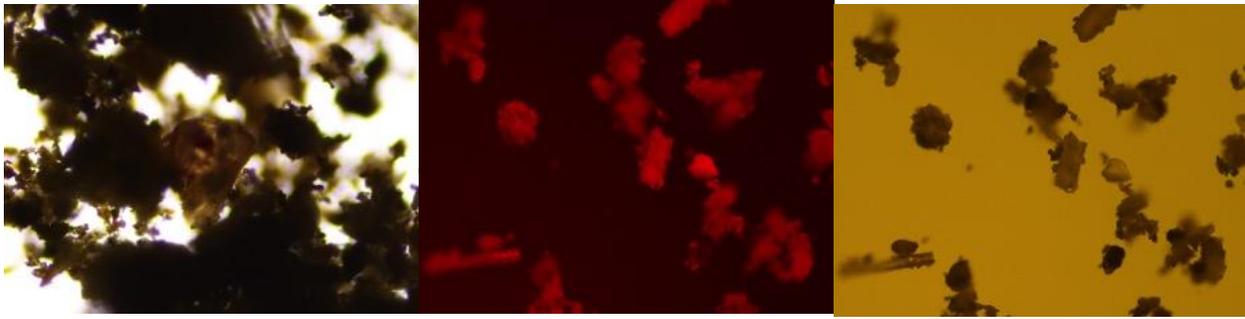
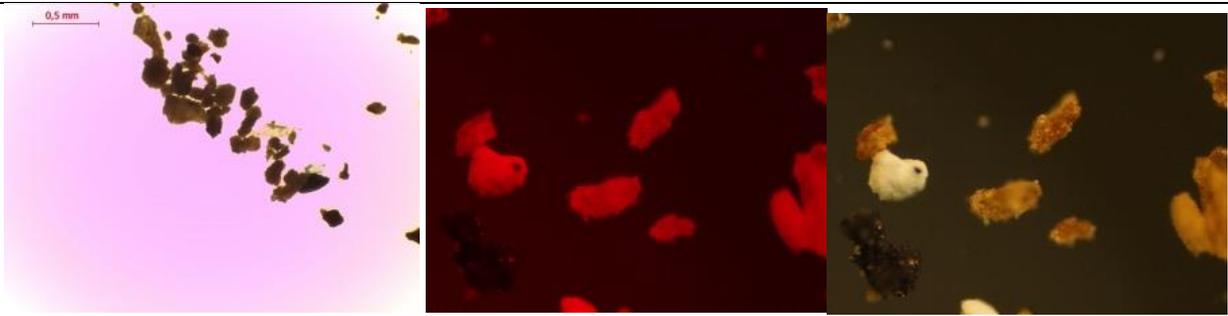
Per ottenere maggiori informazioni si è deciso di misurare gli spettri dei campioni in riflettanza diffusa per confrontare tra loro gli assorbimenti e confermare o meno la suddivisione in queste categorie (Figg. 2-6). Inoltre, sono state fatte supposizioni riguardanti la presenza o meno di clorofilla, composto che assorbe a circa 660 nm. Questo assorbimento tipico della clorofilla è stato registrato solo per alcuni campioni inseriti nella categoria Vegetali: i campioni che sembrano avere la stessa fluorescenza caratteristica della clorofilla sono LS5 tinct. Cascarill, LS7 estratto di coca, LS115 Lig Aloe e LS192 Anis stellat.

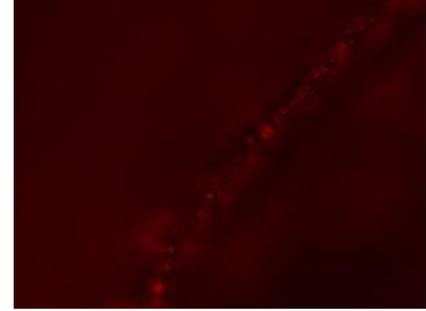
I risultati ottenuti attraverso la spettroscopia di riflettanza diffusa possono confermare o meno quelli ottenuti grazie all'indagine svolta attraverso la microscopia a fluorescenza (Tabella 3).

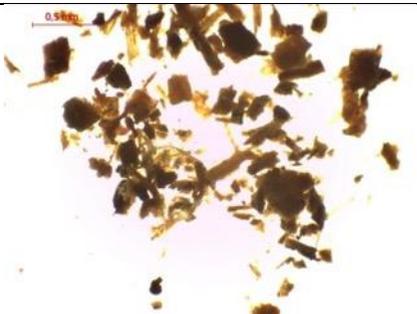
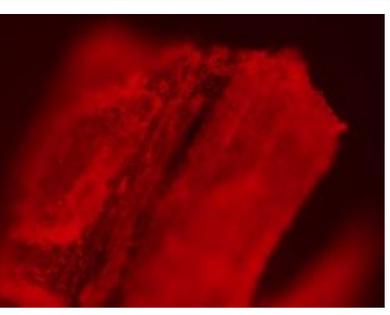
3.1.1. Microscopia ottica e a fluorescenza sui campioni appartenenti alla categoria Vegetali

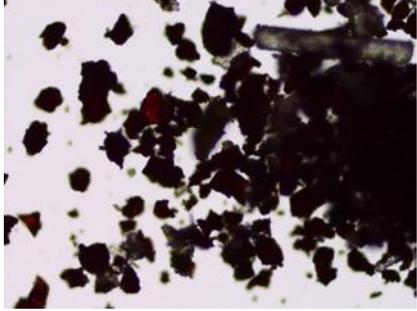
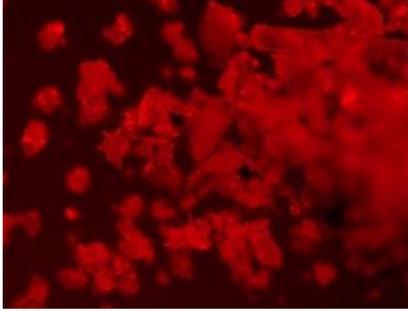
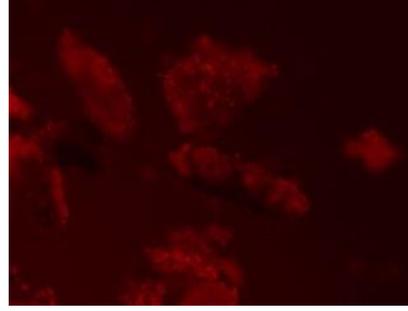
Tabella 2: Immagini scattate con il microscopio a fluorescenza dei campioni organici appartenenti alla categoria vegetali

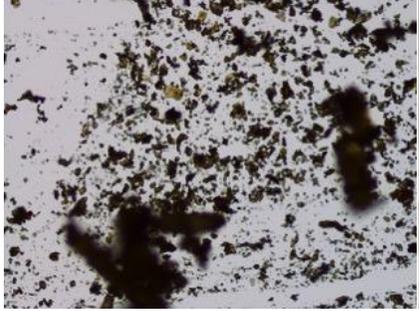
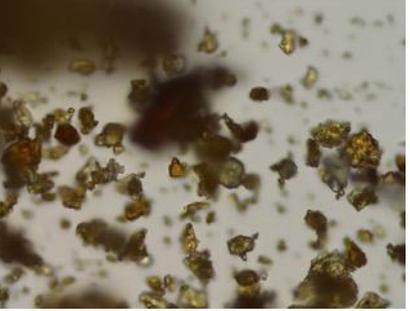
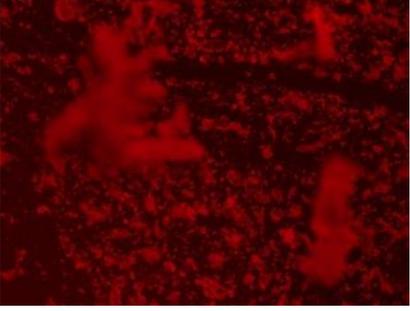
VEGETALI			
Numero campioni	Nome campioni	Foto	Descrizione
5	Tinct de Cascarilla	 <p>fotografia in luce trasmessa epi-fluorescenza G-2A, 10X epi-fluorescenza G-2A, 10X</p>	Piccoli frammenti irregolari color bruno
101	Cascarilla	 <p>fotografia in luce trasmessa epi-fluorescenza G-2A , 10x epi-fluorescenza UV-2A, 10x</p>	Frammenti piccolissimi (dell'ordine di 0,1 mm) che sembrano color legno

7	Estratto de coca	 <p data-bbox="443 496 1411 528">fotografia in luce trasmessa epi- fluorescenza G-2A , 10x epi-fluorescenza B-2A , 10x</p>  <p data-bbox="443 839 763 871">epi-fluorescenza UV-2A , 10x</p>	Frammenti che sembrano essere di natura legnosa.
27	Diapente	 <p data-bbox="443 1190 1467 1222">fotografia in luce trasmessa epi-fluorescenza G-2A , 10x epi-fluorescenza UV-2A , 10x</p>	Frammenti irregolari

48	Mirabol citrin				<p>Corpo principale compatto dalla superficie scabrosa di color bruno rossastro. Da questo di sono sfaldati dei piccoli frammenti dello stesso colore.</p>
fotografia in luce trasmessa		epi-fluorescenza G-2A , 10x epi-fluorescenza UV-2A , 10x			
56	Gran Paradis				<p>Si tratta di pezzi compatti di forma sferica irregolare che si macinano con difficoltà a mortaio. Sembra si tratti di "palline" di legno archeologico.</p>
fotografia in luce trasmessa		epi-fluorescenza G-2A , 10x			
fotografia in luce trasmessa		epi-fluorescenza G-2A , 10x			

112	Santonico	 <p>fotografia in luce trasmessa</p>  <p>epi-fluorescenza UV-2A , 10X</p>	 <p>fotografia in luce trasmessa 10X</p>	 <p>epi-fluorescenza G-2A , 10X</p>	Piccoli frammenti lignei irregolari
115	Lig Aloe	 <p>fotografia in luce diffusa</p>	 <p>epi-fluorescenza G-2A , 10X</p>	 <p>epi-fluorescenza UV-2A , 10X</p>	Due pezzi di grandi dimensioni (si misurano in cm). Manifestano una struttura simile a quella di una corteccia.

164	Lig. Aspal.				Grossi frammenti lignei
		fotografia in luce diffusa	epi-fluorescenza G-2A , 10X	epi-fluorescenza G-2A , 50X	
198	Fung Malit				Frammenti piccoli irregolari di colore bruno-rossastro e frammenti allungati con all'interno dei cristalli trasparenti.
		fotografia in luce diffusa	epi-fluorescenza G-2A , 10X		
192	Anis estrellado				Tipici frammenti legnosi a forma di stella che contraddistinguono l'anice stellato. Conserva ancora una nota di profumo caratteristico.
		fotografia in luce diffusa	epi-fluorescenza G-2A , 10X		

227	Carb. Amm. Pyro. oleos			Frammenti abbastanza grossi rispetto a quelli dei campioni precedenti. Color bruno scuro.	
		fotografia in luce diffusa	epi-fluorescenza G-2A , 10X		
230	(nome illeggibile)				Minuscoli frammenti quasi trasparenti che variano colore dal rosso-brunastro al giallo pallido passando per diversi toni aranciati.
		fotografia in luce diffusa	fotografia in luce trasmessa	epi-fluorescenza G-2A , 10X	

3.1.2 Riflettanza diffusa dei campioni organici Vegetali

In figura 2 sono riportati gli spettri di riflettanza registrati sui campioni inseriti nella sottocategoria vegetali. Questa tecnica permette di confrontare le ipotesi formulate durante l'interpretazione degli spettri infrarossi confrontandoli con lo spettro dello standard di amido (cfr. paragrafi 3.2.1.1, 3.3.2, 3.2.3, 3.3 e Appendice1). Inoltre, si può verificare la presenza o meno della clorofilla che assorbe a 660 nm.

Lo standard di amido presenta due assorbimenti: il primo è di intensità maggiore rispetto al secondo, i massimi cadono rispettivamente a 275 e a 355 nm. Quest'ultimo ha una piccola spalla a 335 nm.

Come si può vedere in figura 2, gli spettri misurati hanno alcune caratteristiche in comune e, come si può vedere nella tabella 2, possono essere collegati con lo spettro dello standard di amido: il primo assorbimento che si incontra a basse lunghezze d'onda cade a 270/275 nm ed è simile in tutti gli spettri di questa famiglia. Al contrario il secondo assorbimento (a 350/355 nm) non è sempre lo stesso in tutti gli spettri. Bisogna considerare che la risoluzione spettrale dello strumento è di 5 cm^{-1} e che i campioni non sono puri, quindi è ammesso uno spostamento dei valori massimi.

Lo spettro che differisce maggiormente è quello relativo al campione LS48 Mirabol citrin. perché presenta un assorbimento a 360 nm e uno piccolo a 325 nm al posto dell'assorbimento il cui massimo cade a 355 nm.

I campioni LS56 Gran Paradis y LS198 Fung. Malit. non presentano caratteristiche in comune con altri spettri: dopo l'assorbimento a 270nm entrambi salgono e man mano si appiattiscono fino al punto in cui presentano un'inflexione. Questa flessione si trova a 505 nm nel primo campione e a 565 nm nel secondo.

Il campione LS7 estratto di Coca presenta un assorbimento significativo a 660nm, alla stessa lunghezza d'onda è presente un assorbimento, anche se molto debole, nei campioni LS27, LS112 e LS192.

La clorofilla assorbe a circa 660 nm, per questa ragione i picchi di assorbimento che cadono a questa lunghezza d'onda sono stati evidenziati in verde (Tabella 2). Non si può dire con certezza che si tratti dell'assorbimento dovuto alla clorofilla ma è bene tenerlo in considerazione. Le analisi effettuate utilizzando il microscopio a fluorescenza saranno un contributo per confermare o meno l'ipotesi della presenza di clorofilla.

In conclusione, si può dire che gli spettri relativi ai campioni LS112, LS115, LS230 mostrano una tendenza discendente più diretta dopo il secondo picco di assorbimento rispetto agli

altri. Questi, vale a dire i campioni LS5, LS101, LS27, LS48, LS164 e LS227 presentano una tendenza più dolce.

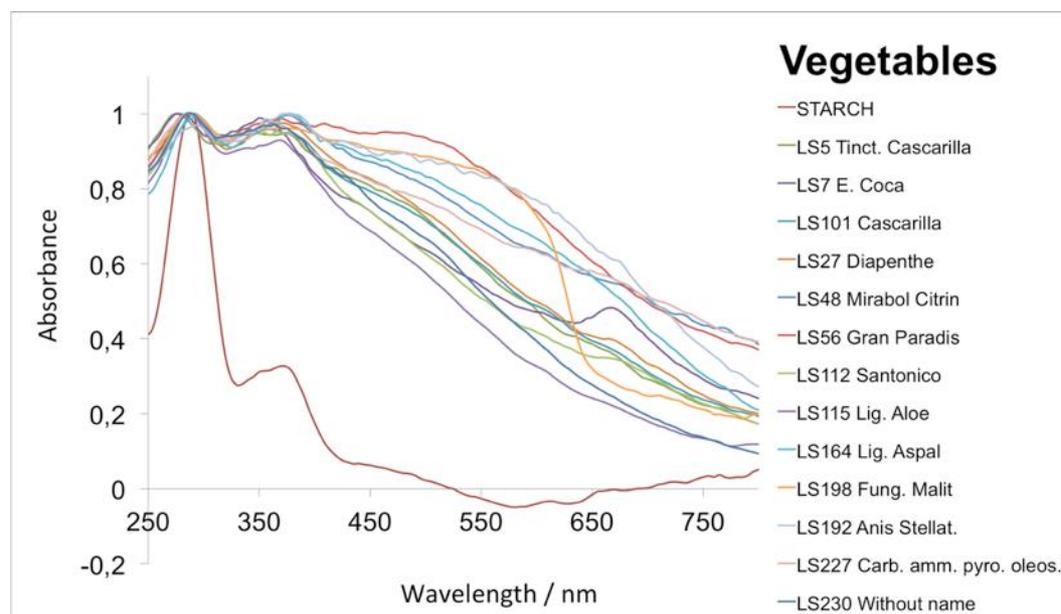


Figura 2: Sovrapposizione dei campioni organici Vegetali

Tabella 2: Assorbimenti relativi ai campioni appartenenti alla sottoclasse dei vegetali

Numero e nome campione	Lunghezza d'onda (nm)
Standard Amido	275, (335) 355, (470) nm
LS5 Tinct de Cascarilla	270, (330) 345, 375 nm
LS101 Cascarilla	270, 345, 360 nm
LS7 Estratto di Coca	275, 350, 660 nm
LS27 Diapenthe	270, (335) 355, 655 (debole) nm
LS48 Mirabol citrin	270/275, 325, 360 nm
LS56 Gran Paradis	270, 355, 395, 505 (flesso) nm
LS112 Santonico	270, 320-365, 660 (debole) nm
LS115 Lig. Aloe	270/275, 355, 785 (debole) nm
LS164 Lig Aspal	275, 355, (390) nm
LS198 Fung. Malit.	270, 335, 360, 565 (flesso) nm
LS192 Anis Stellat.	270, (320) (340) 355 (370), 605 (flesso), 660 (debole) nm
LS227 Carb amm pyro oleos	270, 345, 590 (debole), 640 (debole) nm
LS230 No se lee	275, 350, 840 (debole) nm

Alla luce dei risultati ottenuti tramite l'interpretazione degli spettri in riflettanza diffusa si può dire che l'indagine eseguita tramite la microscopia a fluorescenza sia parzialmente confermata ed in parte smentita (Tabella 3).

Tabella 3: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti tramite microscopia ottica a fluorescenza e tramite riflettanza diffusa

Numero e nome campione	Lunghezza d'onda (nm)	Fluorescenza caratteristica della clorofilla	Possibile interpretazione dei risultati
LS5 Tinct de Cascarilla	270, (330) 345, 375 nm	Si	I risultati sono contrastanti
LS101 Cascarilla	270, 345, 360 nm	-	
LS7 Estratto di Coca	275, 350, 660 nm	Si	I risultati sono concordanti
LS27 Diapenthe	270, (335) 355, 655 (debole) nm		I risultati sono contrastanti
LS48 Mirabol citrin	270/275, 325, 360 nm	-	
LS56 Gran Paradis	270, 355, 395, 505 (flesso) nm	-	
LS112 Santonico	270, 320-365, 660 (debole) nm	-	I risultati sono contrastanti
LS115 Lig. Aloe	270/275, 355, 785 (debole) nm	Si	I risultati sono contrastanti
LS164 Lig Aspal	275, 355, (390) nm	-	
LS198 Fung. Malit.	270, 335, 360, 565 (flesso) nm	-	
LS192 Anis Stellat.	270, (320), (340), 355, (370), 605 (flesso), 660 (debole) nm	Si	I risultati sono concordanti
LS227 Carb amm pyro oleos	270, 345, 590 (debole), 640 (debole) nm	-	
LS230 No se lee	275, 350, 840 (debole) nm	-	
Standard Amido	275, (335), 355, (470) nm	-	

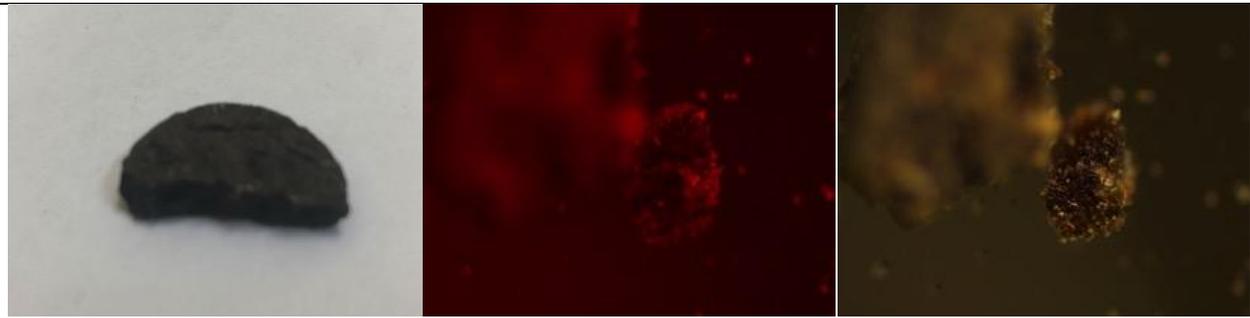
Lo spettro del campione LS7 estratto di coca presenta un assorbimento a 660 nm, che è presente anche in quello relativo al campione LS192 Anis stellat, ma è significativamente più debole. Per quanto riguarda questi due campioni si può sostenere che le due tecniche siano servite per confermare la presenza di clorofilla al loro interno.

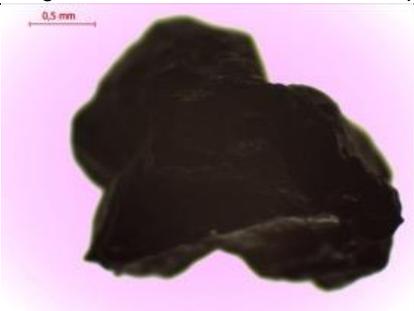
Al contrario, per i campioni LS5, LS27, LS112 e LS115, i risultati ottenuti con l'indagine al

microscopio ottico non confermano quelli acquisiti mediante l'utilizzo della riflettanza diffusa. Sembra che i campioni LS5 e LS115 possiedano la fluorescenza caratteristica della clorofilla ma che il loro spettro non assorba a 660nm [1]; i campioni LS27 Diapenthe e LS112 Santonico invece non sembrano avere la fluorescenza caratteristica della clorofilla ma il loro spettro sembrava assorbire (anche se in maniera molto debole) alla lunghezza d'onda propria di questo pigmento. In quest'ultimo caso l'indagine condotta utilizzando il microscopio a fluorescenza ha consentito di smentire le ipotesi formulate in precedenza perché gli assorbimenti deboli a 660nm non sembrano essere propri della clorofilla.

3.1.3 Microscopia ottica e a fluorescenza sui campioni appartenenti alla categoria Carboidrati

Tabella 4: Immagini scattate con il microscopio a fluorescenza dei campioni organici appartenenti alla categoria carboidrati

CARBOIDRATI			
Numero campioni	Nome campioni	Foto	Descrizione
63	Diagrid	 <p>fotografia in luce diffusa epi-fluorescenza G-2A, 10X epi-fluorescenza UV-2A, 10x</p>	<p>Unico frammento compatto di colore nero totalmente opaco. La forma caratteristica a mezza luna fa pensare a una pillola rotta a metà. La superficie non è perfettamente liscia. Per tagliarlo con il bisturi si deve imprimere parecchia forza.</p>
92	Mechoacan	 <p>fotografia in luce diffusa epi-fluorescenza G-2A, 10X</p>	<p>Frammento grande e poroso di colore beige. È totalmente opaco e molto duro. Non si taglia facilmente con il bisturi</p>

141	Paolinia				<p>Piccoli frammenti semi-trasparenti. Il colore varia dal bruno-rossastro al bianco.</p>
103	Magist Mart				<p>Frammenti irregolari di color nero, lucidi in alcune aree.</p>

3.1.4 Riflettanza diffusa dei campioni organici Carboidrati

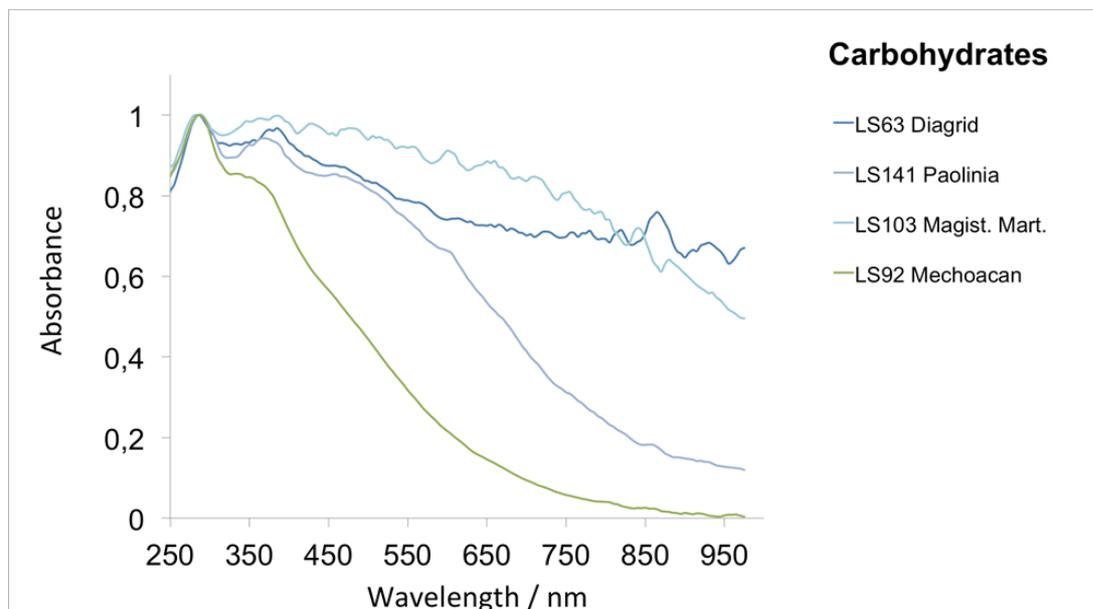


Figura 3: Sovrapposizione dei campioni organici Carboidrati

Tabella 5: Assorbimenti relativi ai campioni appartenenti alla sottoclasse dei carboidrati

Numero e nome del campione	Lunghezza d'onda (nm)
LS63 Diagrid	270, 365, 460 (debole), 500 (debole), 560 (debole), (710), (740), (765), (780), 800, 850, 915 nm
LS92 Mechoacan	270, 350 (flesso) nm
LS141 Paolinia	275, 355, 475, 590, 845 nm
LS103 Magist. Mart	270, (365, 465, 585, 740, 825) nm

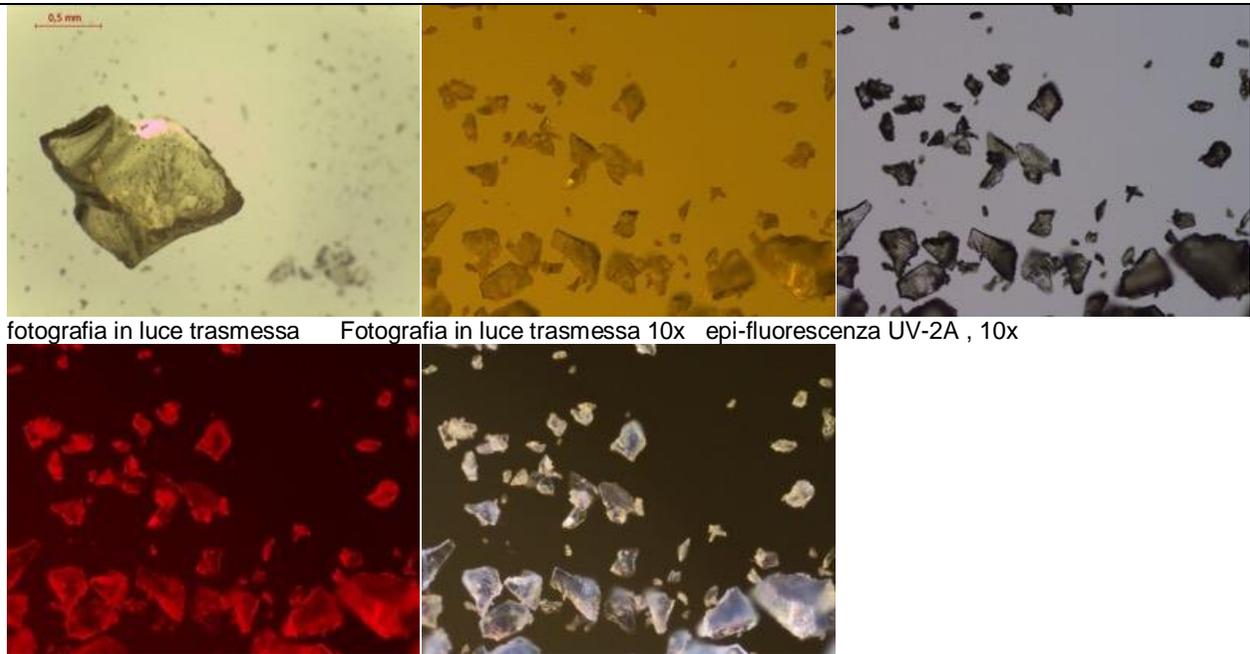
Gli spettri sono confrontabili con quello dell'amido per la forma ma non per l'intensità (figura 3). Non trattandosi di campioni puri non è un problema che l'intensità del picco non sia la stessa, l'importante è che si mantenga tale il rapporto tra le intensità dei picchi stessi.

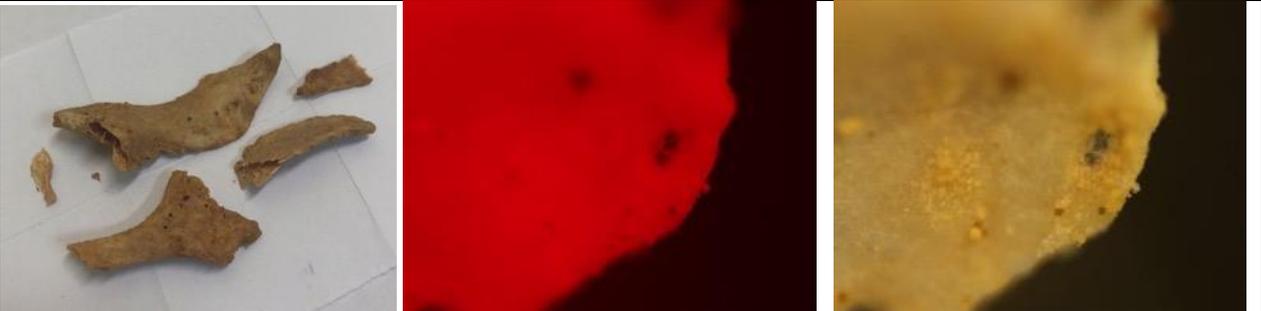
Lo spettro del campione LS92 Mechoacan ha la stessa tendenza discendente più diretta come i campioni Vegetali LS112, LS115 y LS230. Gli altri presentano una linea più dolce.

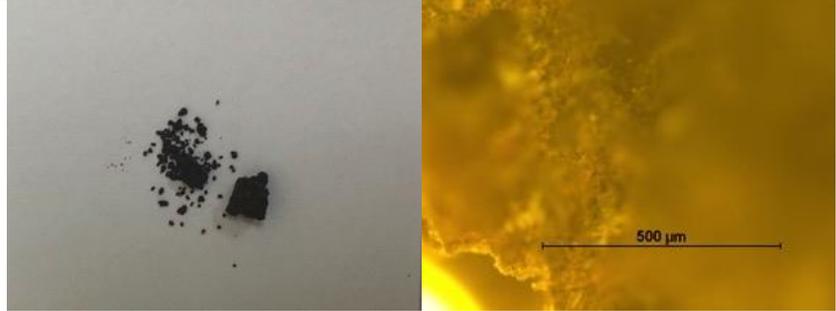
I campioni LS63 e LS103 sono di colore nero e per questo non presentano assorbimenti significativi.

3.1.5 Microscopia ottica e a fluorescenza sui campioni appartenenti alla categoria Proteine

Tabella 6: Immagini scattate con il microscopio a fluorescenza dei campioni organici appartenenti alla categoria proteine

PROTEINE			
Numero campione	Nome campione	Foto	Descrizione
23	Albumina	 <p>fotografia in luce trasmessa Fotografia in luce trasmessa 10x epi-fluorescenza UV-2A , 10x epi-fluorescenza G-2A , 10X epi-fluorescenza B-2A , 10X</p>	Frammenti di diverse misure di color giallo pallido trasparente.

143	Viper. Pulv.	 <p data-bbox="450 528 779 555">fotografia in luce trasmessa</p> <p data-bbox="882 528 1279 555">Fotografia in luce trasmessa 10x</p> <p data-bbox="1361 528 1711 555">epi-fluorescenza G-2A , 10X</p>  <p data-bbox="450 866 741 890">epi-fluorescenza B-2A 10X</p>	Piccoli frammenti allungati trasparenti.
201	Oss. Cord. Cerv.	 <p data-bbox="450 1206 757 1233">fotografia in luce trasmessa</p> <p data-bbox="792 1206 1099 1233">epi-fluorescenza G-2A , 10X</p> <p data-bbox="1137 1206 1464 1233">epi-fluorescenza UV-2A , 10X</p>	Pezzi color beige abbastanza porosi. Sembrano pezzi di osso.

			
223	Ladon		<p>Il campione è composto da un corpo di dimensioni maggiori e da piccoli frammenti che si sono staccati in modo irregolare. La massa di dimensioni maggiori è di colore nero ed è completamente opaca, ha un aspetto butterato.</p>
		<p>Fotografia in luce trasmessa 10x epi-fluorescenza G-2A , 10X epi-fluorescenza UV-2A , 10X</p> <p>fotografia in luce diffusa epi-fluorescenza UV-2A , 50X</p>	

3.1.6 Riflettanza diffusa dei campioni organici Proteine

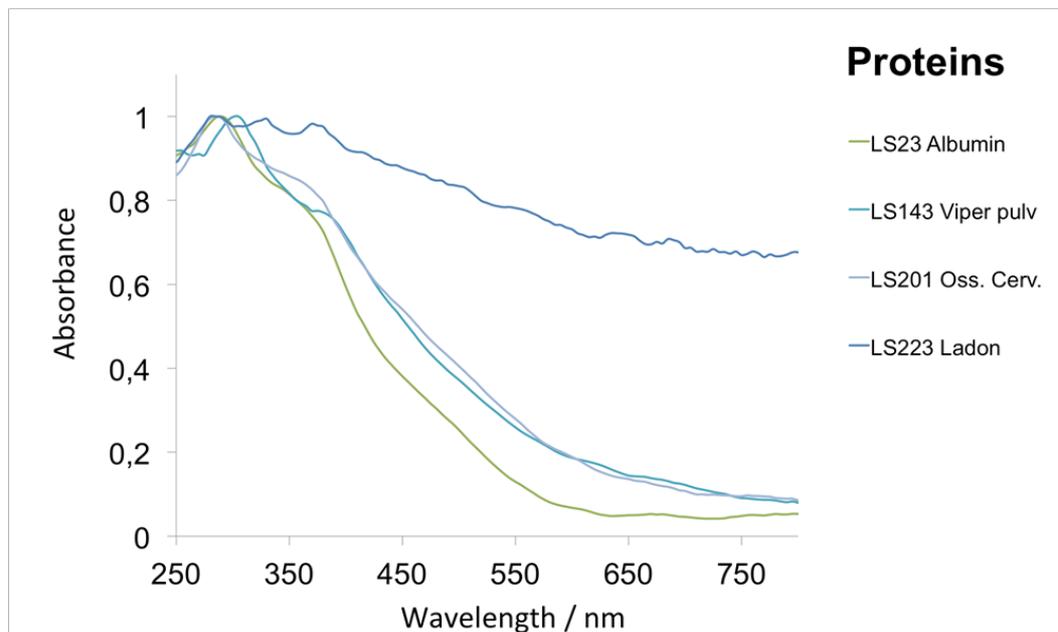


Figura 4: Sovrapposizione dei campioni organici proteine

Tabella 7: Assorbimenti relativi ai campioni appartenenti alla sottoclasse delle proteine

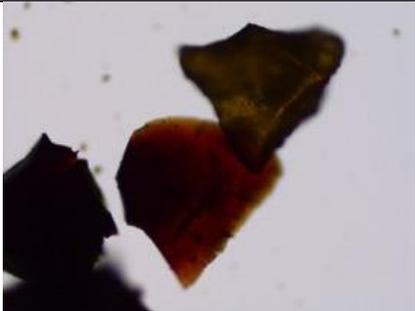
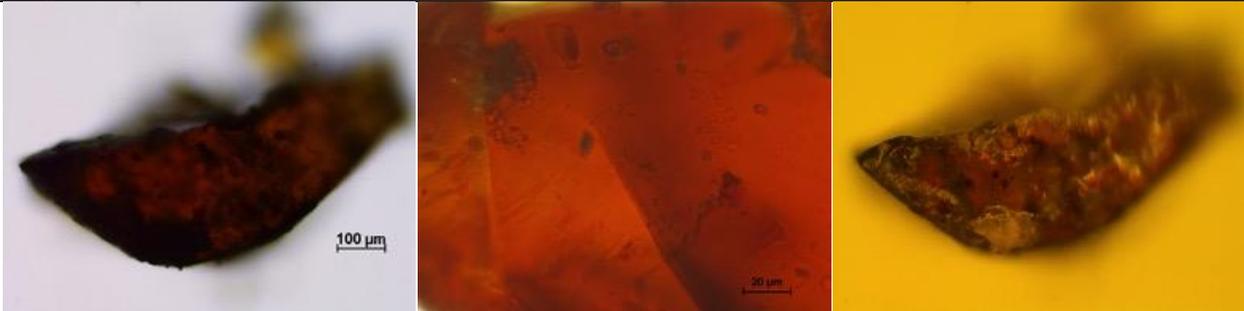
Numero e nome del campione	Lunghezza d'onda (nm)
LS23 Albumina	275, 360 (flesso) nm
LS143 Viper pulv	275, 350 (flesso) nm
LS201 Oss cord cerv	270, 350 (flesso) nm
LS223 Ladon	270, 315, 355 nm

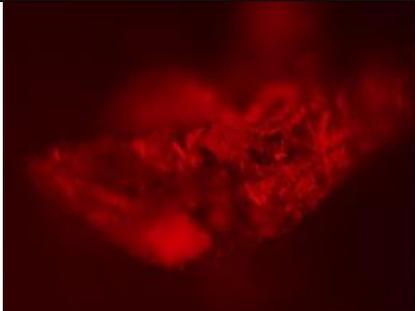
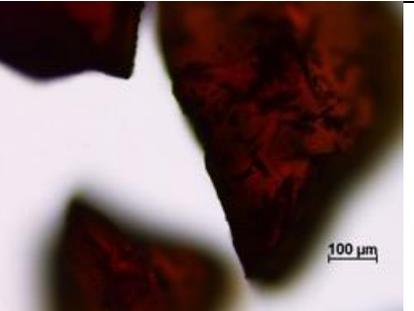
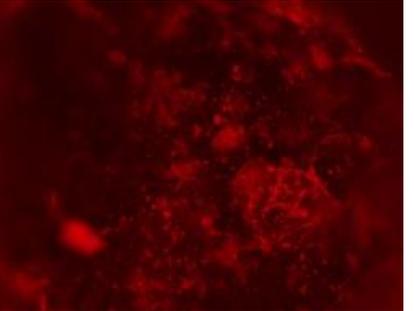
Gli spettri dei campioni della categoria proteine sono simili tra loro, infatti in ogni campione è presente il picco che cade a 270-275 nm, che è simile a quello dello standard di amido. Nessuno dei campioni però registra l'assorbimento a circa 350-355 nm, presentano solo inflessioni tra 350-360 nm. L'assenza di quest'assorbimento significa che non si tratta di amido, ciò conferma la divisione dei composti in categorie differenti.

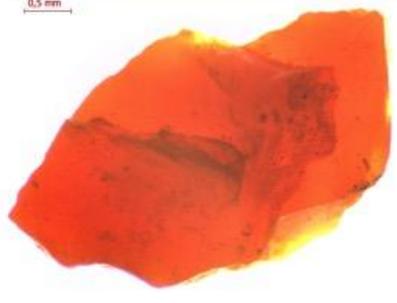
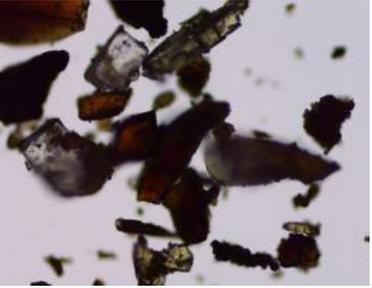
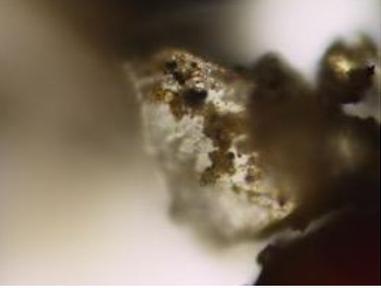
L'unico diverso è il campione LS223 Ladon. Questa è una dimostrazione del fatto che la spettroscopia di riflettanza diffusa misura la diffusione della luce di un oggetto riflettente e che, come per gli spettri di LS63 e LS103 della categoria carboidrati, il campione nero presenta uno spettro diverso e più piatto che sembra non presentare assorbimenti significativi come nei campioni colorati.

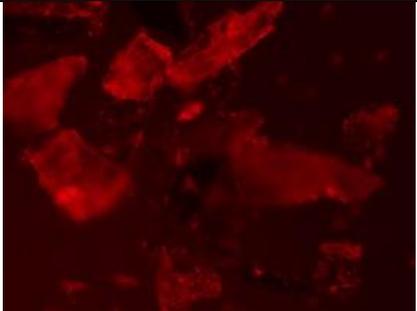
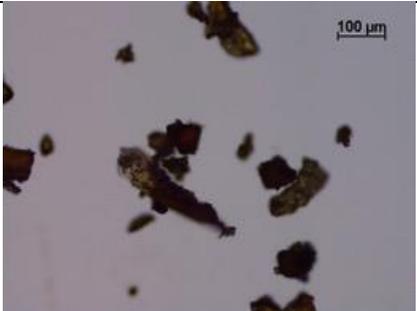
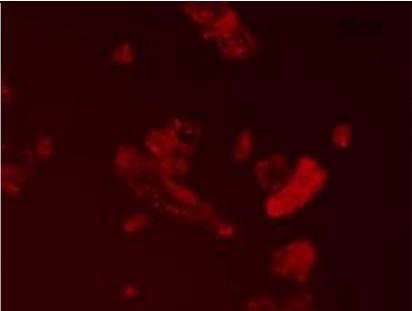
3.1.7 Microscopia ottica e a fluorescenza sui campioni appartenenti alla categoria Resine o gomme

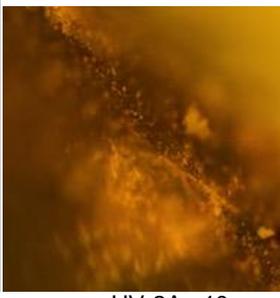
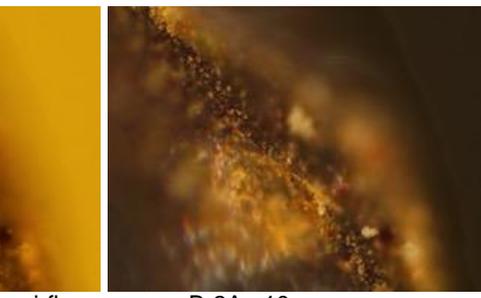
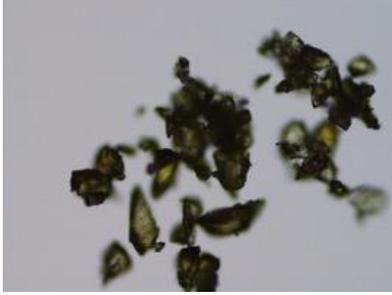
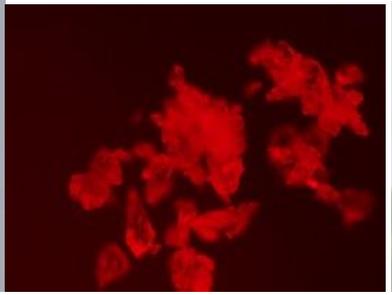
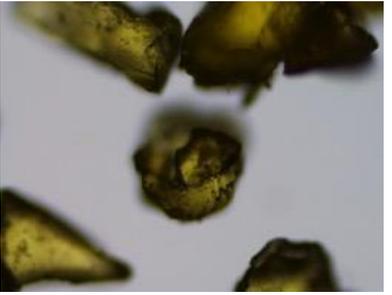
Tabella 8: Immagini scattate con il microscopio a fluorescenza dei campioni organici appartenenti alla categoria resine o gomme

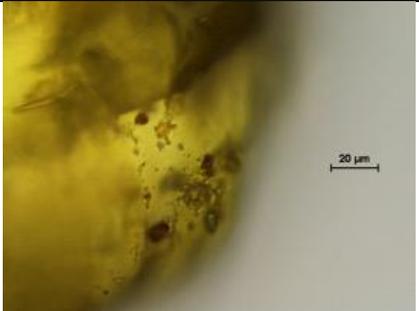
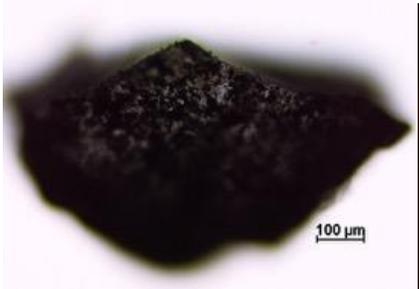
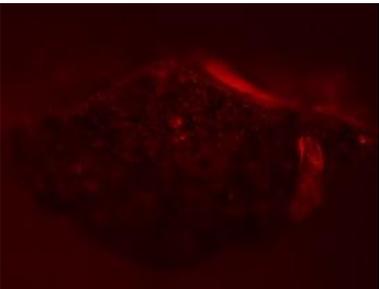
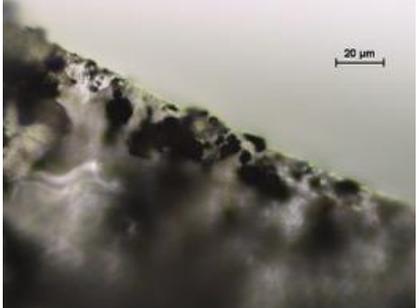
RESINE O GOMME			
Numero campioni	Nome campioni	Foto	Descrizione
37	Gumin Kui	 <p>fotografia in luce trasmessa</p>	Frammenti irregolari con colorazioni diverse, alcuni più tendenti a un bruno-verdastro, altri bruno-rossastro. Non sono completamente trasparenti, presentano una velatura opaca. La superficie è abbastanza liscia. Sono leggermente appiccicosi.
39	Resin Mechioar	 <p>fotografia in luce trasmessa Fotografia in luce trasmessa 50x epi-fluorescenza UV-2A, 10X</p>	Frammenti molto piccoli (dell'ordine di 0,1mm). Colorazione bruno-rossastra. I frammenti non sono completamente trasparenti, presentano una velatura opaca. All'interno sembrano essere presenti delle micro-bolle. I frammenti sono leggermente appiccicosi e sembrano avere una densità maggiore rispetto agli altri campioni.

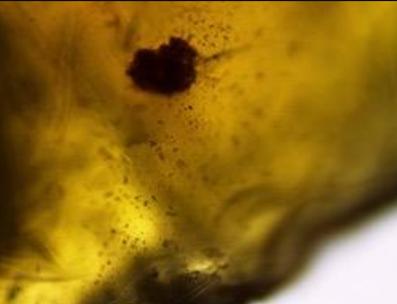
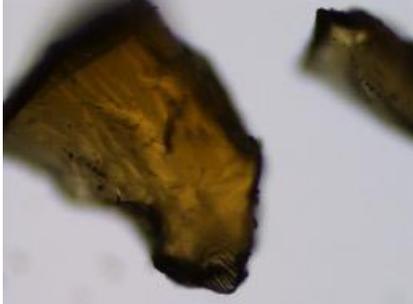
					
		epi-fluorescenza G-2A, 10X	epi-fluorescenza B-2A, 10x		
81	Benzoin				Un pezzo compatto e minuscoli frammenti leggermente appiccicosi. Colorazione bruno-rossastra. La superficie è scabrosa, sembrano essere presenti dei micro-inclusi di colore più scuro.
		fotografia in luce trasmessa	Fotografia in luce trasmessa	Fotografia in luce trasmessa 50x	
					
		epi-fluorescenza UV-2A, 10X	epi-fluorescenza G-2A, 10X	epi-fluorescenza B-2A, 10x	

88	Gomm Gutt.				<p>Corpo di dimensioni maggiori e frammenti di forma triangolare. Superficie abbastanza liscia, ma all'interno sembrano essere presenti piccole bolle. Colorazione bruno-giallastra.</p>
111	Gum Dragant.				<p>Frammenti di notevoli dimensioni rispetto ai frammenti descritti in precedenza. Superficie poco uniforme e rugosa in cui sembra accumularsi della polvere (anche spolverando con il pennello non si riesce a rimuoverla).</p>
119	Res. Guajac				<p>Piccoli frammenti alcuni sono traslucidi, altri presentano un velo opaco. Sono di diversa forma e colore (bruno, bruno-rossastro, rosso-giallastro, grigiastro e trasparente). Leggermente appiccicosi.</p>

					
		epi-fluorescenza G-2A, 10X	epi-fluorescenza B-2A, 10x		
193	Guiaco Resin				Frammenti minuscoli (μm) di forma e colore diverso: alcuni sono allungati e sottilissimi, somigliano quasi a scaglie, altri sono più simili a dei parallelepipedi. Variano dal color bruno-rossastro al giallastro, alcuni sono leggermente opachi, altri traslucidi. Tutti presentano all'interno delle micro-bolle. Sono leggermente appiccicosi.
		fotografia in luce trasmessa	epi-fluorescenza G-2A, 10X		
					
		Fotografia in luce trasmessa 50x	epi-fluorescenza G-2A, 50X		

130	Gum. Lacc				Resto unico, compatto e massiccio. Colorazione nera.
171	Sarcocoll				Un pezzo più grande e compatto accompagnato da minuscole scaglie. Superficie poco uniforme e rugosa di color bruno rossastro in cui sembra accumularsi della polvere provoca dei riflessi gialli (anche spolverando con il pennello non si riesce a rimuoverla). Le scaglie sono di color giallastro.
174	Balsam S.Ton				Scaglie irregolari di colore giallo chiaro quasi bianco e giallo intenso. Presentano delle bolle piccolissime all'interno e anche degli inclusi piccolissimi di colore leggermente più scuro. Sembrano avere una densità decisamente inferiore rispetto a quella degli altri campioni.

					
178	Sin Etiqueta				<p>Frammenti di colore bianco opaco dalla superficie scabrosa. Nelle scanalature si insinua una polvere nera che ormai è inglobata del campione.</p>
					
		fotografia in luce diffusa	epi-fluorescenza G-2A , 10x	epi-fluorescenza B-2A , 10x	
		fotografia in luce diffusa	epi-fluorescenza G-2A , 10x		

225	Sin identificar				<p>Frammenti compatti di colore giallastro dalla superficie abbastanza liscia e leggermente opaca, sono leggermente appiccicosi e all'interno sono presenti delle bolle e due inclusi rossastri.</p>
		<p>fotografia in luce diffusa</p> 	<p>fotografia in luce trasmessa</p> 	<p>epi-fluorescenza G-2A , 10x</p>	
232	Resin Scamon				<p>Frammenti irregolari di colore bruno con qualche riflesso giallo-verdastro, presentano un leggera opacità superficiale</p>
		<p>fotografia in luce trasmessa</p>			

3.1.8 Riflettanza diffusa dei campioni organici Resine o gomme

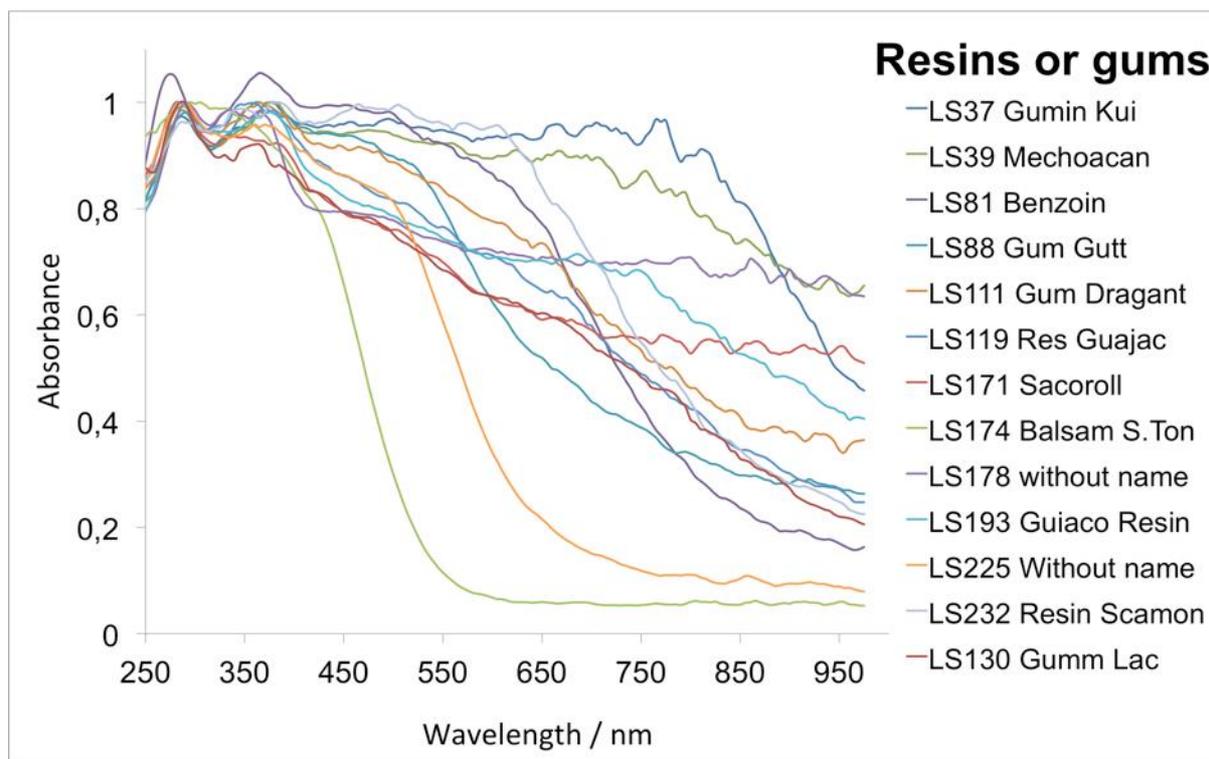


Figura 5: Sovrapposizione dei campioni organici resine o gomme

Tabella 9: Assorbimenti relativi ai campioni appartenenti alla sottoclasse delle resine o gomme

Numero e nome del campione	Lunghezza d'onda (nm)
LS37 Gumin. Kui.	270, 360, 755, 800 (flesso) nm
LS39 Resin Mechioar	270, 360 740 nm
LS81 Benzoin	270, 355, 490, 610 (flesso) nm
LS88 Gum. Gutt.	270, 345, 505 (flesso) nm
LS111 Gum. Dragant.	270, 345 (635) nm
LS119 Res. Guajac	270, 335 nm
LS130 Gum. Lacc.	265, 345, 465 nm
LS171 Sarcocoll	270, 360 (flesso), (485) nm
LS174 Balsam S.Ton	285 nm
LS178 Sin Etiqueta	275, 315, 345, 470, 775, 850, 880, 910 nm
LS193 Guiaco Resina	270, 350 nm
LS225 Sin Identificar	270, 350, 485 (flesso) nm

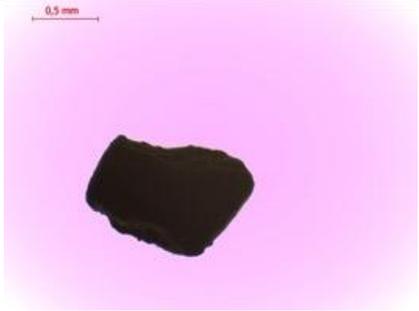
I campioni che appartengono alla categoria Resine sembrano essere tutti composti con catene coniugate o gruppi aromatici perché tutti (tranne il campione LS174) presentano tante bande di assorbimento, anche nell'area visibile [2].

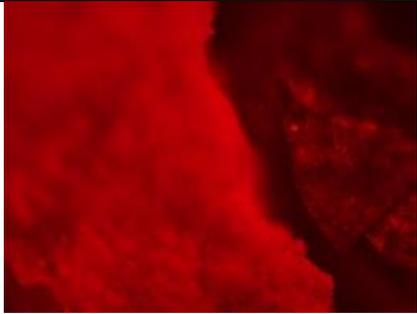
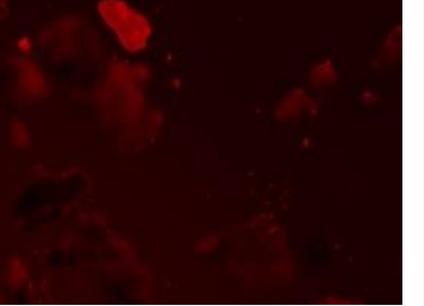
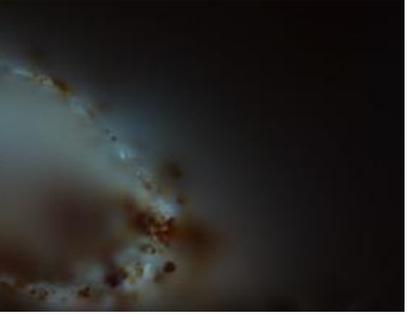
Lo spettro dei campioni LS178 Sin etiqueta, LS130 Gum Lacc. e LS171 Sarcocoll è praticamente piatto, probabilmente perché sono di colore nero.

Alcuni campioni presentano assorbimenti simili tra loro, per questo nella tabella numero 9 vengono usate diverse colorazioni. È necessario dire che per questo gruppo gli spettri sono piuttosto rumorosi, una spiegazione potrebbe essere dovuta al fatto che nella maggior parte dei casi i pezzettini dei campioni non sono di così grandi dimensioni da riuscire a coprire tutto lo spot di misura e anche mettendo più pezzi vicini non si riusciranno mai coprire tutti gli spazi vuoti. Nemmeno tritutando i campioni si è riuscito a raggiungere un risultato migliore.

3.1.9 Microscopia ottica e a fluorescenza sui campioni appartenenti alla categoria Lipidi e misti

Tabella 10: Immagini scattate con il microscopio a fluorescenza dei campioni organici appartenenti alla categoria lipidi e misti

LIPIDI E MISTI			
Numero campione	Nome campione	Foto	Descrizione
139	Sen Synap. Alb.	 <p>fotografia in luce trasmessa</p>	Forma rotonda, di colore marrone chiaro. Sembra trattarsi davvero di un seme.
26	Bezoar	   <p>fotografia in luce trasmessa fotografia in luce trasmessa, 10x epi-fluorescenza G-2A, 10x</p>	Piccoli frammenti irregolari di colore bruno.

					
59	Lans fer rubr				<p>Frammenti irregolari dell'ordine di grandezza dei mm. Colore bruno, superficie scabrosa da un lato più butterata rispetto all'altro.</p>
					
		epi-fluorescenza B-2A, 10x	epi-fluorescenza B-2A, 50x		

142	Babam odintalg		<p>Frammenti di color bruno-rossastro, presentano una leggera opacità. La superficie è scabrosa. Presenza di probabili bolle interne</p>
67	Croc. Mart. Ap.		<p>Tanti frammenti separati dell'ordine dei μm che sembrano essere la cuticola di un insetto.</p>

3.1.10 Riflettanza diffusa dei campioni organici Lipidi e misti

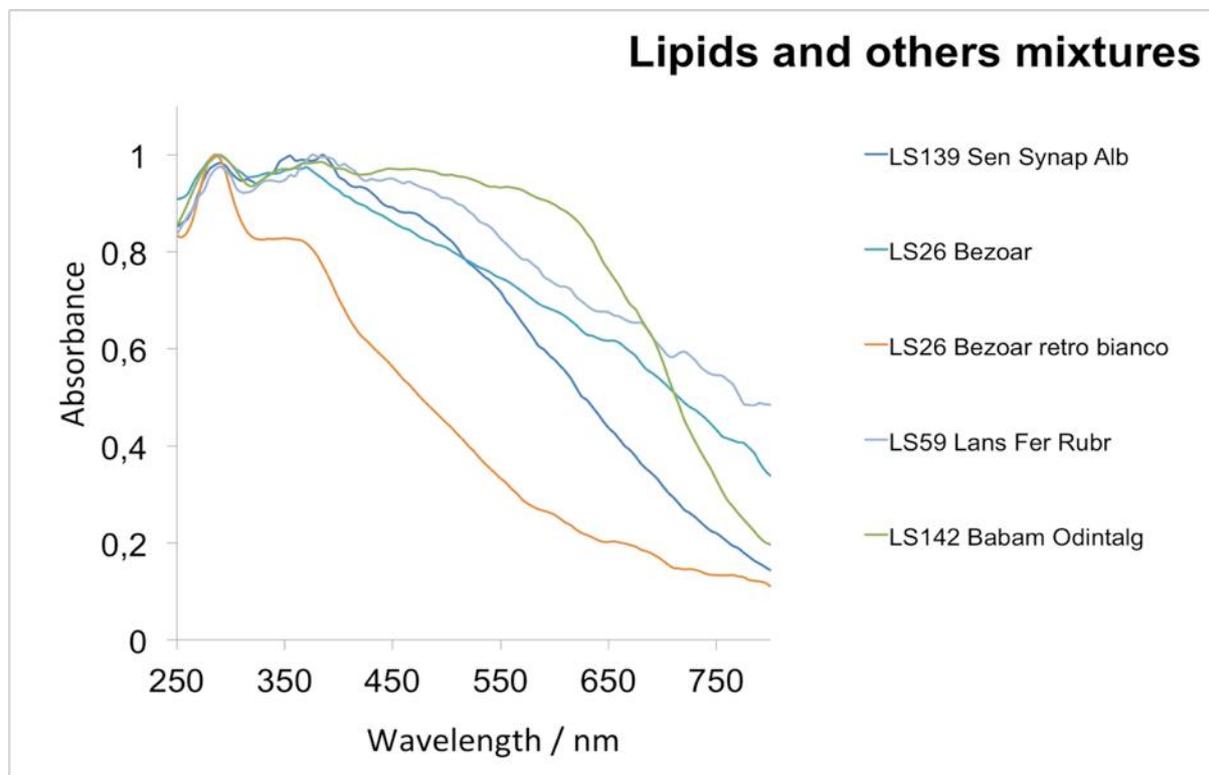


Figura 6: Sovrapposizione dei campioni organici lipidi o misti

Tabella 11: Assorbimenti relativi ai campioni appartenenti alla sottoclasse dei lipidi o misti

Numero e nome del campione	Lunghezza d'onda (nm)
LS139 Sen Synap Alb	275, 340, 370, 410 (flesso), 640 (flesso) nm
LS26 Bezoar	270, 355 (flesso) nm
LS59 Lans fel Rubr	275, (315), 360, 455, 655 nm
LS142 Babam Odintalg.	275, 595 nm
LS67 Insect	275, (353, 505, 590) nm

È necessario dire che lo spettro di riflettanza diffusa registrato analizzando il campione LS67 non può essere interpretato perché lo spettro registrato non è quello veritiero dato che il campione è troppo piccolo rispetto alla dimensione del punto di misurazione dello strumento. In generale i campioni di questa categoria non sembrano presentare caratteristiche in comune.

3.2 Indagine chimico-fisica

In questa sezione sono riportati i risultati ottenuti tramite spettroscopia infrarossa (FT-IR), tecniche cromatografiche (quali la IT-SPME-CapLC-DAD e la GC-MS) e la risonanza magnetica nucleare (NMR). L'utilizzo di queste tecniche in maniera complementare è stato utile per studiare in maniera più approfondita i campioni provenienti dall'antica spezieria della scala.

Come già detto, si tratta di medicinali e di conseguenza di campioni in miscela, estremamente complessi, diversi l'uno dall'altro sia per morfologia che per colore, ognuno conservato in un contenitore differente con nomi diversi riportati sull'etichetta che non sempre evocano immediatamente un'assonanza con una sostanza organica naturale.

Si è deciso di inserire in questa sezione gli spettri IR per fornire tutte in una volta le informazioni relative al campione in esame, anche se sono stati fin dall'inizio di questo studio d'importanza fondamentale per suddividere i campioni nelle varie sottoclassi.

3.2.1 Vegetali e Carboidrati

Considerando i risultati ottenuti mediante le analisi preliminari sui campioni appartenenti alla categoria vegetali e carboidrati, in questa sezione saranno discussi i risultati ottenuti tramite indagine spettroscopica e cromatografica. La tecnica IT-SPME-capLC-DAD è stata impiegata per la prima volta per indagare antichi medicinali.

3.2.1.1 Spettroscopia infrarossa (FT-IR)

Gli spettri all'infrarosso sono stati registrati per ogni campione delle sottocategorie vegetali e carboidrati. L'interpretazione degli spettri dei composti organici risulta molto complicata perché si tratta di molecole complesse che generano diversi picchi attribuibili a differenti sostanze, in questo caso però la maggior parte dei campioni sembra essere confrontabile.

Di seguito sono riportati gli esempi più lampanti per entrambe le categorie (Figure 7 e 8) seguiti da una tabella riassuntiva in cui sono riportati i gruppi funzionali.

Gli spettri sono stati registrati in parte in Francia presso il Laboratoire d'archéologie moléculaire et Structurale (LAMS), Sorbonne Universités, UPMC, Paris, Francia ed in parte registrati presso il Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, Spagna.

LS7 Estratto di Coca (vegetali)

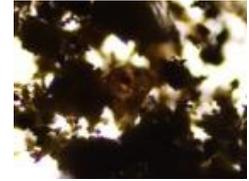
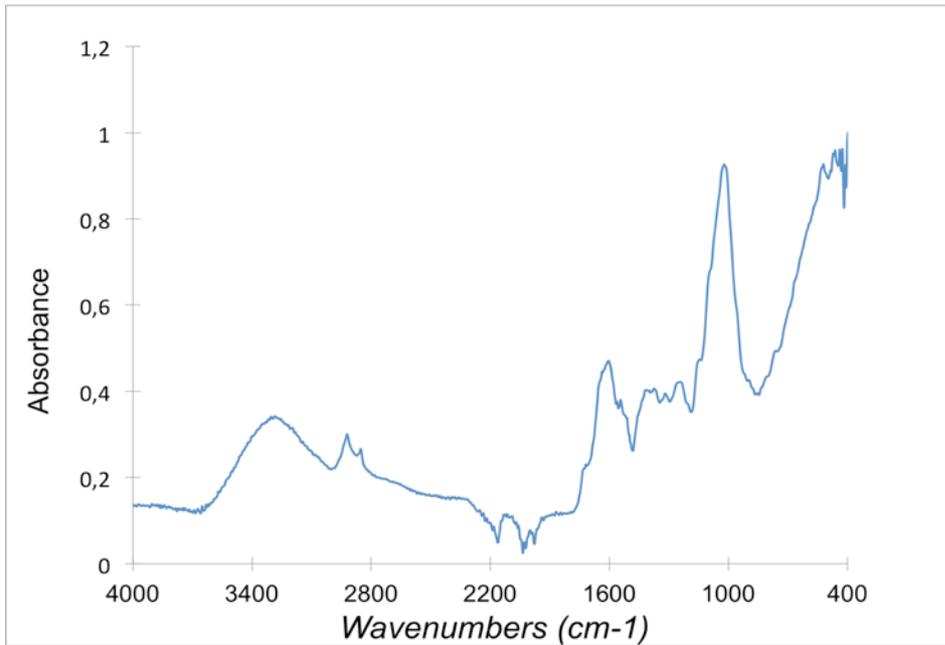


Figura 7: Spettro FTIR-ATR del campione LS7 Estratto di Coca registrato presso l'UV

LS63 Diagrid (Carboidrati)

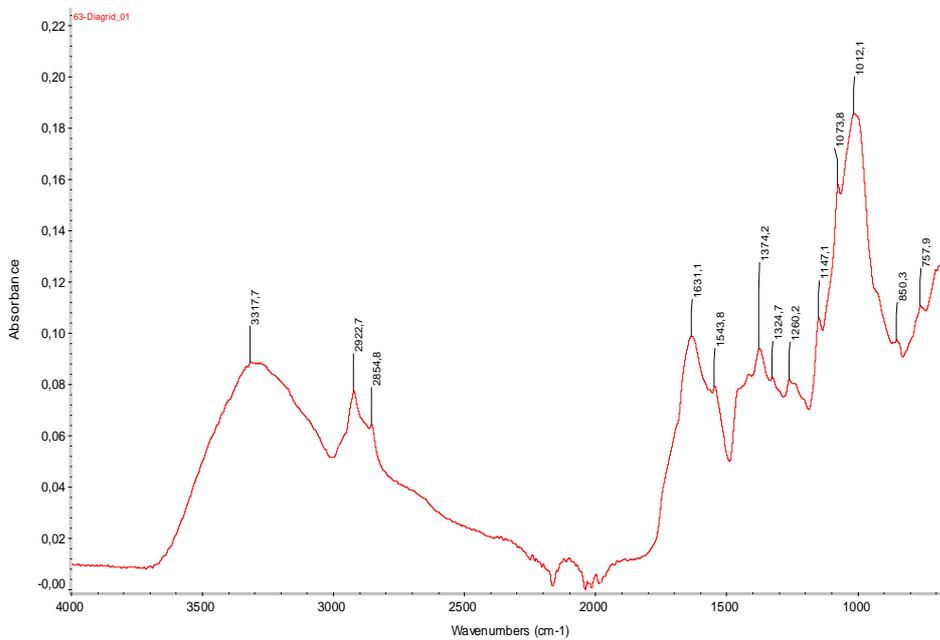


Figura 8: Spettro FTIR-ATR del campione LS63 Diagrid, registrato presso il LAMS

Tabella 12: Tabella riassuntiva in cui sono riportati i gruppi funzionali relativi alla presenza di amido

	Gruppi funzionali con relative lunghezze d'onda (cm ⁻¹)					
	ν O-H	ν C-H	ν C=C	δ -C-O-H	ν C-O or C-C	δ OOP =C-H
Amido	3266	2912, (2886)	1637	1428, 1398, 1338	1234, (1200), 1148, 1077, 988, 924	846, 757, 704
LS5 tinct cascarilla (V)	3255	2921	1600 1544 1522 1510	1421, 1365, 1315	1257, 1147, 1020	892 757
LS101 cascarilla (V)	3324	2921, 2850	1611 1511	1421, 1365, 1315	1240, 1021	874 823 778
LS7 E.coca (V)	3274	2916, 2845	1704, 1596, 1540	1387, 1361, 1305	1230, 1133, 1088, 1010	
LS27 Diapenthe (V)	3280	2925	(1724), 1612 1417	1370, 1317	1238, 1143, (1074), 1012	
LS56 Gran Paradis (V)	3280	2927, 2858	1594 1563 1545 1510 1421	1375	1148, 1102, 1076, 991	926, 858, 760, 704
LS198 Fung Malit (V)	3265	2926	(1699, 1648), 1619 1559,1542, 1522,1511 1435 1419	1363, 1319	1202, 1152, 1022	876, 760
LS192 Anis Stellat (V)	3260	2912, 2849	1592 1510	1368	1204, (1081), 1003	947
LS63 Diagrid (C)	3317	2922, 2854	1631 1543	1374, 1324	1260, (1147, 1073), 1012	
LS92 Mechoacan (C)	3259	2922	1617	1411, 1365	1147, 1076, 991	857, 758
LS141 Paolinia (C)	3278	2925	1695 1625 1553 1519	1440, 1362	1285, 1239, 1146, 1077, 996	857, 760

Per quanto riguarda i campioni LS5 tinct. Cascarilla (V), LS101 cascarilla (V), LS7 E.coca (V), LS27 Diapenthe (V), LS56 Gran Paradis (V), LS198 Fung Malit (V), LS192 Anis Stellat (V), LS63 Diagrid (C), LS92 Mechoacan (C) e LS141 Paolinia (C) si può dire che presentano tutti uno spettro di forma simile (cfr. Appendice 1), paragonabile a quello dell'amido. L'intensità notevole dei picchi che cadono tra i 1025 e i 990 cm⁻¹ ha portato a pensare a questa corrispondenza. Eseguendo il confronto con gli standard (sia quello dello standard registrato in laboratorio presso il Departamento de Química Analítica de la UV, sia gli spettri standard presenti nei database online quali *IRUG* e *ATR-FT-IR spectra of conservation-related materials in the MID-IR and FAR-IR region* [3, 4] sembra davvero che il composto prevalente nei campioni della farmacia sia amido. Questa supposizione però deve essere confermata eseguendo altre tipologie di analisi.

Nella seguente tabella (Tab. 13) sono riportati i risultati delle analisi eseguite tramite spettroscopia infrarossa di tutti i campioni appartenenti a queste categorie. Gli spettri sono riportati in Appendice 1.

Tabella 13: Risultati FTIR-ATR dei campioni Vegetali e Carboidrati

VEGETALI	
Numero e Nome campione	Possibili attribuzioni
LS5 Tinct. Cascarilla, LS101 Cascarilla, LS7 E.coca, LS27 Diapenthe, LS56 Gran Paradis, LS198 Fung Malit, LS192 Anis Stellat	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?
LS48 Mirabol Citrin	Carboidrato ? (Pochi picchi in comune con lo spettro dell'amido)
LS112 Santonico	Amido + gommoresina ? + sostanza estrattiva?
LS115 Lig Aloe, LS164 Lig. Aspal	Amido + Fenoli? Lignina? + cellulosa
LS227 Carb. Amm. Pyro oleos	Fenoli + ?
LS230 No se lee	?
CARBOIDRATI	
Numero e Nome campione	Possibili attribuzioni
LS63 Diagrid, LS92 Mechoacan, LS141 Paolinia	Amido + ?
LS103 Magist. Mart	Non presenta uno spettro simile a quello dell'amido Altra tipologia di glucide? Zucchero(=mono o disaccaridi)

È necessario confermare queste supposizioni eseguendo altre tipologie di analisi.

La probabile presenza dell'amido in questi composti potrebbe essere riconducibile al fatto che si tratta del carboidrato di riserva dei vegetali. Viene immagazzinato al loro interno in qualità di fonte energetica e poi viene sintetizzato per via enzimatica partendo dal glucosio che viene prodotto dalla fotosintesi clorofilliana [5].

3.2.1.2 Cromatografia liquida (IT-SPME-CapLC-DAD)

Com'è stato riportato in precedenza, solo le categorie dei campioni Vegetali e Carboidrati sono state selezionate tra tutti i campioni organici da analizzare attraverso la cromatografia liquida. Ciò è dovuto ai risultati ottenuti dalle analisi in microscopia a fluorescenza, dalla

spettrofotometria di riflettanza e dalla spettroscopia a infrarossi, poiché tutti sembravano contenere carboidrati. Trattandosi di composti con gli stessi gruppi funzionali, si può usare lo stesso metodo (preparativa e condizioni di eluizione) una volta messo a punto.

Inizialmente le analisi di separazione dei composti si sono concentrate solo sul campione LS7 estratto di coca per due motivi: A) era uno dei campioni il cui spettro infrarosso era confrontabile con quello dell'amido, B) il nome scritto sull'etichetta non era totalmente sconosciuto e di conseguenza era più facile reperire fonti bibliografiche. Sono state eseguite differenti prove per selezionare le condizioni di lavoro migliori. L'analisi è stata svolta mediante cromatografia liquida capillare a fase inversa accoppiata a un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a serie di diodi (IT-SPME-CapLC-DAD) perché permette di lavorare con molta acqua nella fase mobile in modo da individuare i composti più polari.

Le figure sottostanti (Figg. 9-25) sono utilizzate per visualizzare i risultati ottenuti attraverso la campagna condotta in cromatografia liquida. Queste figure sono seguite da una tabella (Tabella 14) nella quale i nomi dei campioni e i composti trovati sono rispettivamente sull'asse delle ascisse e su quello delle ordinate. I composti vengono identificati confrontando diversi parametri con gli standard: lo spettro UV-Vis e il tempo di ritenzione. il tempo di ritenzione rappresenta infatti il momento in cui appare il picco cromatografico, in questo momento viene registrato lo spettro UV-VIS del composto caratterizzato, per questo motivo il tempo di ritenzione è posto nell'intersezione delle variabili.

In accordo con la letteratura [6, 7, 8] si è deciso di iniettare standard di amido, di alcaloidi (cocaina, caffeina e acido clorogenico) e dei loro sottoprodotti (acido benzoico e acido cinnamico).

Non è stato possibile iniettare trans-cinnamoilcocaina e turxilina perché essendo gli alcaloidi più abbondanti nelle foglie di coca sono molto difficili da reperire.

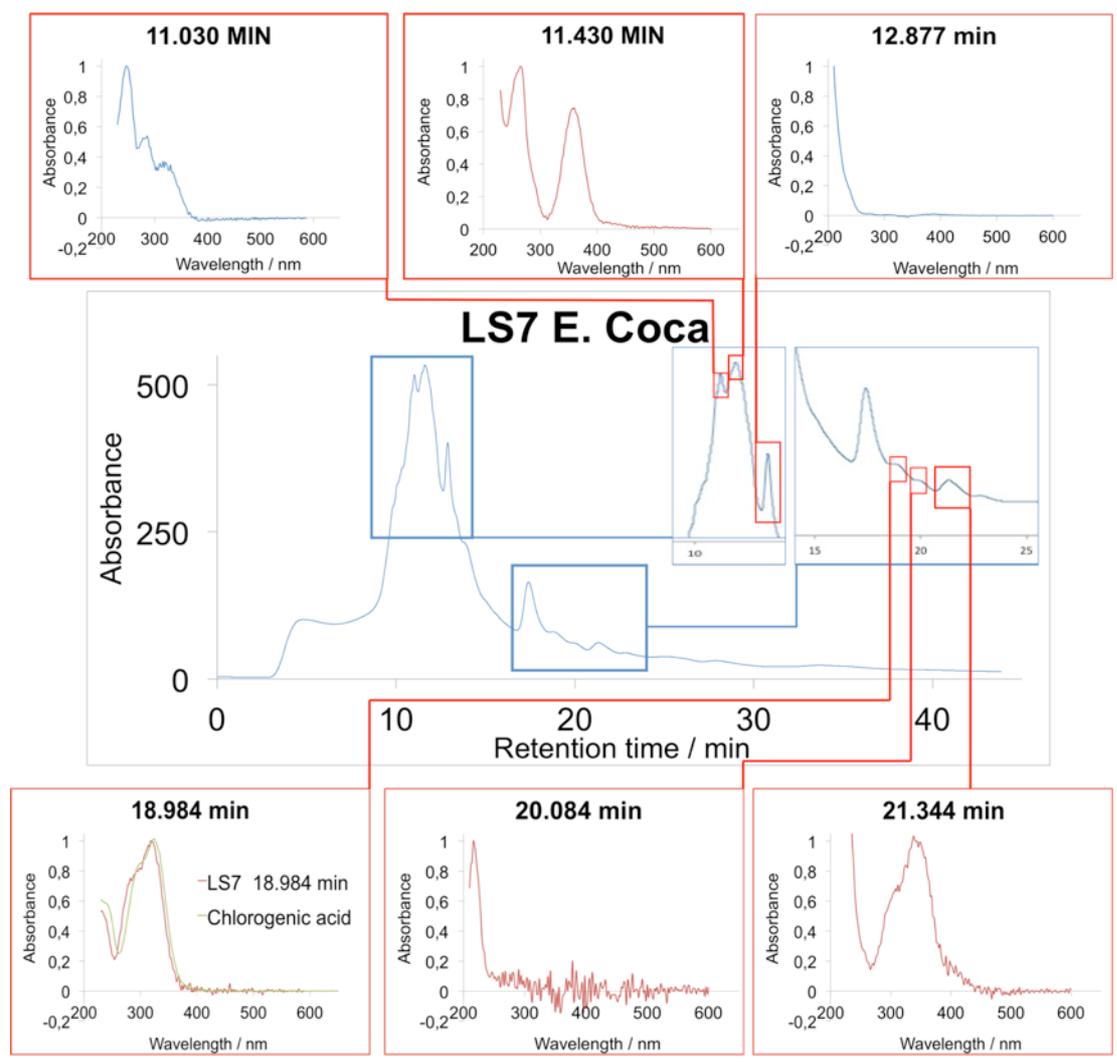


Figura 9: IT-SPME_CapLC-DAD del campione LS7

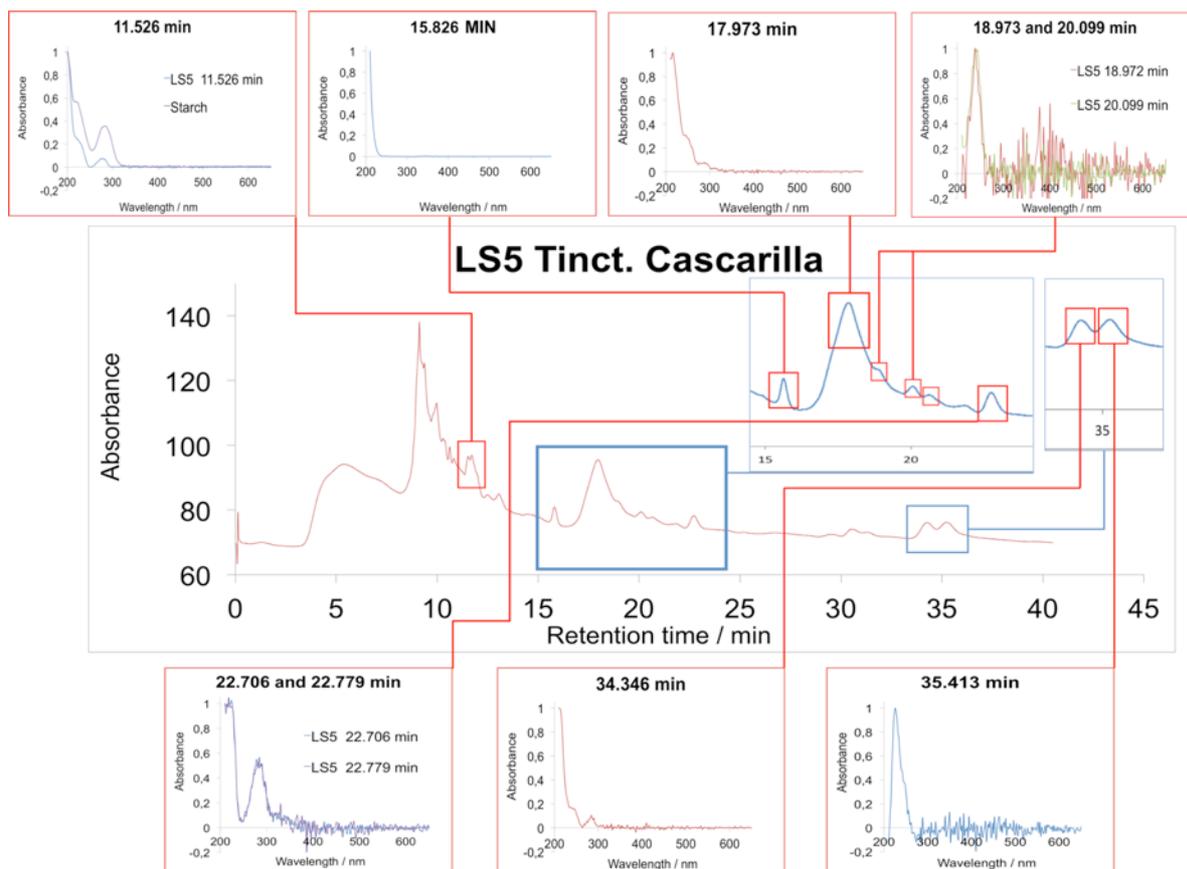


Figura 10: IT-SPME_CapLC-DAD del campione LS5

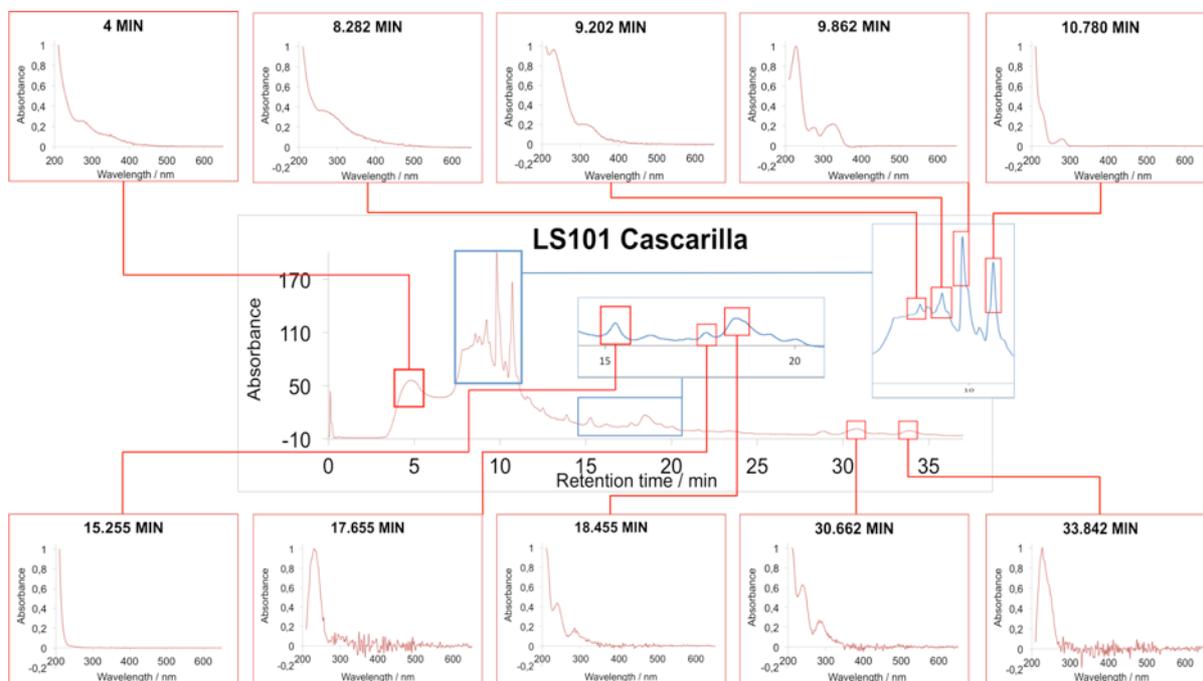


Figura 11: IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS101

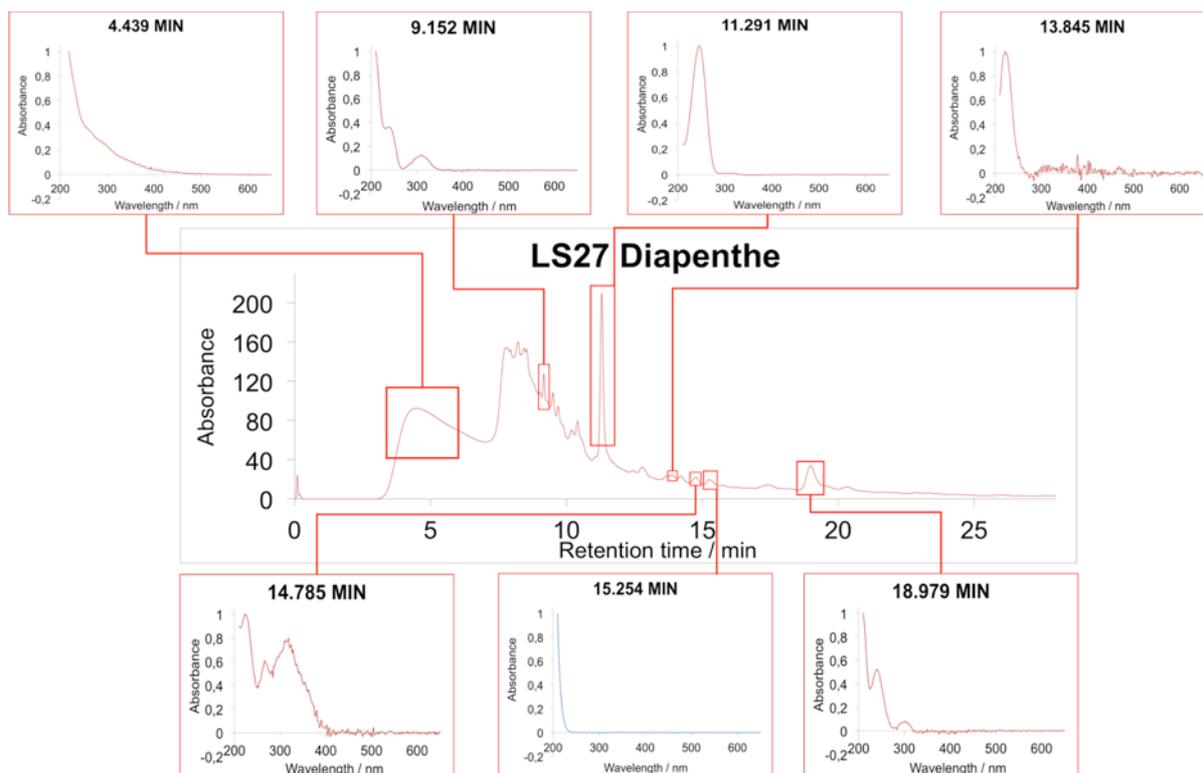


Figure 12: IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS27

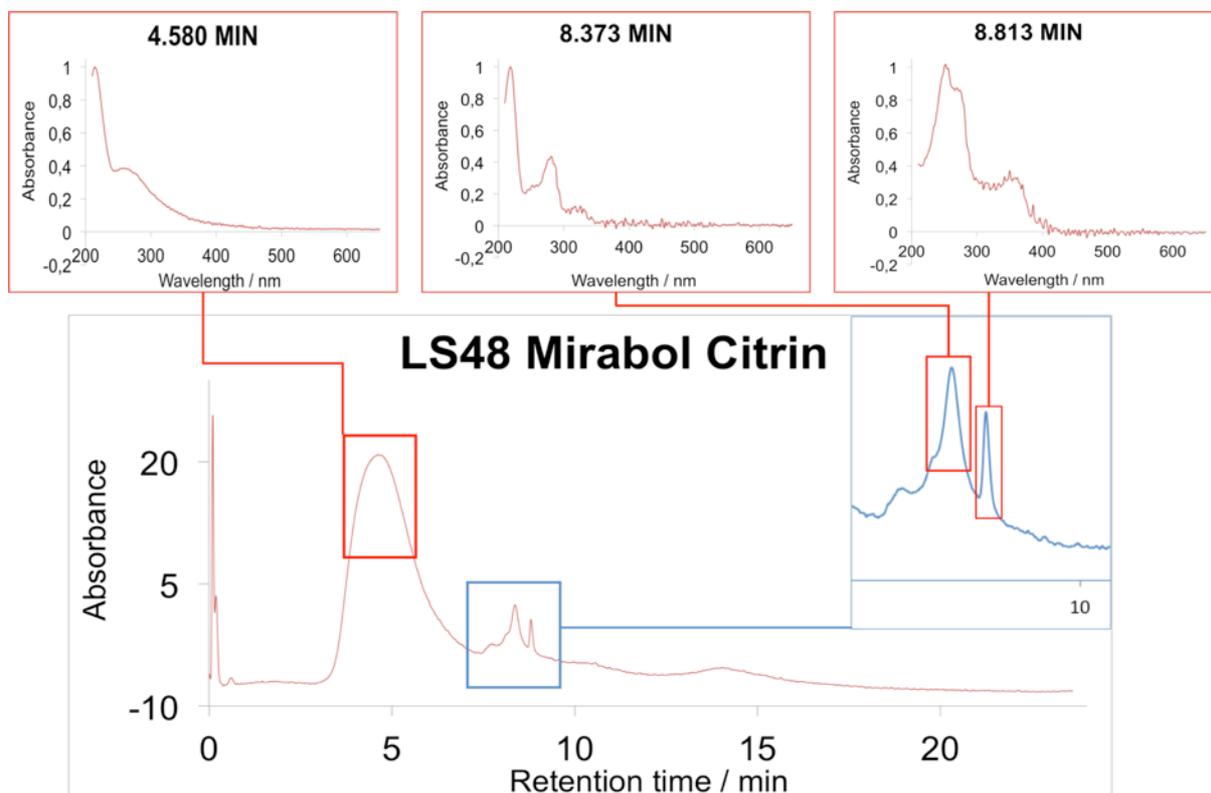


Figure 13: IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS48

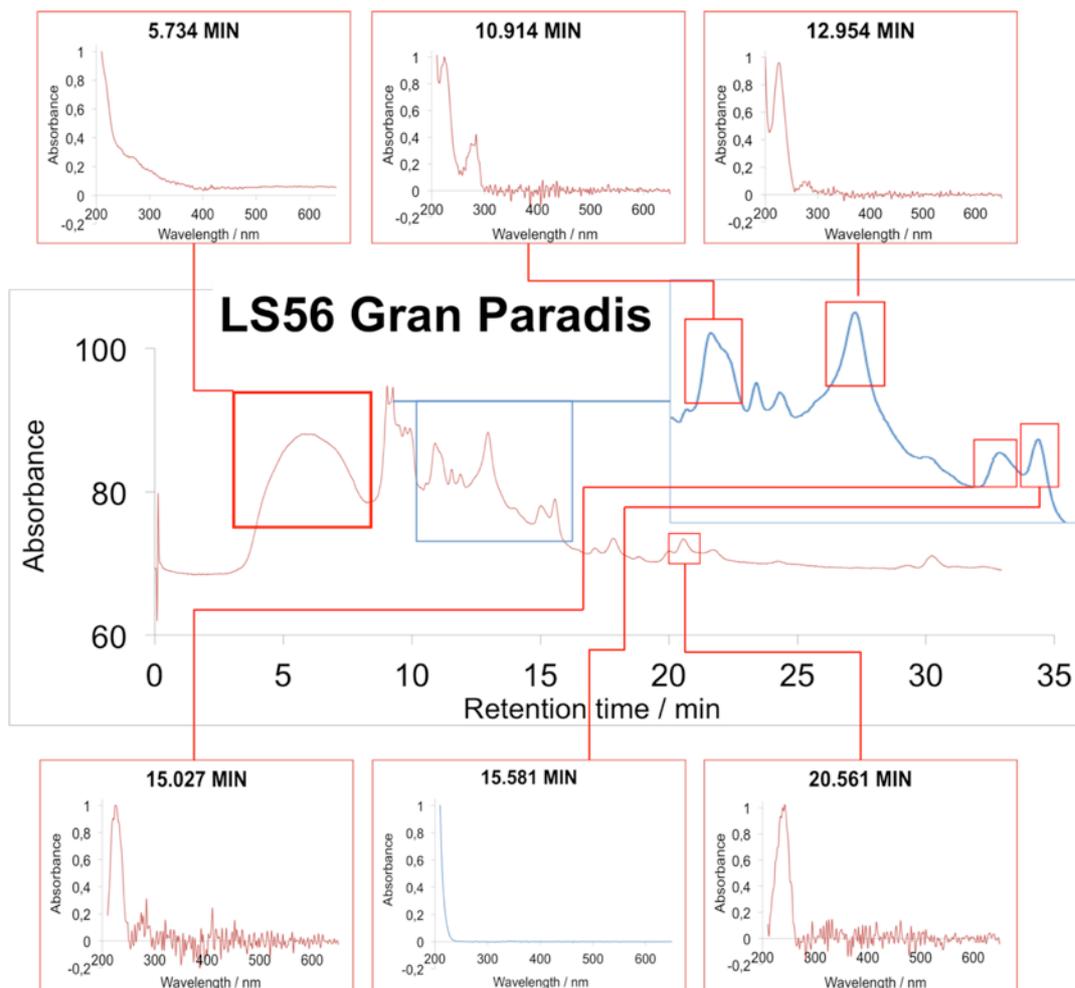


Figure 14. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS56

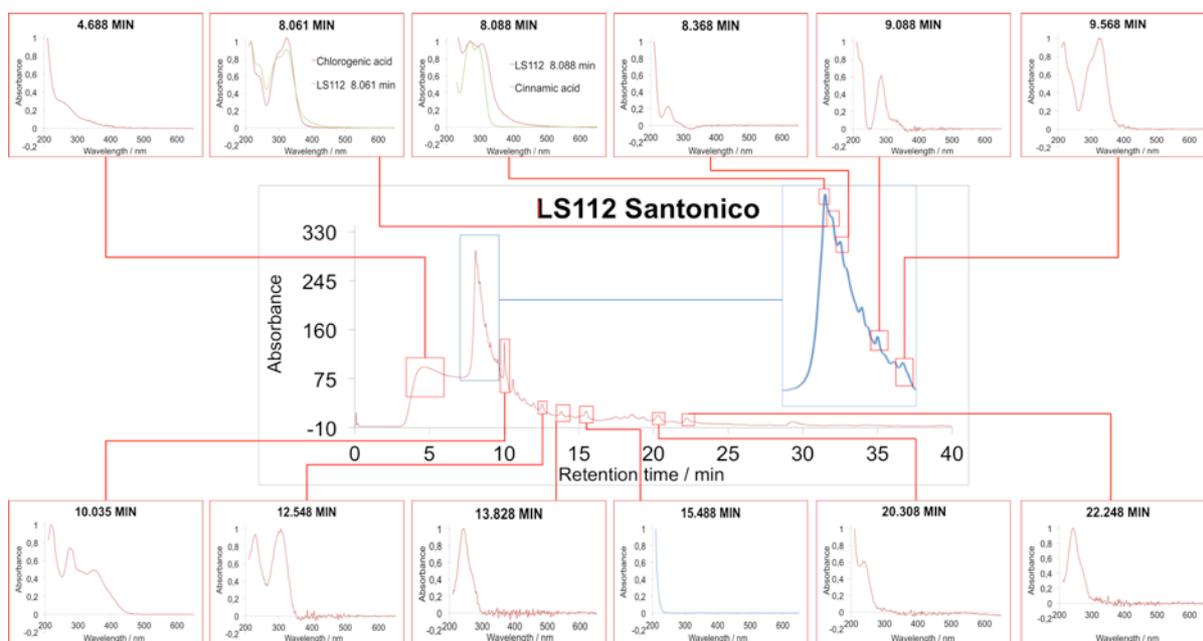


Figure 15. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS112

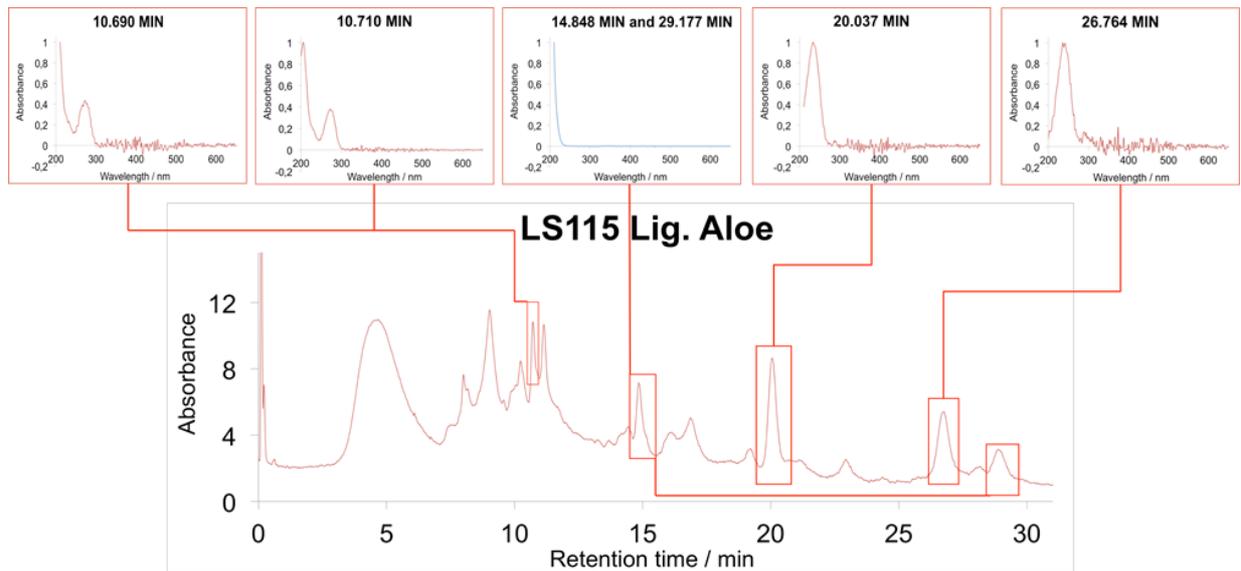


Figure 16. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS115

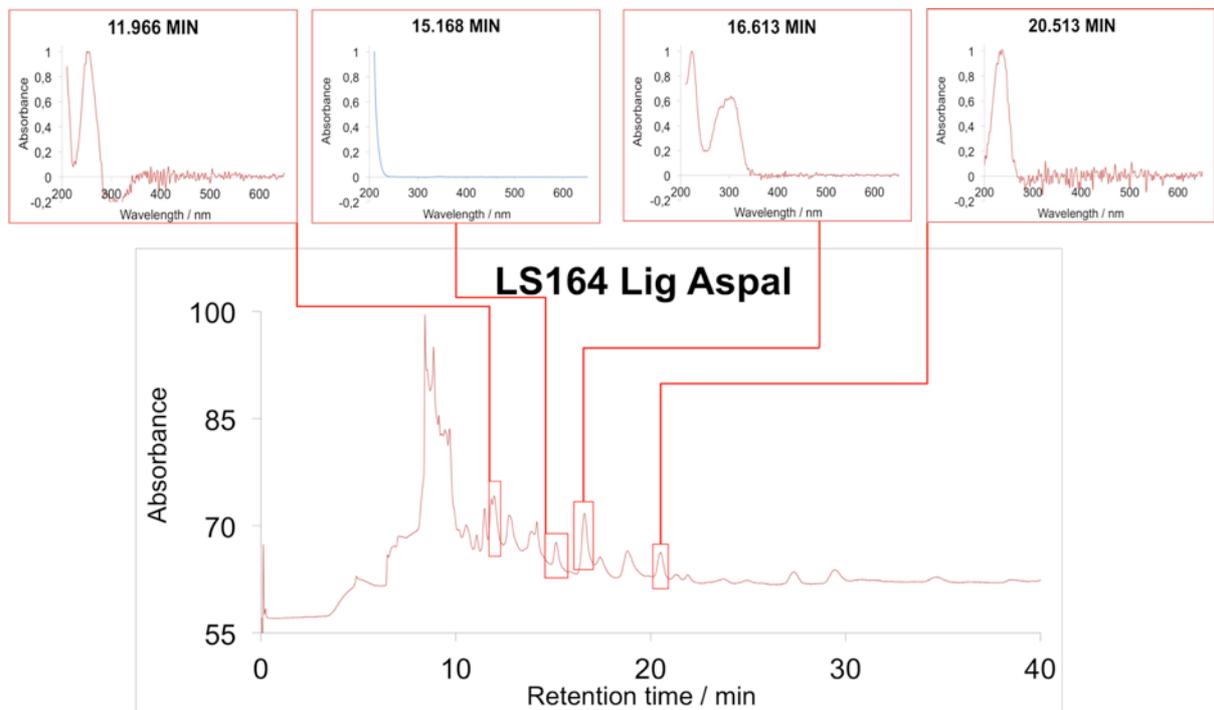


Figure 17. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS164

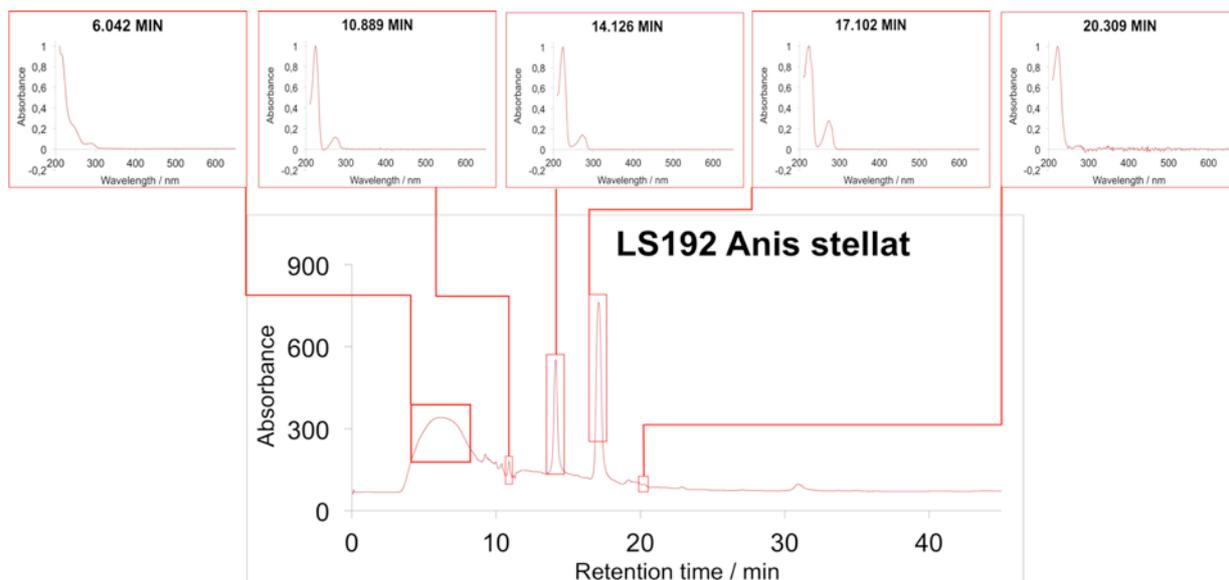


Figure 18. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS192

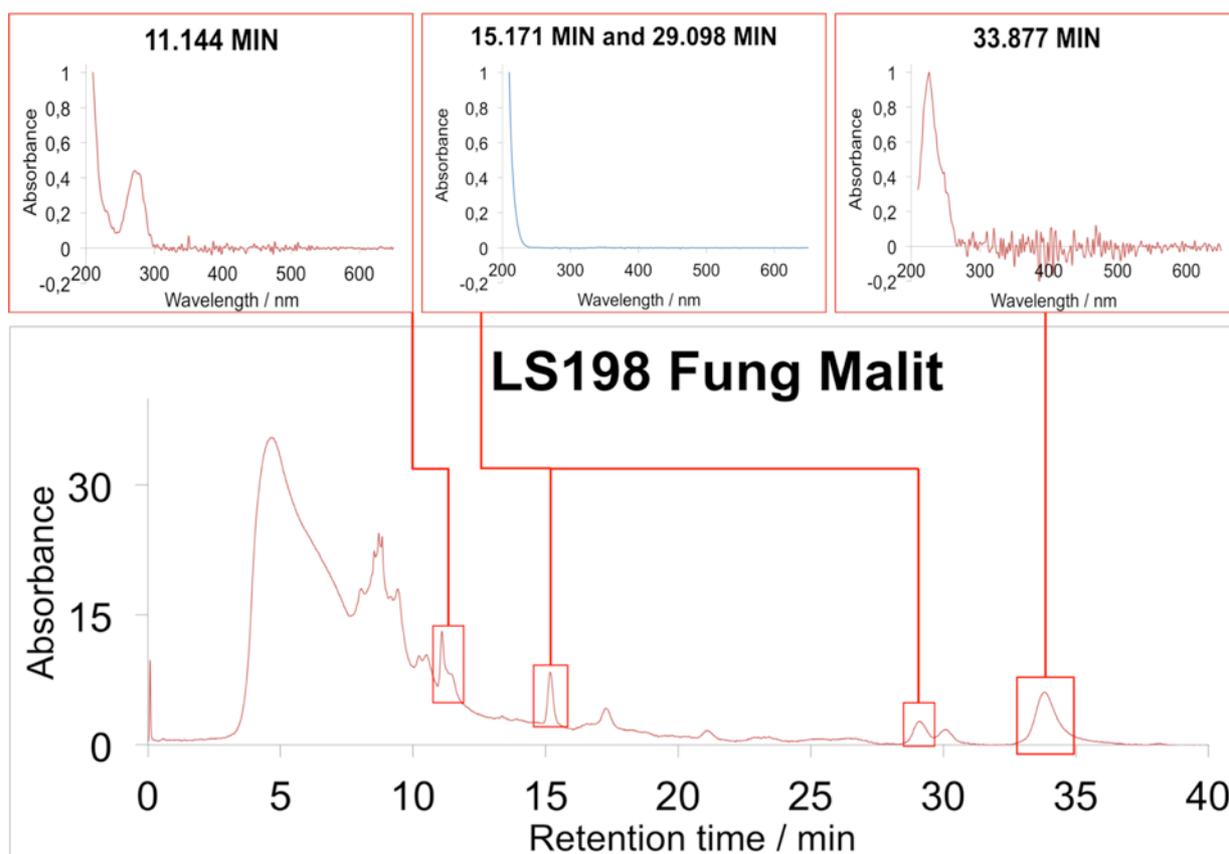


Figure 19. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS198

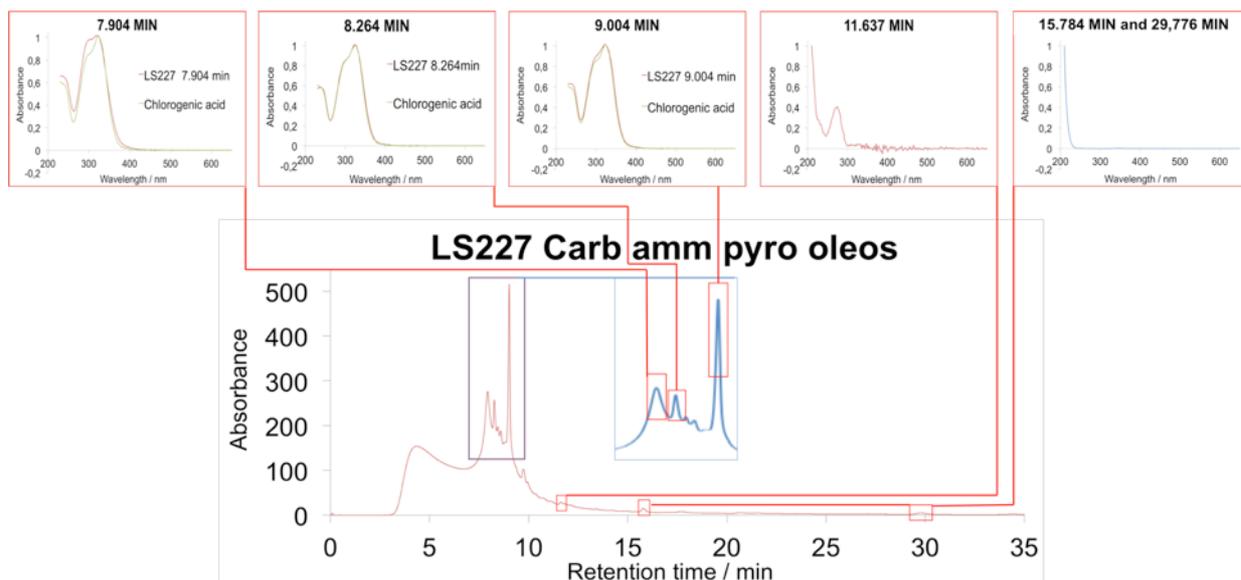


Figure 20. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS227

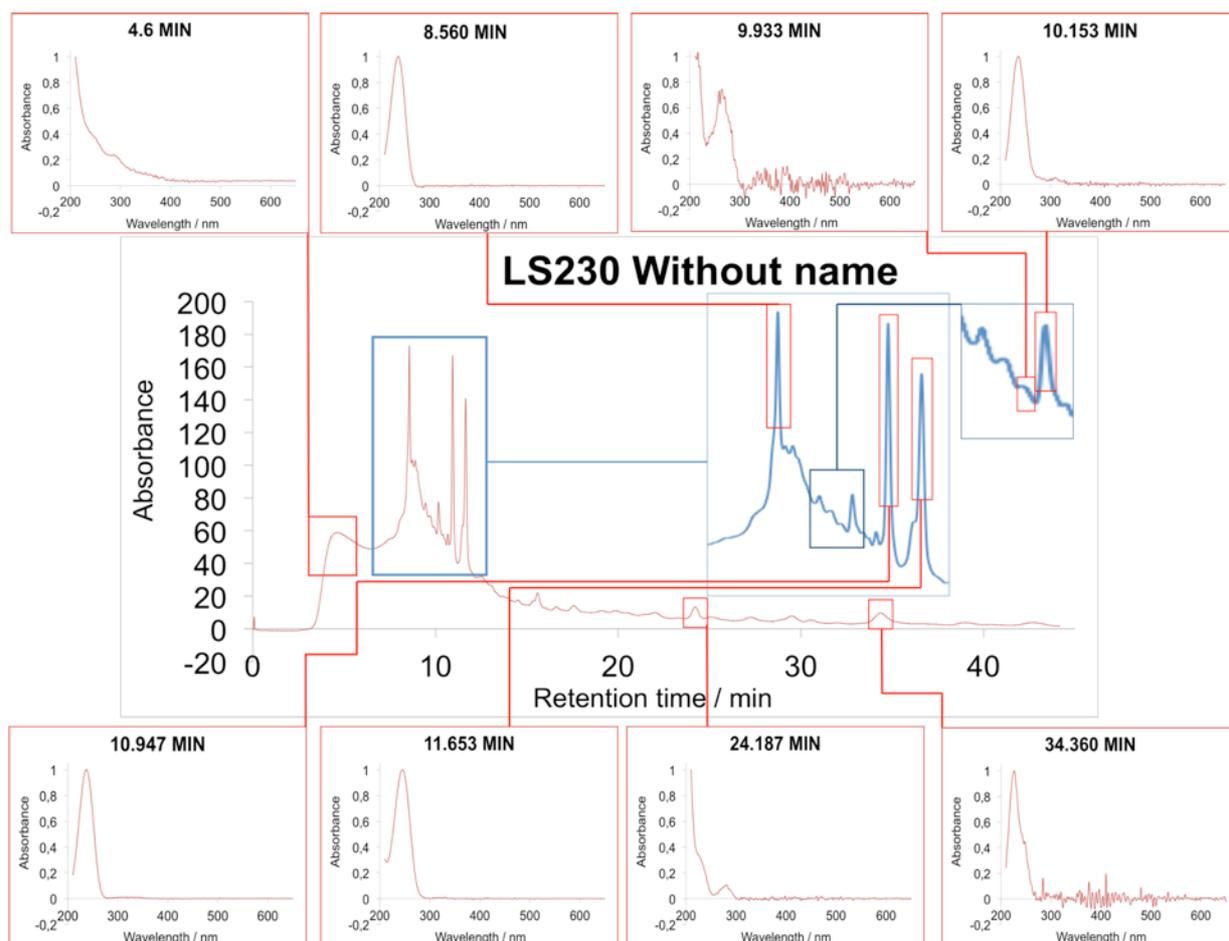


Figure 21. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS230

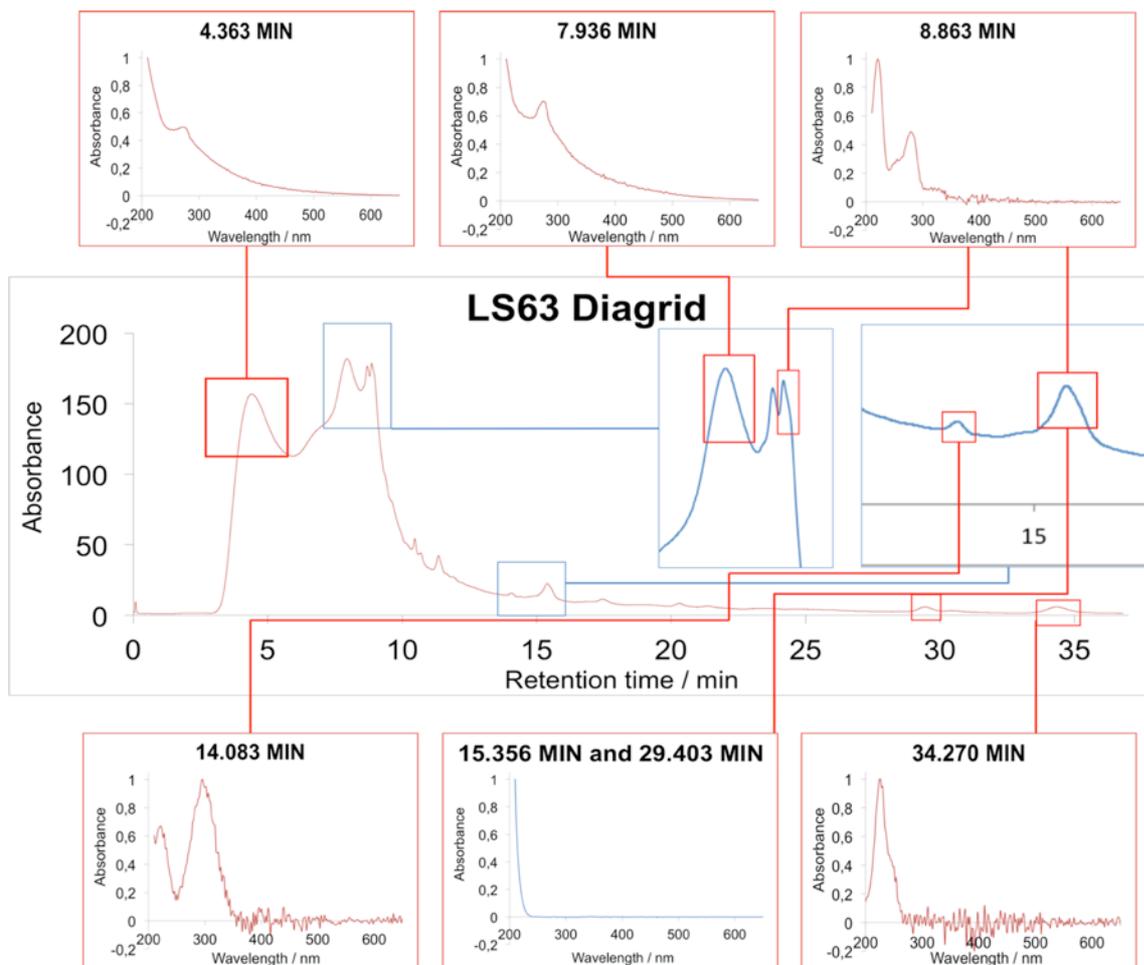


Figure 22. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS63

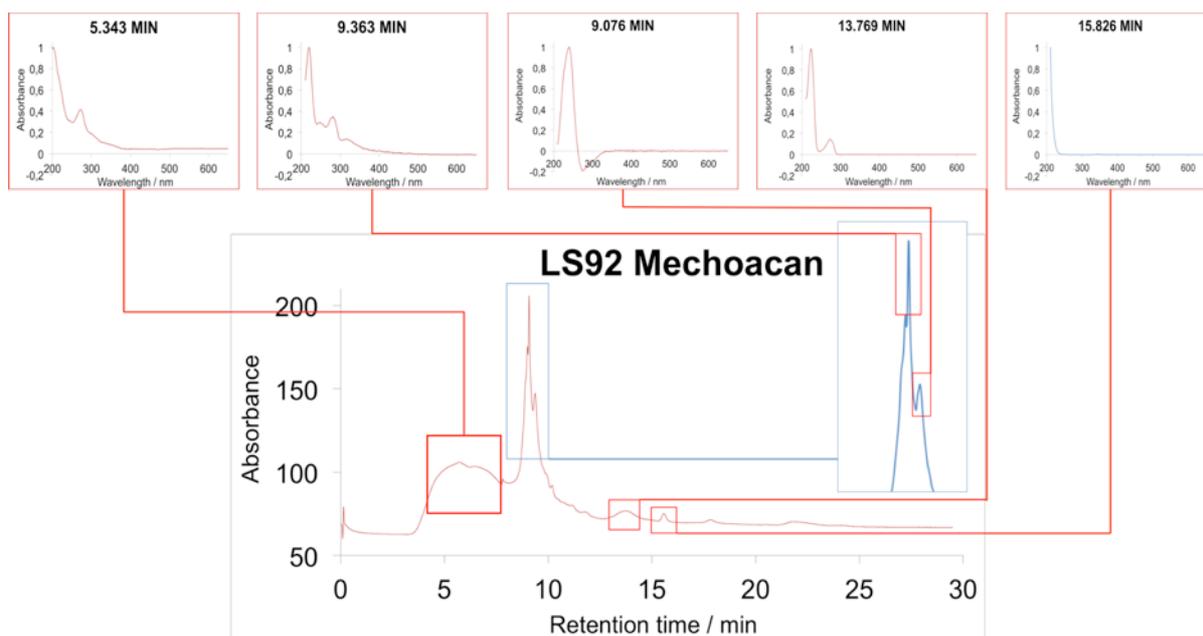


Figure 23. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS92

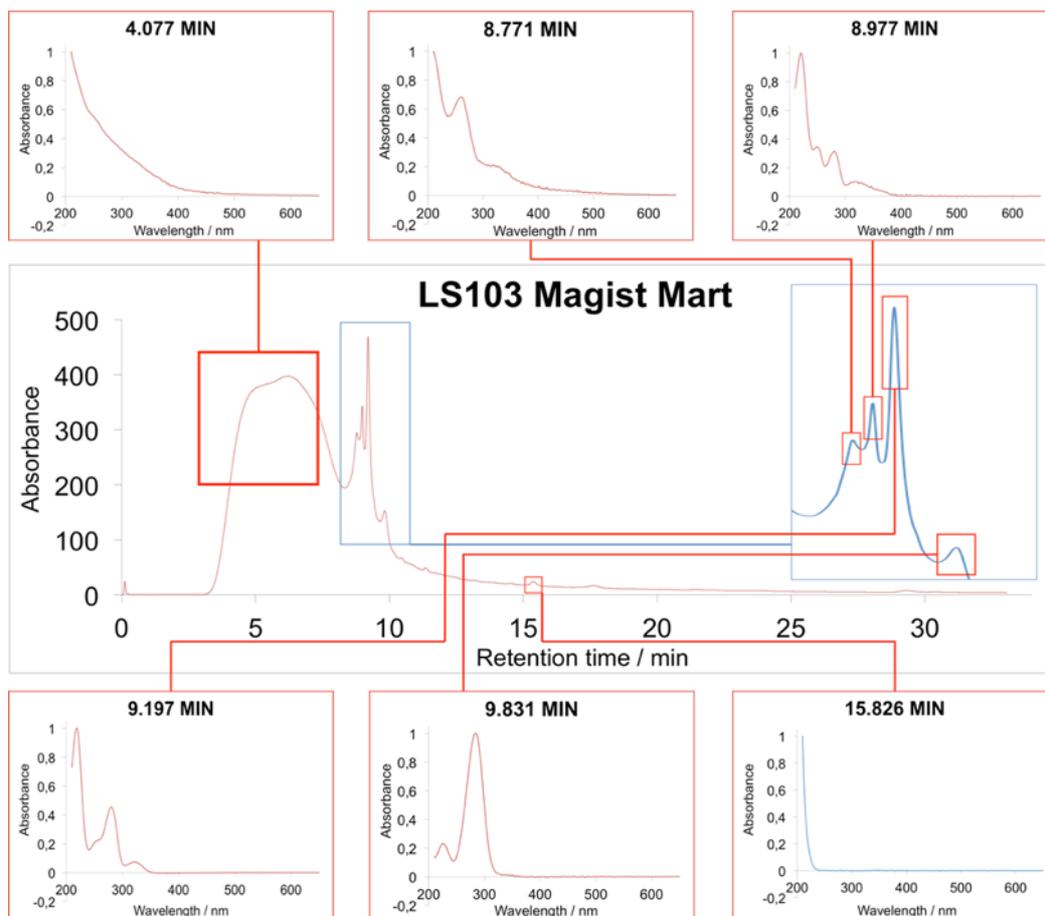


Figure 24. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS103

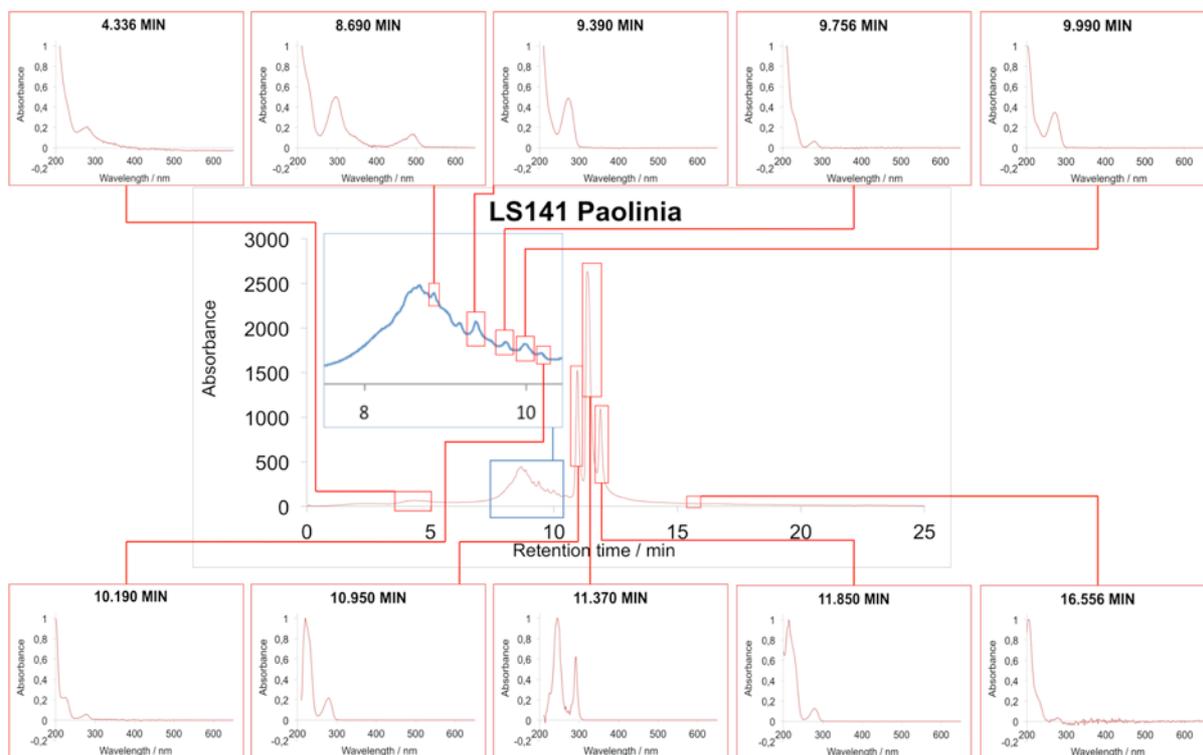


Figure 25. IT-SPME-CapLC-DAD del campione LS141

Tabella 14: Tabella riassuntiva che mostra i composti identificati mediante IT-SPME-CapLC-DAD

Samples names → Compounds	LS7 E.coca	LS5 Tinct. Cascarilla	LS101 Cascarilla	LS27 Diapenthe	LS48 Mirab Citrin	LS56 Gran Paradis	LS63 Diagrid	LS92 Mechoacan	LS103 Magist Mart.	LS112 Santonico	LS115 Lig. Aloe	LS141 Paolinia	LS164 Lig. Aspal	LS192 Anis Stellat	LS198 Fung Malit	LS227 Carbamm pyroleos	LS230 No se lee
Clorogenic Acid	18.984min (24.05.18)															8.264 min	
Clorogenic Acid Family	Shift UV-vis spectrum 16.467m(08.06.18)									8.061 e 9.569 min						7.904 9.004 min	
Starch 1		11.526 min															
Starch 2	12.877 min (24.05.18)	15.826 min	15.255 28.815 min	15.254 min		15.581 min	15.356 29.403 min	15.826 min	15.826 min	15.488 29.301 m	14.848 29.177 min	15.598 29.663 min	15.188 min		15.171 19.096 min	15.784 29.776 min	
Starch 3		22.706 22.779 m															
Fenol family						10.914 m		13.769m				10.950min		10.889 14.162 17.102 min			

Tabella 14 continua

Samples names → Compounds	LS7 E.coca	LS5 Tinct. Cascarilla	LS101 Cascarilla	LS27 Diapente	LS48 Mirab. Citrin	LS56 Gran Paradis	LS63 Diagrid	LS92 Mechoacan	LS103 Magist. Mart.	LS112 Santo- snico	LS115 Lig. Aloe	LS141 Paoli-nia	LS164 Lig. Aspal	LS192 Anis Stellat	LS198 Fung Malit	LS227 Carb amm pyro	LS230 No se lee
Cocaine						? 12.954 15.027m											
Cocaine family	? 10.862 11.882m (04.06.18)																
Benzoic Acid	14.929 min (08.06.18)																
Benzoic acid family	? 12.987 min (04.06.18)																
Cinnamic acid																	
Cinnamic acid family	Shift UV- vis spect 15.661m (08.06.18)									8.088 min							
Caffeine											10.690 10.719m	9.390 9.990min			11.144 min	11.637 min	

Come si può notare dai dati riportati in tabella 14, quasi tutti i campioni analizzati mediante cromatografia liquida sembrano contenere amido. I cromatogrammi dei campioni LS5, LS7, LS27, LS112, LS115, LS92, LS164, LS198 e LS227 infatti presentano un picco attorno ai 15 min a cui corrisponde lo spettro caratteristico dell'amido²⁴ che non assorbe a lunghezze d'onda maggiori di 250nm (Fig. 26). Solo all'interno dei campioni LS48 Mirabol Citrin, LS192 Anis Stellat e LS230 No se lee non è stata registrata a presenza di amido.

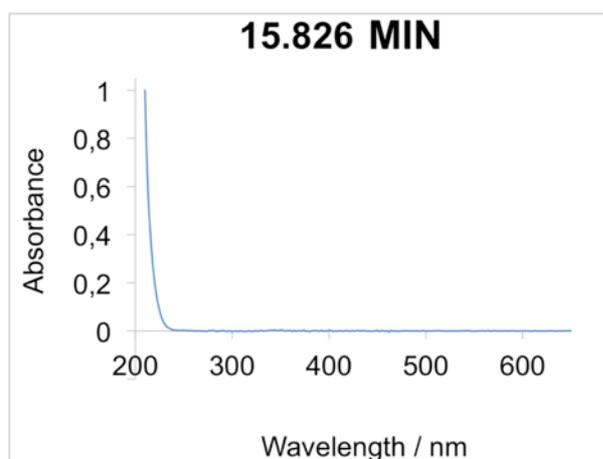


Figura 26: Spettro UV-Vis dell'amido

Ciò conferma le ipotesi formulate sulla base dell'identificazione dei gruppi funzionali e dell'identificazione dei massimi di assorbimento. La Figura 9 mostra il cromatogramma ottenuto per il campione LS7 e lo spettro registrato al massimo di ciascun picco cromatografico. Il picco a 16,5 min sembra corrispondere a quello dello standard di acido clorogenico registrato in libreria. Il campione non sembra contenere cocaina. Gli altri picchi rimangono sconosciuti, ma gli spettri ottenuti sono stati inclusi in questa figura per studi comparativi e come supporto per studi futuri. La stessa considerazione è stata stabilita per le figure 10-24.

La presenza dell'amido in questi composti è riconducibile al fatto che si tratta del carboidrato di riserva dei vegetali. Il glucosio viene immagazzinato al loro interno sottoforma di amido in qualità di fonte energetica, viene poi sintetizzato per via enzimatica partendo dal glucosio che viene prodotto dalla fotosintesi clorofilliana [5, 9].

²⁴ Bisogna sottolineare che lo spettro dell'amido non è quello che deriva dal picco principale ma da un picco secondario.

Un'altra conferma riguarda il campione LS48 Mirabol Citrin e deriva da ciò che si notò interpretandone il relativo spettro IR e quello in riflettanza diffusa: A) non contiene amido, B) è diverso da tutti gli altri inseriti nella sottocategoria vegetali.

L'ipotesi formulata interpretando lo spettro infrarosso del campione LS192 Anis stellat è invece smentita dall'analisi cromatografica. Da quest'analisi non risulta contenere amido, infatti nessuno dei picchi cromatografici presenta lo spettro caratteristico di questa sostanza. È stata rivelata la presenza di fenoli nei campioni LS92, LS141, LS192 anche se non si è riusciti a determinare quale sia il composto esatto.

A sorpresa non è stato rivelato lo spettro relativo alla cocaina nel campione LS7 estratto di coca, mentre è stato rivelato nel campione LS56 Gran Paradis.

Lo spettro caratteristico di composti polifenolici è stato individuato nei campioni LS56, LS92, LS141 e LS192, con questo detector però non è possibile discriminare quale polifenolo sia presente. La maggior parte di questi composti sono potenti antiossidanti necessari per il corretto funzionamento delle cellule vegetali [10].

Restano ancora ignoti alcuni composti perché i relativi spettri UV-vis non sono facilmente identificabili.

In conclusione, si può affermare che, tramite l'estrazione in fase solida, in pochi passaggi è stato possibile riscontrare la presenza dell'amido (quando presente) all'interno di una matrice estremamente complessa. Per quanto riguarda l'identificazione di altri composti questa tecnica presenta alcuni limiti.

3.2.2. Resine o gomme

In quest'unità si è deciso di trattare ciascun campione in una sezione a sé stante. Per ogni campione saranno riportate le informazioni ottenute tramite l'analisi in spettroscopia infrarossa (FT-IR) e in gas cromatografia di massa (GC-MS). Inoltre alcuni campioni sono stati analizzati utilizzando la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) per studiarne la struttura molecolare in maniera più approfondita.

3.2.2.1 LS81 Benzoin

Sull'etichetta è riportata la scritta *Benzoin*, il nome e la durezza del campione fanno pensare immediatamente ad un collegamento con la resina benzoino.

Descrizione	
Un pezzo compatto e minuscoli frammenti leggermente appiccicosi. Colorazione bruno-rossastra. La superficie è scabrosa, sembrano essere presenti dei micro-inclusi di colore più scuro.	

▪ FT-IR LS81 Benzoin

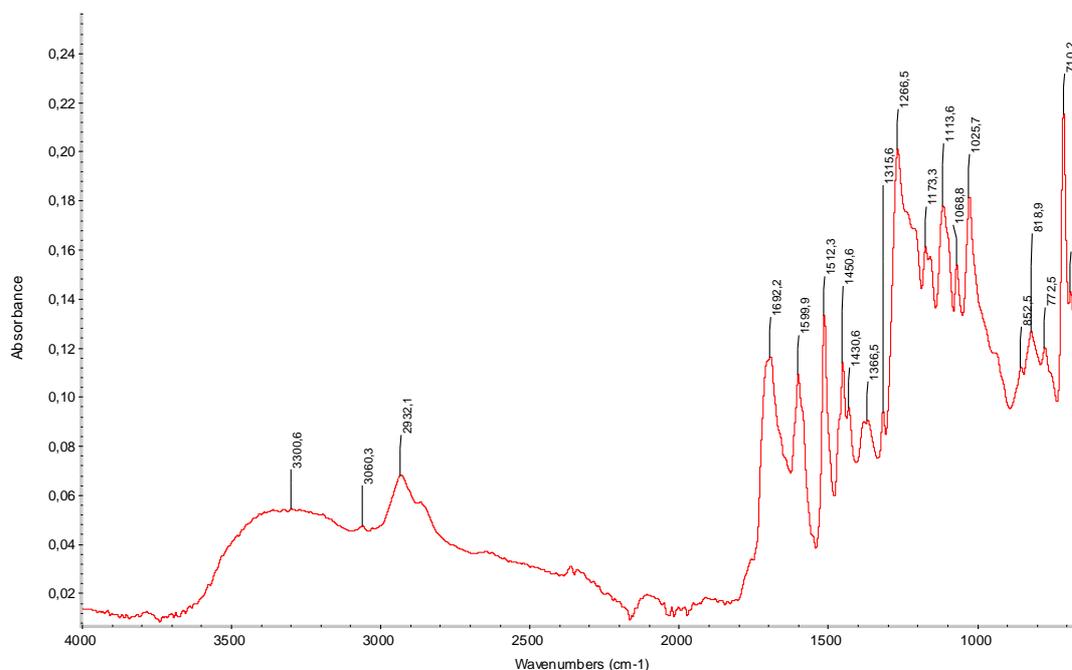


Figura 27: Spettro FT-IR del campione LS81 Benzoin registrato presso il LAMS, Parigi.

Tabella 15: Attribuzioni FT-IR del campione LS81

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Functional Groups	Attribution
3300 (3060)	Stretching O-H	Resina fenolica
1266, 1173, 1113, 1068, 1025	Stretching C-O	Resina fenolica
2931, circa 2860	Stretching –C-H	Resina fenolica
(1430), 1366	Bending C-H	
1692	Stretching C=C	Resina fenolica
1599, 1512	Stretching C=C	
1450	Stretching C=C	Resina fenolica
852, 818, 772, 710, 685	C-H Aromatic	Resina fenolica

I picchi che cadono nella zona caratteristica dei legami C = C aromatici (1600- 1450 cm⁻¹) e nelle deformazioni dei legami aromatici C-H (1000-650 cm⁻¹) sono caratteristici della resina di benzoino. Dalla letteratura [9, 11, 12] e dal confronto con delle impronte digitali con il database IRUG [3] si riscontra però che sono tipici di tutte le tipologie di resine di benzoino (Siam, Sumatra, Tuchia, Mediterraneo).

La **resina benzoino** è una resina balsamica di consistenza piuttosto dura i cui componenti principali non sono terpeni ma esteri aromatici (acido benzoico e acido cinnamico) con i loro acidi aromatici corrispondenti. Le quantità di questi composti sono molto variabili e dipendono dalla specie della resina da cui si ottengono. Deriva dalla specie *Styrax*, della famiglia delle *Styraceae* [9].

Al giorno d'oggi la fonte principale della resina è la *Styrax benzoin*²⁵, che cresce a Sumatra, Giava e Borneo. Fonti minori sono *Styrax Paralleloneurum*²⁶ e *Styrax tonkinensis*²⁷, che crescono in numerosi paesi dell'Asia orientale come Indonesia, Sumatra, Giava, Laos, Thailandia e il Vietnam. La resina denominata Sumatra Benzoin deriva delle specie *Styrax benzoin* e *Styrax Paralleloneurum*, mentre l'essudato della *Styrax tonkinensis* prende il nome di *Siam benzoin* [11, 12]. Quest'ultima è di qualità più pregiata rispetto alla precedente, infatti ha una colorazione ambrata, gli essudati di qualità meno pregiata invece sono di colore più rossastro (come nel campione preso in esame) [13]. [Dopo un'analisi occhio-metrica del campione si può azzardare l'ipotesi che si tratti della qualità meno pregiata poiché la colorazione è bruno-rossastra, questo potrebbe indicare una parziale ossidazione dovuta al fatto che si tratta di un campione datato.

L'unica fonte di resina benzoino nel Mediterraneo è la *Styrax officinalis* ma dal VI secolo la commercializzazione da parte dell'impero bizantino dalla resina storace²⁸, una resina fenolica simile a quella di benzoino, portò gradualmente all'abbandono della *Styrax officinalis* come fonte di resina [12]. La storace (in inglese *Styrax o*

²⁵ *Styrax benzoin* è un albero cespuglioso da 8 a 34 m di altezza con un tronco di 10 a 100 cm di diametro, dalla corteccia grigia al rosso su uno spessore da 3 a 7 cm, trovato a bassa quota (la maggior parte spesso tra 100 e 700 m). Raggiunge i 6 m di altezza in pochi anni [11].

²⁶ *S. paralleloneurum* è un albero il cui aspetto generale è estremamente vicino a quello di *S. Benzoino*. Il tronco è di colore chiaro, da 23 a 60 cm di diametro e da 5 a 25 m di altezza. Si trova tra 575 e 1700 m di altitudine in boschi misti indonesiani [11].

²⁷ *Styrax tonkinensis* è un albero di 12-15 m di altezza e 80 a 90 cm di circonferenza che ricorda la betulla e si trova tra 600 e 2000 m di altitudine su colline sabbiose. Raggiunge la maturità dopo dieci anni [11].

²⁸ Dal latino *Sturax*, *sturacis* che significa resina fragrante.

Storax) si ottiene dalla *Liquidambar orientalis* (*Hamamelidaceae*) e cresce in Turchia [12]. Il termine ha generato una confusione nomenclaturale abbastanza frequente nella terminologia della resina tant'è che le gomme da *Liquidambar* (*Hamamelidaceae*) sono spesso commercializzate come benzoino ma non devono essere considerati come tali dal punto di vista botanico e chimico [11, 14].

Entrambe le resine contengono acido cinnamico, acido benzoico, i loro esteri (e alcol cinnamlici, p-cumarilici e coniferilici) e resorcinolo come composti principali [15], ma si differenziano perché nella resina storace non sono presenti composti benzoici [16]. [La resina benzoino ottenuta dalla *Styrax officinalis* è caratterizzata dalla presenza di 4-idrossibenzaldeide, vanillina, acido 3-idrossibenzoico, acido 4-idrossibenzoico e acido vanillico. Mentre, 4-idrossi-benzenopropanolo, acido p-idrossicinnamico, 3-fenil-2-propanolo e gli acidi triterpenici (oleanolico e oleanonico) sono caratteristici della resina storace [12].

Per uno studio più approfondito sui composti principali del campione preso in esame ci si è serviti della GC-MS. Basandosi sui risultati ottenuti è stato condotto uno studio tramite NMR, tecnica complementare alla GC-MS che aiuta a confermare i risultati dell'analisi di separazione.

- **GC-MS LS81 Benzoin**

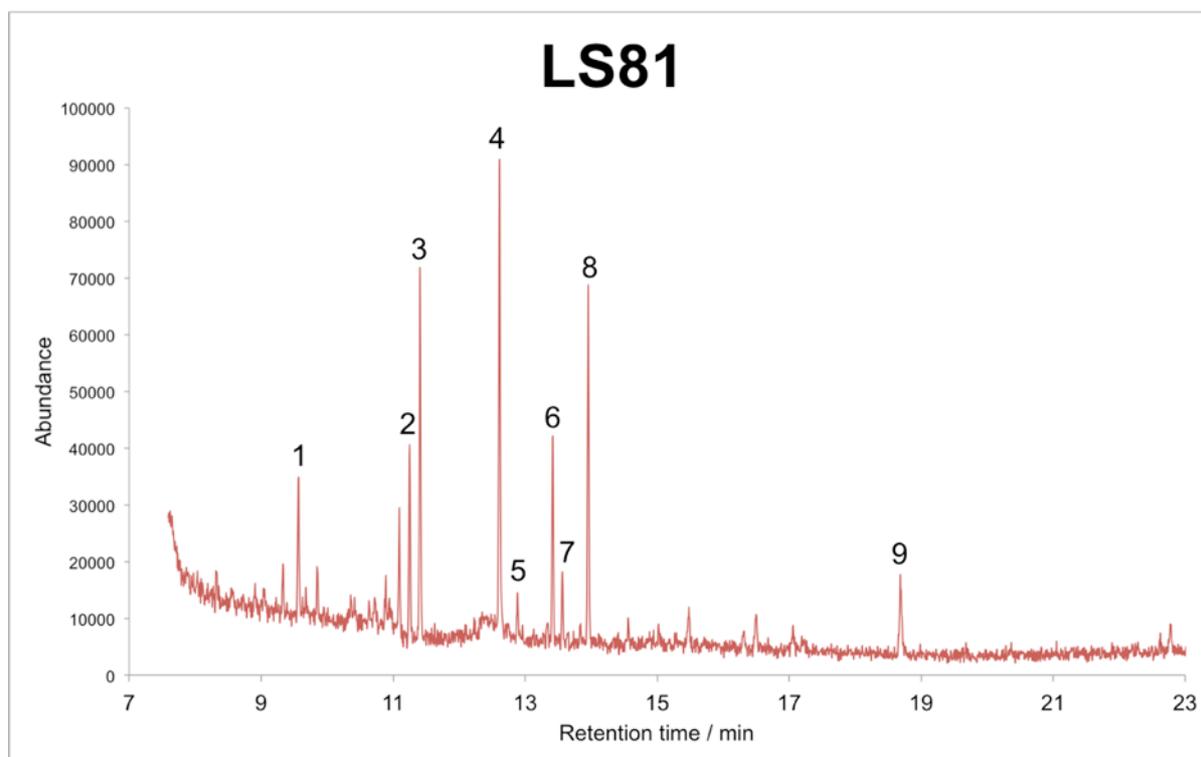


Figura 28: Cromatogramma del campione LS81

Tabella 16: Tabella riassuntiva dell'analisi GC-MS del campione LS81

LS81 Benzoin			
Peak number	Retention time (min)	Rapporti m/z dei frammenti principali (intensità relativa %)	Composto
1	9,57	77 (50), 50 (25), 63 (25), 92 (25), 107 (15), 135 (100), 147 (10), 401 (5, M+)	4-metossi- Benzaldeide, benzoehars
2	11,26	77(35), 92 (25), 135 (100), 166 (50, M+)	Acido benzoico, 4,metossi ME
3	11,42	51 (35), 77 (50), 103 (70), 131(100), 162 (50, M+)	Acido cinnamico ME
4	12,62 (picco molto intenso)	51 (25), 65 (18), 77 (30), 95 (50), 166 (100, M+)	<u>3, 4- dimetossi-Benzaldeide, Benzoehars</u> Sinonimo: Vanillin methylether
5	12,89 (poco intenso)	103 (15), 120 (5), 135 (27), 163 (100), 164 (10), 179 (7), 194 (26, M+)	Acido tereftalico diME Sinonimi: Benzene dicarboxylic acid methylester Dimethyl p-phthalate
6	13,43	65 (20), 91 (100), 252 (5, M+)	Toluene
7	13,57	151 (25), 166 (40), 181 (100), 212 (20, M+)	4-dimetossi-metil-1, 2-dimetossi-Benzene
8	13,96	79(40), 166 (100), 196 (90, M+)	Acido Dimetossi benzoico ME Sinonimo: Acido veratrico ME
	15,48	55 (35) 74 (100), 87 (66)	Acido tridecanoico ME
9	18,69	55 (35) 74 (100), 87 (66)	Acido tridecanoico ME (Nist) o Metil-pentadecanoate (Amdis)
	22,78		Acido caprico ME

Come si può vedere in tabella 16, sono stati identificati gli esteri metilici dell'acido cinnamico e dell'acido benzoico ossidato.

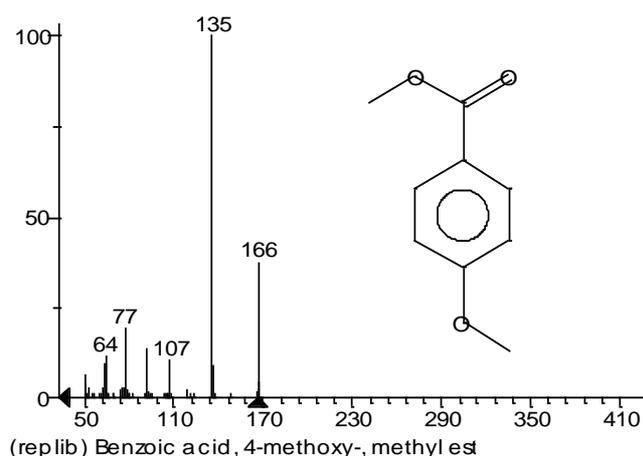


Figura 29: Spettro di massa della Benzaldeide (picco n° 1)

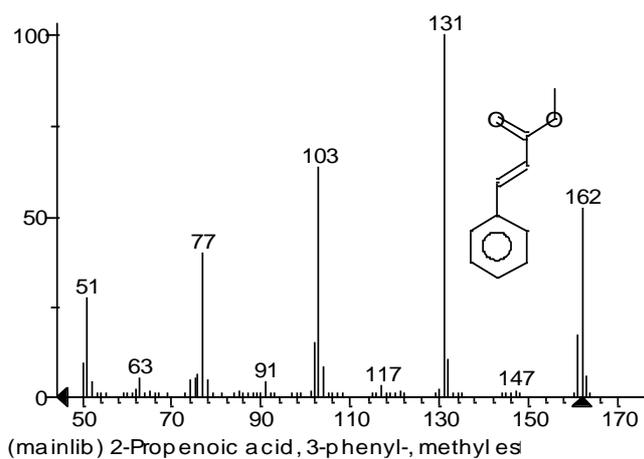


Figura 30: Spettro di massa del metil estere dell'acido cinnamico (picco n°3)

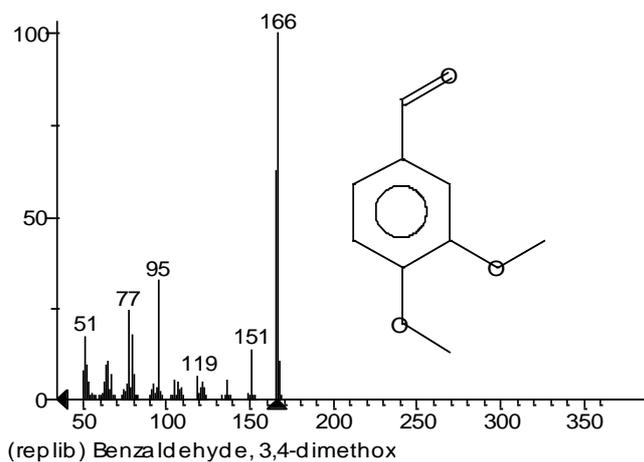


Figura 51: Spettro di massa del metiletere della vanillina (picco n°4)

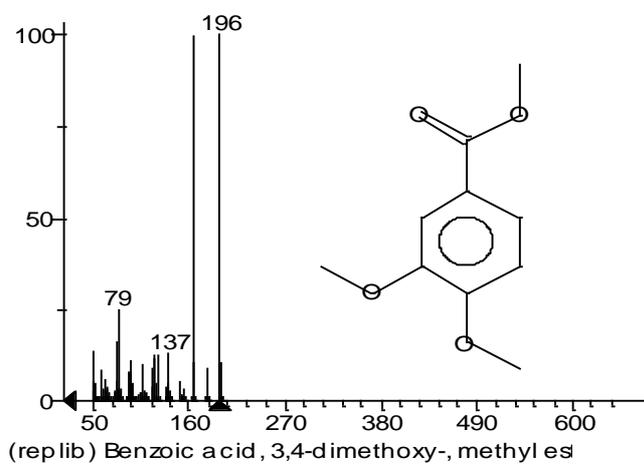


Figura 32: Spettro di massa del estere metilico dell'acido veratrico (picco n°8)

Nella figura 33 sono riportati i componenti principali nel campione LS81 Benzoin.

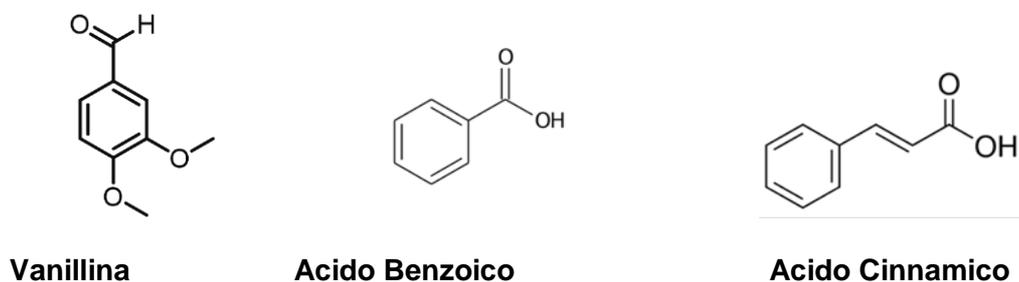


Figura 33: Strutture dei tre composti caratteristici della resina fenolica

La presenza di acido benzoico (picco n°.2) e dei suoi derivati permette di escludere che si tratti di resina storace (*Liquidambar*) perché studi precedenti hanno sottolineato il fatto che questa non contenga composti benzoici nemmeno in tracce, cosa che la differenzia dalla resina di benzoino [11,16]. E' stata rivelata anche la presenza di vanillina (metil etere, picco n°.4) che, sulla base dei dati bibliografici riportati nella tabella sottostante (Tab.17) [12], è determinante per la distinzione tra resina benzoino in cui è presente e resina storace in cui è assente. Hovaneissian et al. (2008)], riporta che la resina storace ottenuta dalla specie turca (*Liquidambar*) contiene isovanillina in quantità decisamente minori rispetto all'acido cinnamico e all'acido benzoico [16]. Inoltre anche la metossi-benzaldeide (picco n°.1 GC-MS) è stata individuata tramite l'analisi gas cromatografica, come riportato in letteratura anche l'idrossi-benzaldeide è stata individuata in campioni antichi di resina benzoino e non in quelli di resina storace [11].

Tabella 17: Composti identificati nella resina di benzoino, nella resina di storace [11] e nel campione LS81

Composti	Resina benzoino	Resina storace	LS81 benzoin
Acido Benzoico	+	+	+
4-Idrossibenzaldeide	+		
Resorcinolo	+	+	
Vanillina	+		+
Acido Cinnamico	+	+	+
Acido 3-idrossibenzoico	+		
Acido 4-drossibenzoico	+		
Acido Vanillico	+		
Cinnamil-alcol	+	+	
4-idrossi-benzenepropanolo		+	
Acido p-idrossicinnamico		+	
Acido Oleanolico		+	
Acido Oleanonico		+	
3-fenil-2-propanolo		+	

Castel et al. 2006 [17] riscontrano la presenza di toluene (picco n°. 6) in qualità di costituente volatile della resina benzoino. Mentre quella dell'acido tereftalico (picco n°.5) si può interpretare come prodotto di ossidazione dei terpenoidi [18].

Alla luce dei risultati ottenuti si può affermare che il campione preso in esame sia davvero resina di benzoino e non storace.

Una volta confermato il fatto che si tratti di resina benzoino, sulla base delle analisi condotte da Burger et al. (2016) si può ipotizzare che non si tratti di un essudato della specie *Styrax tonkinensis* (da cui si ottiene la resina balsamica *Siam benzoin*) perché dall'analisi GC-MS dello standard di questa specie l'acido cinnamico non viene identificato, mentre nel campione reale preso in considerazione è presente e per di più in quantità abbondante [19]. Visivamente il campione appare bruno-rossastro, anche questo dato potrebbe avvalorare questa ipotesi dato che il campione viene descritto con una colorazione compatibile con quella con cui, in letteratura, viene descritta la resina benzoino di Sumatra. Ciò però resta solo un'ipotesi perché non è stata confermata la presenza dell'acido cinnamico a causa della complessità dello spettro.

Con l'esterificazione del campione non si riesce a stabilire se si tratti dell'essudato proveniente dalla specie *Styrax officinalis* o dalle specie che prendono il nome di Sumatra benzoin: i composti rivelati tramite la gas cromatografia (acido cinnamico, acido benzoico e vanillina) sono presenti sia nel benzoino mediterraneo che in quello di Sumatra. Per un'analisi ancora più approfondita si rimanda allo studio eseguito da Burger et al (2016) in cui la frazione non volatile si analizza tramite HPLC. In questo modo sembra si possano individuare i marker caratteristici delle varietà di resine: il coumaryl benzoate e il coniferyl benzoate (fluorescente) per Siam Benzoin e il Coumaryl cinnammate per Sumatra benzoin. La resina mediterranea può presentare il benzyl benzoate in tracce, ma non si può considerare un marker tipico di questa resina [19].

▪ **NMR LS81 Benzoin**

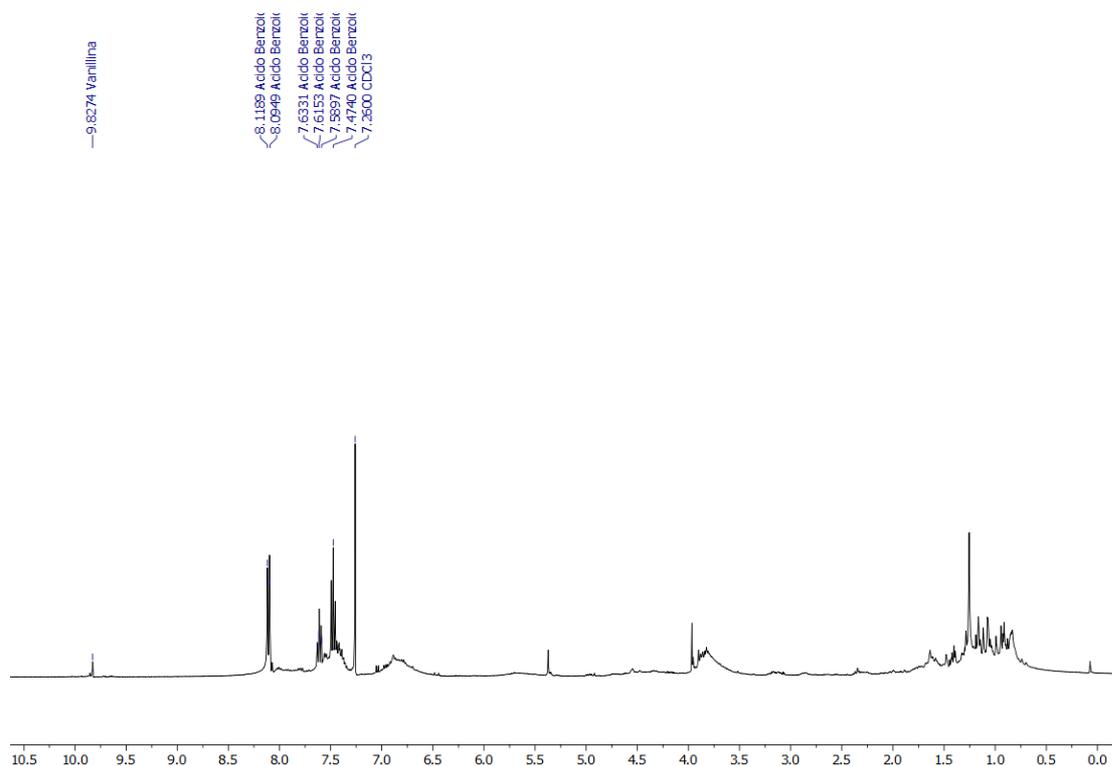


Figura 34: Spettro NMR protonico del campione LS81

L'indagine svolta in NMR è complementare a quella svolta in GC-MS: lo spettro protonico del campione preso in esame è abbastanza complesso ma si può identificare un picco che cade a 9,82 ppm (la zona relativa alla componente aldeidica) attribuibile alla vanillina (3, 4-dimetossi-Benzaldeide) [20]. Le gobbe presenti possono indicare la presenza di composti simili tra loro che potrebbero essersi degradati. Per attribuire gli altri picchi, è stato necessario utilizzare lo spettro NMR- C^{13} e gli esperimenti bidimensionali etero nucleari associati, relativi a due nuclei diversi (HSQC e HBMC), riportati nella figura 35.

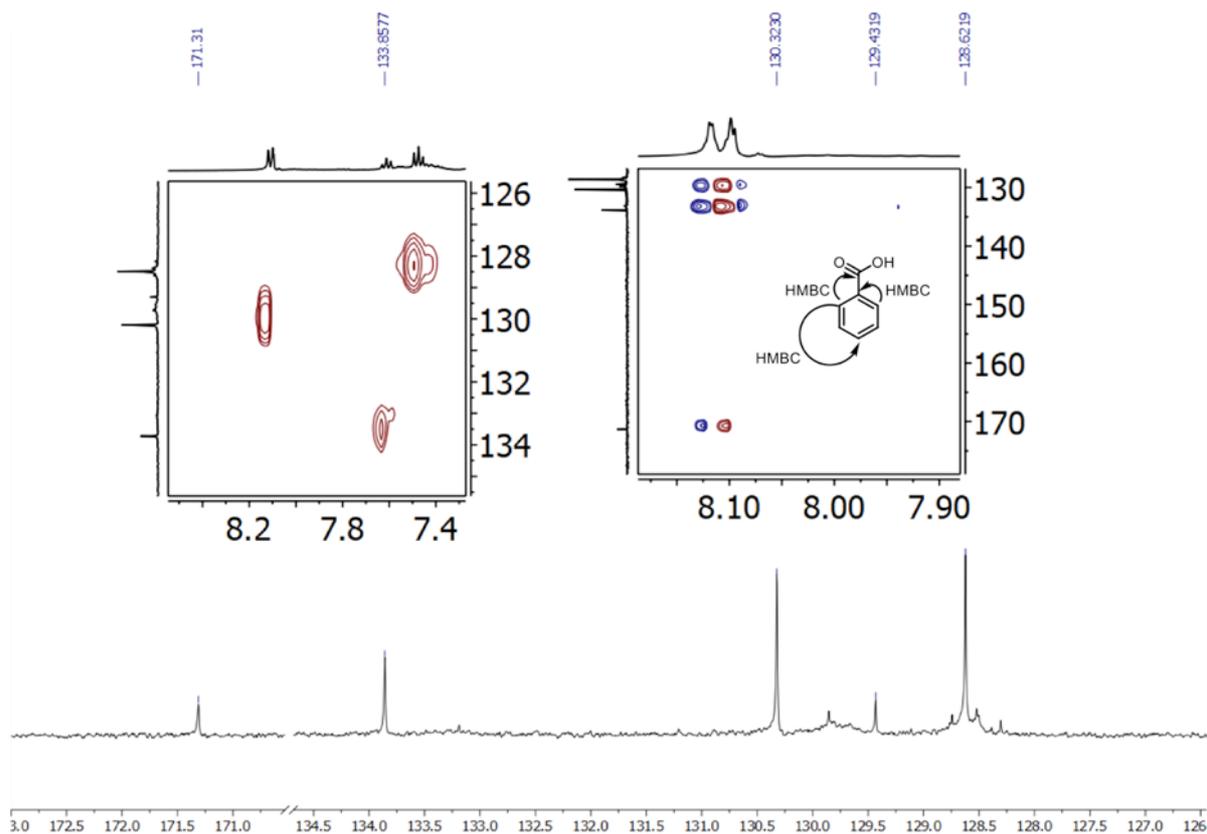


Figura 35: Spettro NMR C^{13} ed esperimenti bidimensionali HSQC (sinistra) e HMBC (destra) del campione LS81

L'esperimento HSQC (a sinistra) permette di vedere la diretta correlazione dei protoni direttamente legati ai propri C: a 129 ppm cade il picco relativo al carbonio in meta, a 130 pp quello in orto e a 133 quello in para. Mentre l'esperimento di destra (HMBC) permette di vedere l'interazione di un protone con i carbonio che non ha idrogeni attaccati. Come si può vedere in figura, a 129 ppm corre il carbonio quaternario, a 133 il C in para e a frequenze decisamente più alte si trova il carbonio più deschermato di tutti: quello attaccato al gruppo carbossilico. Da questo studio si evince che il sistema aromatico (acido benzoico) è monosostituito [21].

Tramite l'esperimento DOSY (Fig. 36) invece si possono discriminare le molecole in miscela in base alle dimensioni della molecola: nel caso del campione LS81 si può dire che sono presenti molecole piccole (ex. Acido benzoico) che diffondono a $1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ e altre molecole con un raggio idrodinamico molto diverso che hanno un coefficiente di diffusione molto più alto.

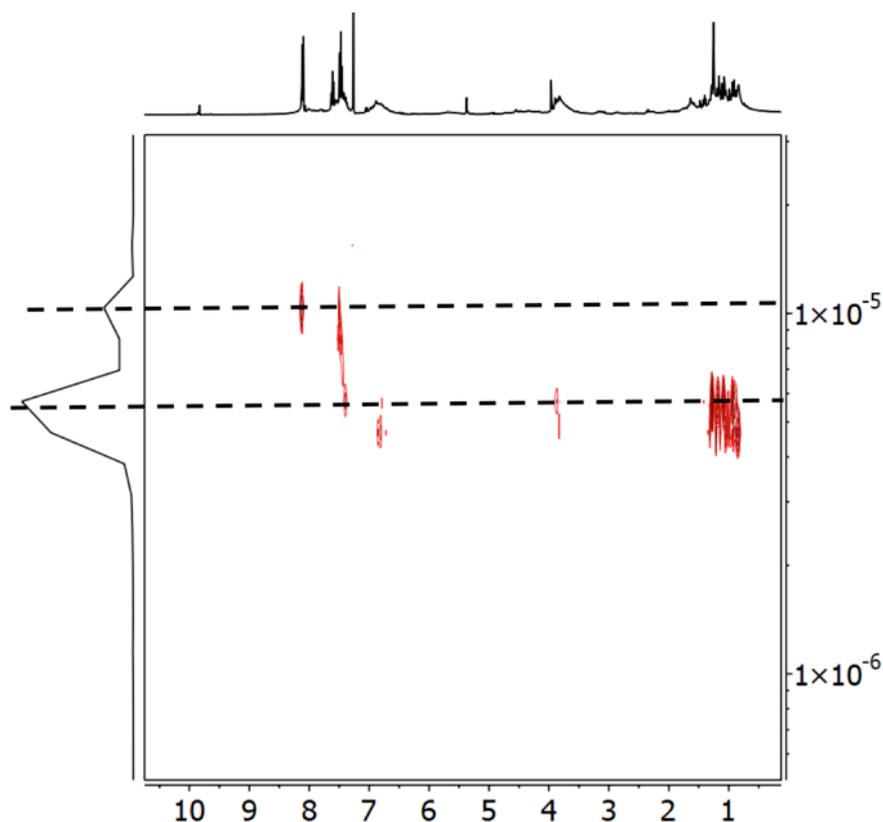


Figura 36: Spettro NMR-DOSY del campione LS81

Dunque, la presenza dell'acido benzoico è stata confermata e avvalorata (indicando la struttura monosostituita dell'acido benzoico) dall'analisi svolta con l'NMR. Inoltre è stata confermata anche la presenza di vanillina. Non è stato possibile identificare altre molecole a causa della complessità dello spettro.

- **Utilizzo**

Questa resina tradizionalmente veniva impiegata in medicina, cosmetica, profumeria e in cerimonie rituali insieme a mirra o olibano per le sue proprietà odorifere caratteristiche. Nella regione mediterranea che era già conosciuta dai greci, infatti viene citata da Erodoto (V sec. DC) e Teofrasto (IV-III secolo d.C.) e viene raccomandata da Ippocrate (V-IV secolo d.C.) come rimedio [22]. [Sembra che si trovasse anche tra i componenti del balsamo dei frati [16]. Nella seguente tabella (Tab. 18) vengono riportati gli usi e le funzioni farmacologiche della resina di benzoino come medicamento.

Tabella 18: Utilizzo e proprietà della resina di Benzoino come medicamento

Sostanza	Ricetta	Uso	Forma di somministrazione	interpretazione	Funzioni farmacologiche
Benzoin	IM= Iatrosophikon Antidotarion (Print edition) Mitrophanous (1790–1867) Filaretos (1924), Mon. of Makhairas CY, 1849 Makhairas CY IM 14.3 [23]	Frattura del cranio	Otturazione/riempitivo per la frattura	Frattura cranica aperta	Antinfiammatorio, antimicrobico, Promotore della guarigione delle ferite [23]
	–	Tagli		Per proteggere la pelle o come agente adesivo topico [24]	Antisettico, emostatico/astringente
	IM 63.03	Podalgia	Bevanda	Gotta e condizioni reumatiche (incluse artrite e artrosi)	Analgesico, antinfiammatorio, immunomodulatore
	– Romani, egiziani e fenici [16]	Vie respiratorie	nei fluidi del vaporizzatore per inalazione [24]	Per curare le infezioni croniche delle vie respiratorie	Disinfettante, espettorante [16]
–		Odontoiatria	Tintura	Per trattare l'infiammazione delle gengive e le lesioni erpetiche orali	Antinfiammatorio

Oltre alle proprietà medicinali sopra descritte, sembra che fosse uno dei componenti della miscela di materiali organici da bruciare come incenso. Nei paesi orientali veniva usato nelle cerimonie rituali infatti il suo fumo avrebbe dovuto allontanare gli spiriti maligni e le malattie [11]. Le analisi condotte da Modugno et al. (2006) lo dimostrano perché tutti i composti identificati nella resina di benzoino sono stati rilevati in un residuo organico archeologico da un incensiere ceramico egiziano (dal quinto al settimo secolo d. C.) [12].

Inoltre il benzoino, in particolare quello del Siam, veniva impiegato in cosmetica per le sue proprietà antiossidanti e conservanti. Per quest'ultima proprietà trova largo impiego anche nell'industria alimentare per la conservazione e il miglioramento del sapore. E' ampiamente utilizzato come fissativo in profumi, saponi, detergenti, creme e lozioni [24] Per la medicina ayurvedica è anche un antidepressivo [25].

In ambito artistico la resina benzoino è stata utilizzata come prodotto verniciante soprattutto su supporti lignei a partire dal XVI secolo. Grazie alle sue proprietà filmogene veniva impiegata sia da sola che in miscela con la gommalacca per donare migliore scorrevolezza e brillantezza alla lucidatura [13].

3.2.2.2. LS193 Guaiaco resin e LS119 Res Guajac

Secondo il nome riportato sulle etichette, questi composti potrebbero derivare dal guaiaco, un legno di Zygophyllaceae (*Guaiacum sanctum* L. o *G. officinale* L.), la cui resina è generalmente chiamata gomma guaiaca o resina Guajac [26].

Descrizione LS119	
Piccoli frammenti alcuni sono traslucidi, altri presentano un velo opaco. Sono di diversa forma e colore (bruno, bruno-rossastro, rosso-giallastro, grigiastro e traslucido). Leggermente appiccicosi.	
Descrizione LS193	
Frammenti minuscoli (μm) di forma e colore diverso: alcuni sono allungati e sottili, somigliano quasi a scaglie, altri sono più simili a dei parallelepipedi. Variano dal colorito bruno-rossastro al giallastro, alcuni sono leggermente opachi, altri traslucidi. Tutti presentano all'interno delle micro-bolle. Sono leggermente appiccicosi.	

La resina di guaiaco, estratta dal legno del *Guajacum officinale* (Fam. Zygophyllaceae), è una miscela complessa costituita da circa il 70% di acidi alfa e beta-guaiacoico, 10% di acido guaiaretico e 15% di beta-resina guaiaca e derivati del legno [27].

▪ **FT-IR LS119 LS193**

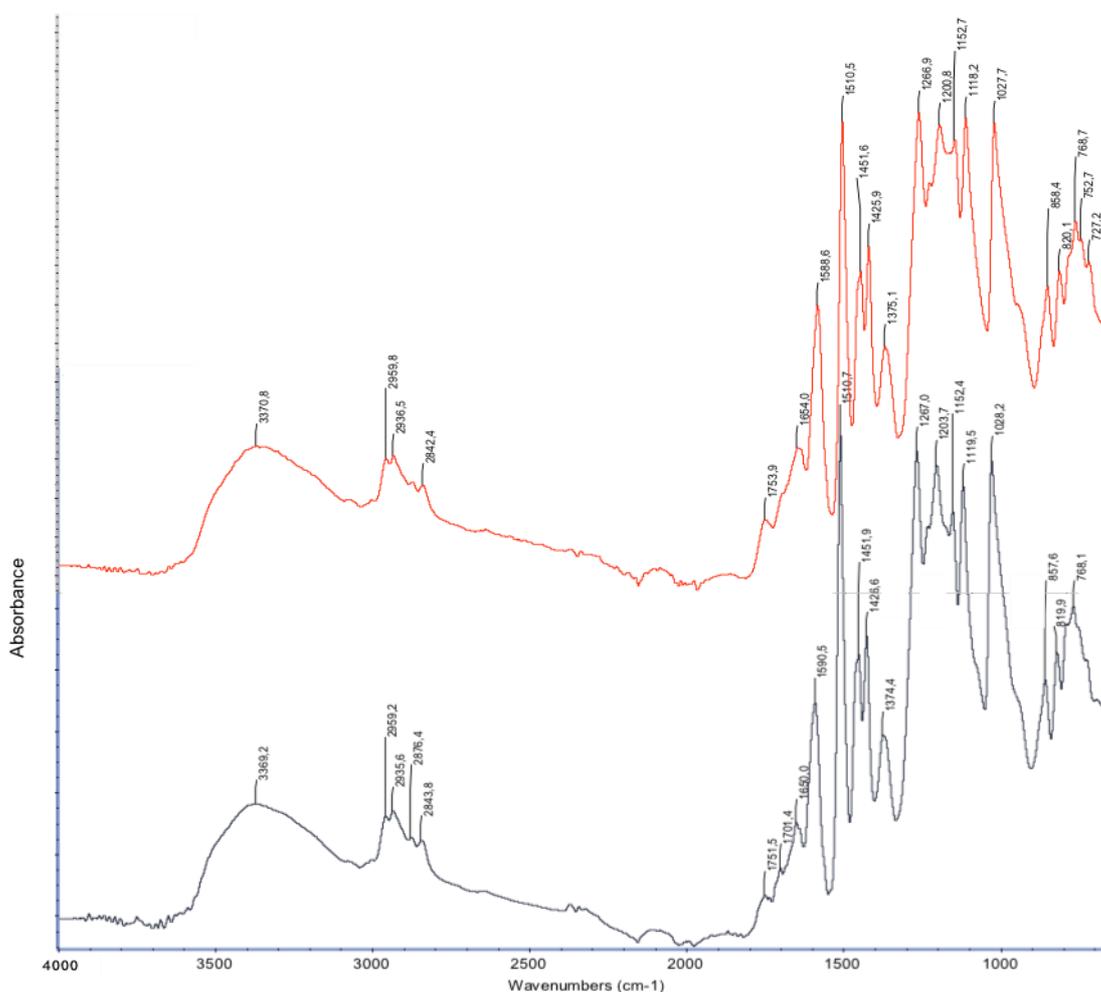


Figura 37: Spettri FT-IR dei campioni LS119 (rosso) e LS193 (nero) registrati presso il LAMS

Tabella 19: Attribuzioni FT-IR dei campioni LS119 e LS193

Wavenumbers (cm ⁻¹)		Functional Groups	Attribution
LS119 Res. Guajac	LS193 Guiaco resin		
3370	3369	Stretching O-H	Alcohol or phenols
2959, 2936, 2842	2959, 2935, 2842	Stretching -C-H	Alkanes
1753, 1701	1751, 1701		
1654	1650	Stretching C=O	Amide
1588	1590	Bending N-H	
1510	1510,	Stretching C=C	Guiaionic acid
1451, 1425	1451, 1414,		
1375	1366	C-O	deformation in the guiaionic aromatic ring
1266, 1200, 1152, 1118, 1027	1267, 1203, 1152, 1119, 1028		
	857, 819, 768	bending OOP	

Gli spettri dei campioni LS119 e LS193 sono perfettamente sovrapponibili tra loro. Per riuscire a determinare la natura del composto è necessario eseguire altre analisi complementari, per il momento si può dire che i campioni LS119 e LS193 sembrano trattarsi dello stesso composto perché rispondono allo stesso modo se eccitati da radiazione infrarossa.

▪ **GC-MS LS 193 E LS119**

Come per gli spettri IR anche i cromatogrammi sono molto simili: i tempi di ritenzione sono spostati di qualche secondo e il cromatogramma del campione LS119 presenta la parte iniziale poco risolta, probabilmente per l'interferenza dovuta alla componente aldeidica volatile che è stata identificata come vanillina [5]. Di seguito si riportano i cromatogrammi sovrapposti e il cromatogramma del campione LS193 cui segue la discussione dei risultati.

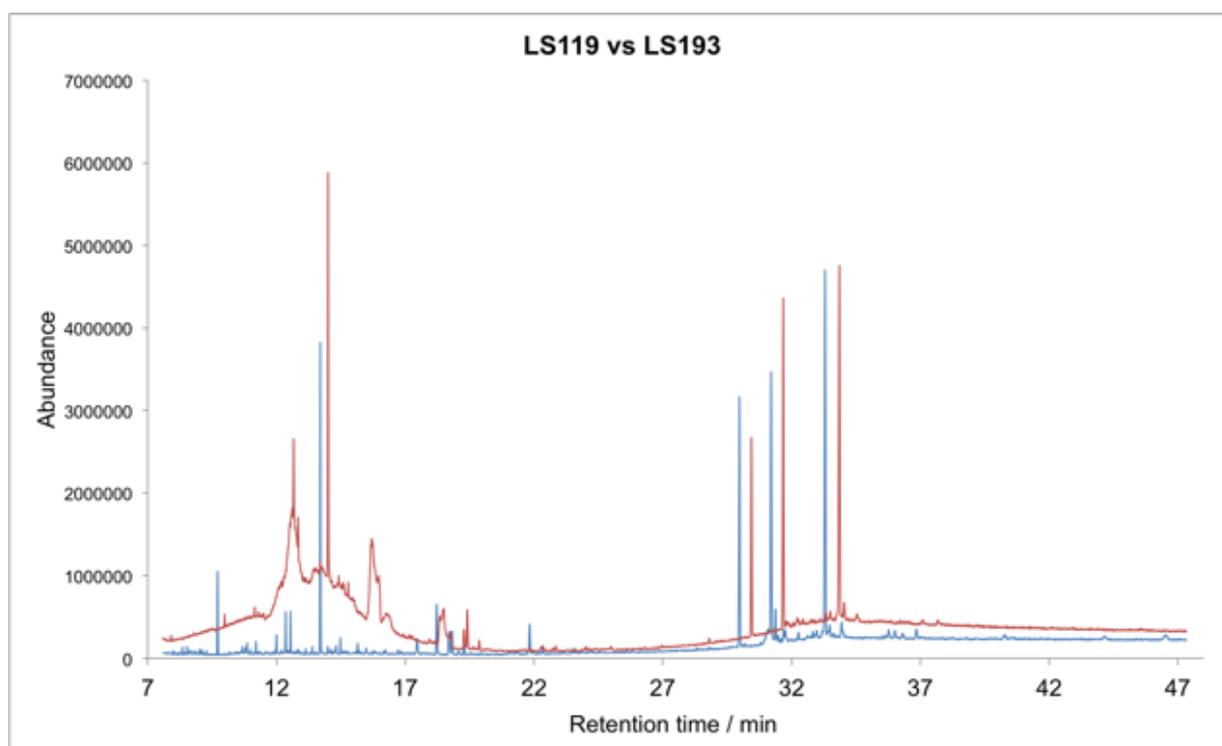


Figura 38: Sovrapposizione dei cromatogrammi dei campioni LS119 (rosso) e LS193 (blu)

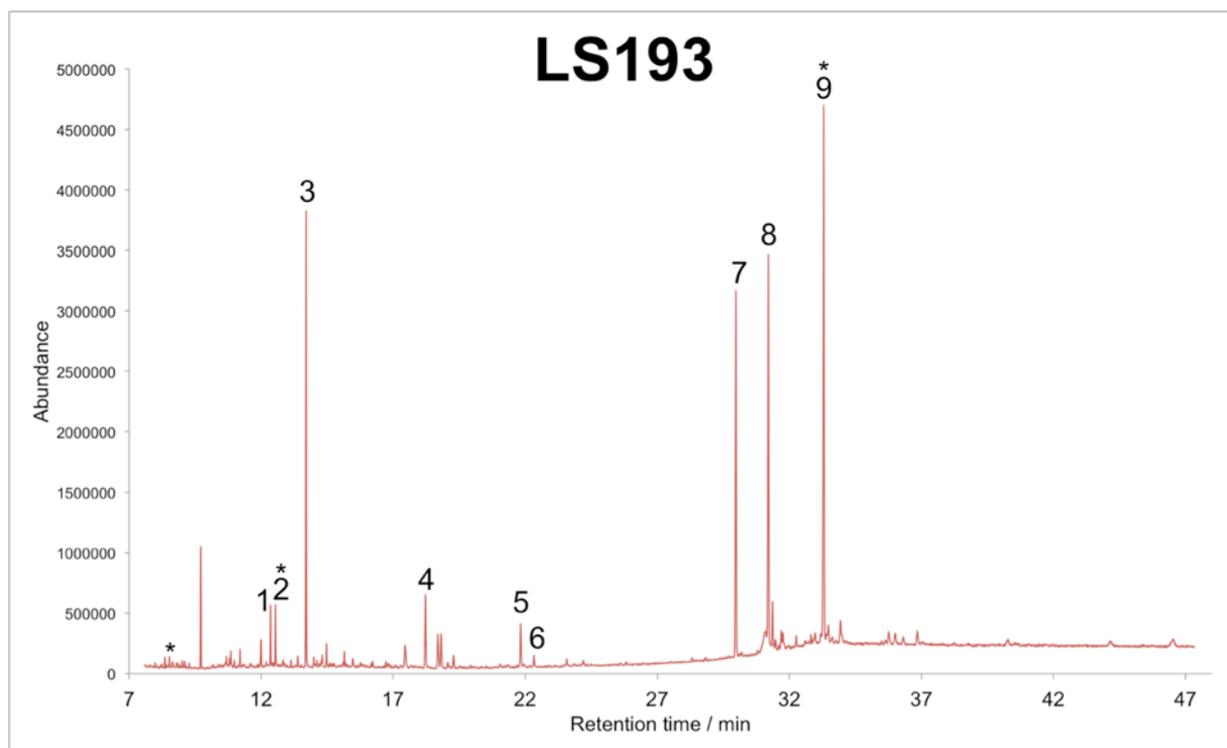


Figura 39: Cromatogramma del campione LS193

Tabella 20: Tabella riassuntiva dell'analisi GC-MS dei campioni LS119 e LS193

LS193 Guaiaco resin			LS119 Resin Guajac
Peak number	RT (min)	Compound	RT (min)
*	9.09	p-Ethylguaiacol	
1	12.37	Vanillin methyl ether	12.67
2 *	12.55	Propenylguaiacol	12.83
3	13.71	Dimethoxy benzoic acid ME	14.02
4	18.23	Acido Palmitico ME	18.34
5	21.84	Acido oleico ME	
6	22.34	Acido stearico ME	22.85
7	29.99	Galbulin	30.44
8	31.21	Benezene,1,2-dimethoxy-4-methylphenylsulfur..)	31.680
9 *	33.31	Galgravin Sinonimo: acido guaiaconico	33.86

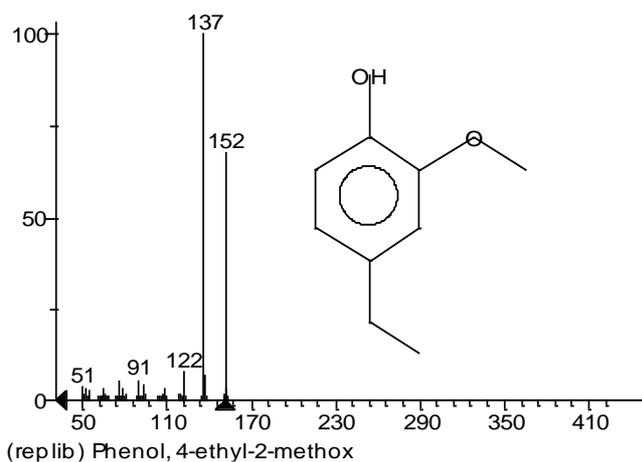


Figura 40: Spettro di massa del *p*-Ethylguaiacol

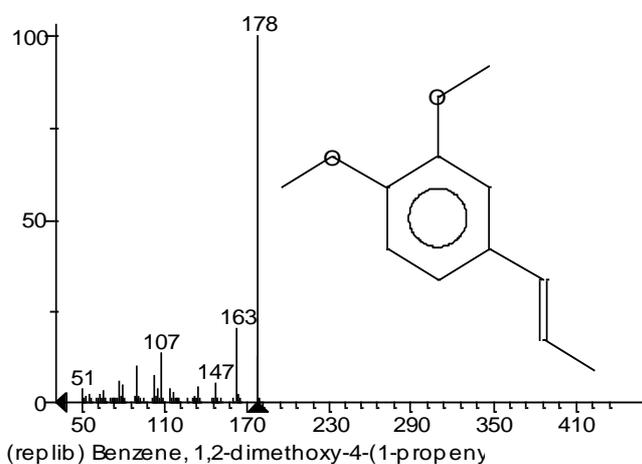


Figura 41: spettro di massa del propenil guaiacolo (picco n°2)

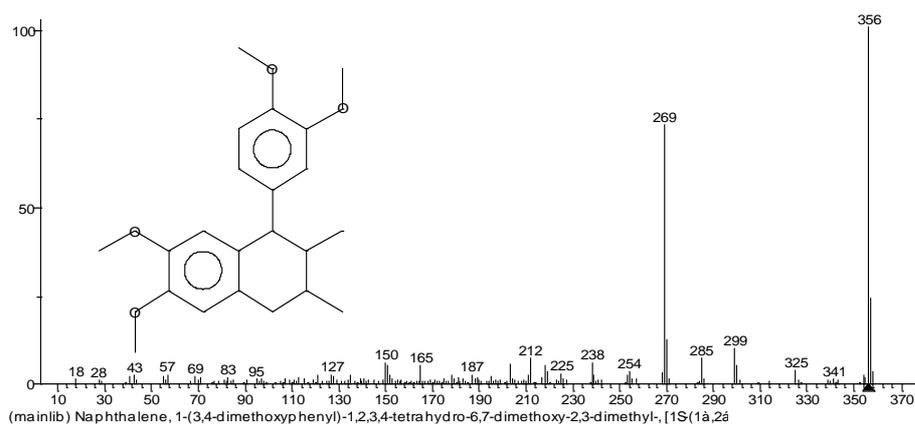


Figura 42: Spettro di massa della galbulina²⁹ (picco n°7)

²⁹ Riferimento m/z galbulin [28].

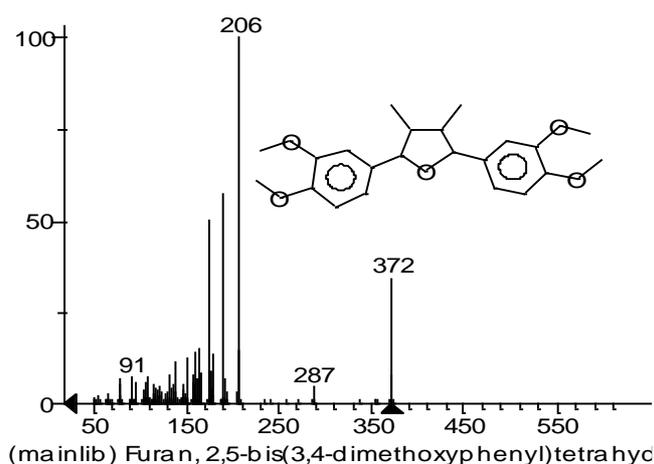


Figura 43: Spettro di massa dell'acido guaiaconico³⁰ (picco n°.9)

Grazie all'analisi condotta mediante GC-MS è stato possibile chiarire la composizione dei campioni LS119 e LS193. Tra i composti rilevati (elencati in tabella 20) ci sono derivati del guaiacolo, vanillina, galbulina (acido guaiaretico) e galgravina (ovvero acido guaiaconico) la cui struttura è mostrata nelle Figure 43-44.

Studi eseguiti in precedenza confermano che questi sono i componenti caratteristici della resina guaiaco [26, 27, 29].

La presenza di alcuni acidi grassi, in particolare acido palmitico, acido oleico, acido stearico, può essere spiegata dall'uso di una sostanza oleosa come veicolante per prendere il rimedio/per ridurre la viscosità del balsamo, base per miscelare più ingredienti "esotici" [30]: infatti, potrebbe essere stato impiegato un olio vegetale. La presenza in quantità elevata di acido oleico (che è un acido grasso insaturo, con un doppio legame C=C) mostra un basso grado di ossidazione e suggerisce che l'ossidazione del materiale organico non è completata. Ciò può essere correlato alla chiusura dei contenitori: probabilmente erano sigillati così bene da rallentare i processi di ossidazione.

³⁰ Riferimento m/z galgravina [31].

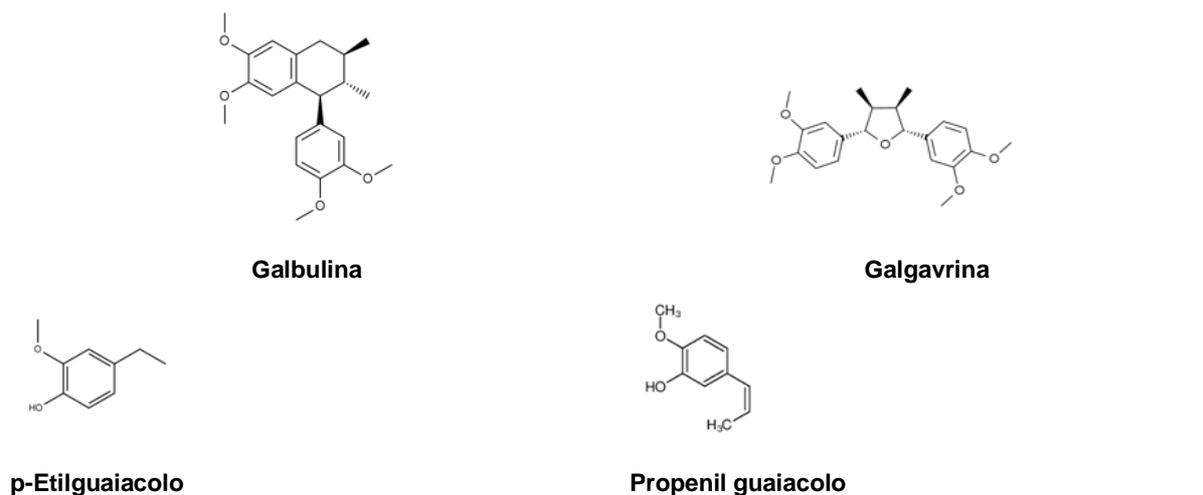


Figura 44: Strutture dei quattro composti caratteristici della resina Guaiaca

▪ **NMR LS119 e LS193**

I campioni LS119 e LS193 presentano anche lo stesso spettro protonico, quello riportato in figura è rappresentativo di entrambi.

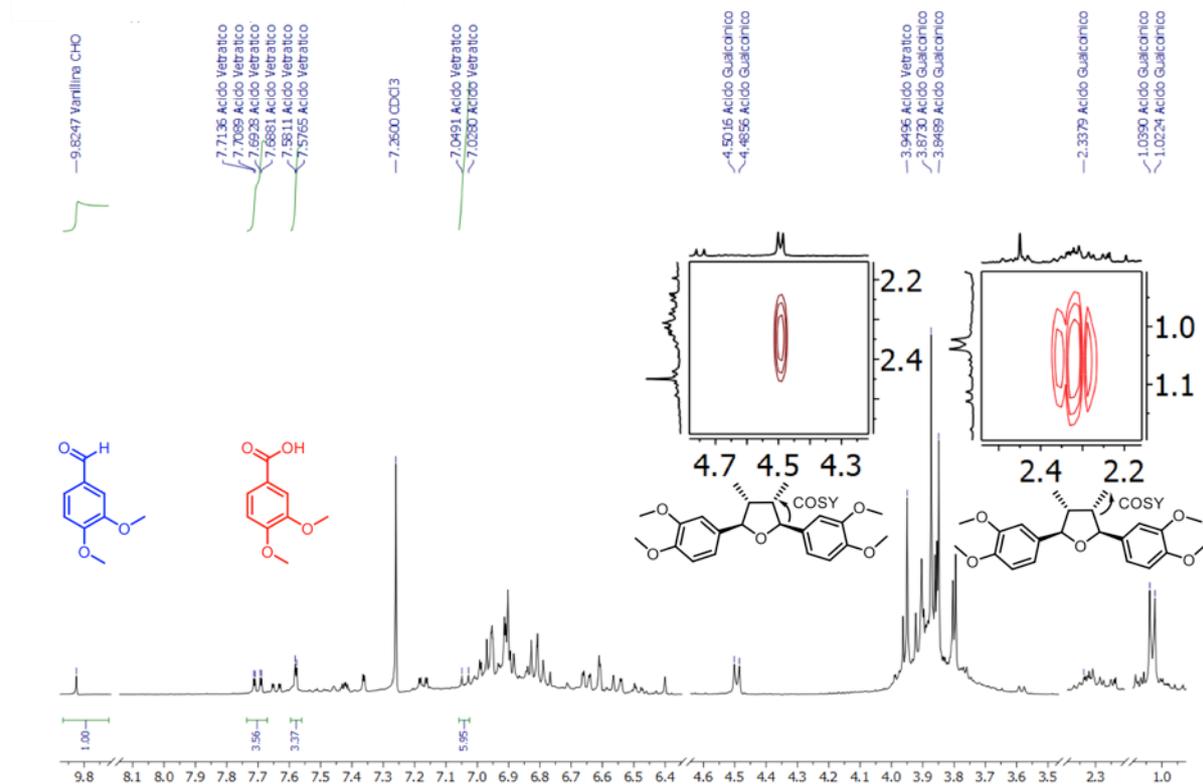


Figura 45: Spettro NMR 1H, COSY del campione LS119

L'esperimento monodimensionale permette di identificare il picco attribuibile alla vanillina che cade nella zona relativa ai composti aldeidici (Vanillina δ 9,82 (1H, s, CHO)) e ai picchi

relativi al suo acido corrispondente: l'acido veratrico (δ 7.71, 7.70, 7.69, 7.68 (m, 1H) 7.58, 7.57 7.04, 7.02 3.94)³¹ [32, 33].

Solo attraverso l'esperimento COSY è possibile determinare l'accoppiamento del metile (OCH₃) attribuire i picchi caratteristici dell'acido guaiaconico (Galgravina)³² [34].

L'NMR quindi permette di confermare la presenza della vanillina (picco n°1 GC-MS) e dell'acido guaiaconico (picco n°. 9 GC-MS). Rivela inoltre la presenza di acido veratrico la cui presenza in un campione datato è plausibile perché è l'acido corrispondente della vanillina. La vanillina è poco stabile per natura trattandosi di un'aldeide e si ossida facilmente trasformandosi nel suo acido corrispondente: acido veratrico.

Non riesce però a confermare la presenza della galbulina perché i segnali cadono in una zona dello spettro in cui i picchi sono sovrapposti.

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile affermare che questi due rimedi farmaceutici, contenuti in diversi contenitori, contengono principalmente resina di guaiaco.

La resina guaiaco è un essudato della pianta *Guaiaecum officinalis* detto anche *Lignum Vitae*, un albero sempreverde originario dell'America centrale, in particolare del Venezuela e delle Antille. I costituenti principali sono quelli sopra descritti. Il legno del *Guaiaecum* è il più duro dei legni commerciali e i suoi essudati prendono il nome resina guaiaco.

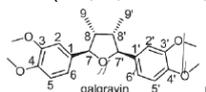
▪ **Utilizzo**

Il guaiaco è stato usato sottoforma di decotto per alleviare le malattie della pelle, gotta, reumatismi, malattie veneree. La resina di guaiaco è stata utilizzata per oltre cinque secoli per trattare artrite, mal di gola e per creare altri medicinali (come sciroppo) anche come antisettico interno in medicina veterinaria [22, 35]. Il guaiaco fornisce una resina che è alla base della tintura di guaiaco, che è il reagente tradizionale per la ricerca sulle ossidasi e perossidasi. Inoltre, il guaiaco è ricco in saponine. Trova largo impiego anche in cosmesi perché i suoi estratti fungono da leganti tra le note delle formulazioni di profumi [24].

³¹ δ 7.78-7.75 (m, 1H) 7.59 (s, 1H) 6.90 (d, 1H, J=8.5 Hz) 3.95 (s, 6H) [32].

³² ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 6.85 (2H, s, H-2 and H-2'), 6.80 (2H, d, J = 2.0, H-5 and H-5'), 6.95 (2H, dd, J = 8.0, 2.0, H-6 and H-6'), 5.44 (2H, d, J = 6.0, H-7 and H-7'), 3.85 (12H, s, OMe), 2.27 (2H, m, H-8 and H-8'), 0.69 (6H, d, J = 6.0, H-9 and H-9'). [33].

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.05 (6H, d, J = 6.7, H-9/9'), 2.34 (2H, m, H-8/8'), 3.87 (s, OCH₃), 3.88 (s, OCH₃), 4.52 (2H, d, J = 6.4, H-7/7'), 6.85-6.99 (6H, m, H-2/5/6, H-2'/5'/6'). [g=galgravin] [34].



3.2.2.3. LS225 e LS171 Sarocol

Il contenitore da cui proviene il campione LS225 non ha un'etichetta, ciò non permette di fare speculazioni a riguardo: nasce così la sfida di identificare la sua composizione.

Il nome "Sarcocol" del campione LS171 può riferirsi a una resina semitrasparente o a una gomma importata dall'Arabia.

I risultati ottenuti dall'analisi FT-IR e GC-MS di questi due campioni sono molto simili e illustrano la loro composizione complessa.

Descrizione LS225	
Frammenti compatti di colore giallastro dalla superficie abbastanza liscia e leggermente opaca, sono leggermente appiccicosi e all'interno sono presenti delle bolle e due inclusi rossastri.	
Descrizione LS171	
Un pezzo più grande e compatto accompagnato da minuscole scaglie. Superficie poco uniforme e rugosa di color bruno rossastro in cui sembra accumularsi della polvere provoca dei riflessi gialli (anche spolverando con il pennello non si riesce a rimuoverla). Le scaglie sono di color giallastro.	

▪ FT-IR LS225 (senza etichetta)

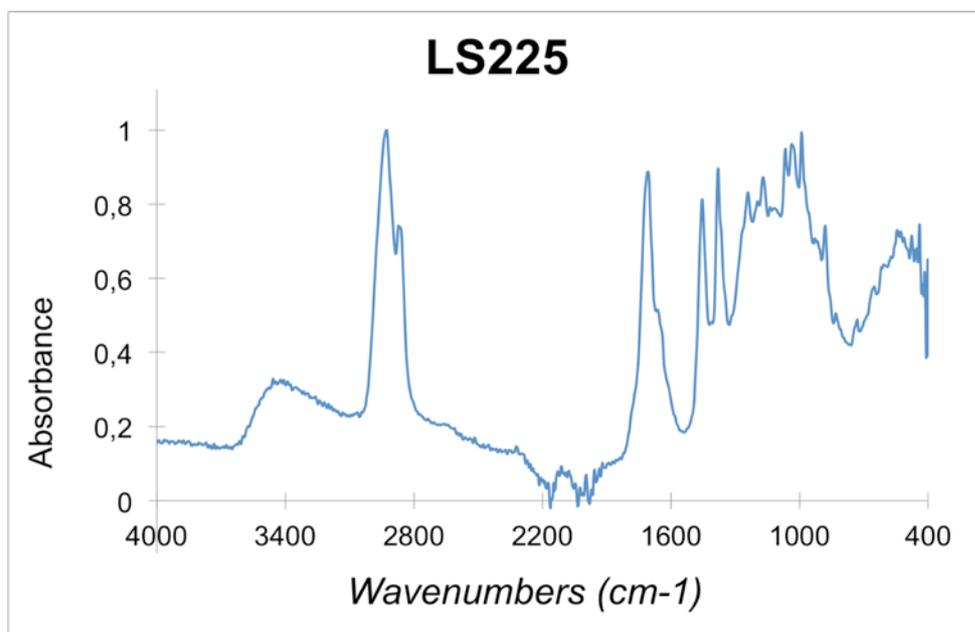


Figura 46: Spettro FTIR-ATR del campione LS225

Tabella 21: Attribuzioni FT-IR del campione LS225

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Functional Groups	Attribution
3397	Stretching O-H	Alcohols
2927, 2860	Stretching C-O Stretching C-H o OH	Alkanes
1707, (1659)	Stretching C=O	
1454, 1379	Stretching C-O	Triterpenoid resin (Dammar resin?)
1241,(1181), 1167, 1036, 1025		
991, 880, 827, 704	Bending out of plane	Diterpenoid resin (Venice turpentine)
632, 587, 525, 477, 440		

La figura 46 mostra lo spettro FT-IR del campione LS 225. In particolare, presenta alcune vibrazioni tipiche dovute alla presenza di composti terpenici.

I picchi a 1454 e a 1379 cm⁻¹ sembrano essere presenti anche nello standard di resina dammar [36], mentre i picchi che cadono tra 1250 e 800 cm⁻¹ sembrano essere più simili a quelli della trementina veneta o comunque a quelli delle resine diterpeniche. Bisogna sottolineare ancora una volta che gli spettri e gli standard riportati in letteratura sono stati analizzati con strumenti diversi e di conseguenza non si possono considerare perfettamente confrontabili.

▪ FT-IR LS171 Sarcocoll

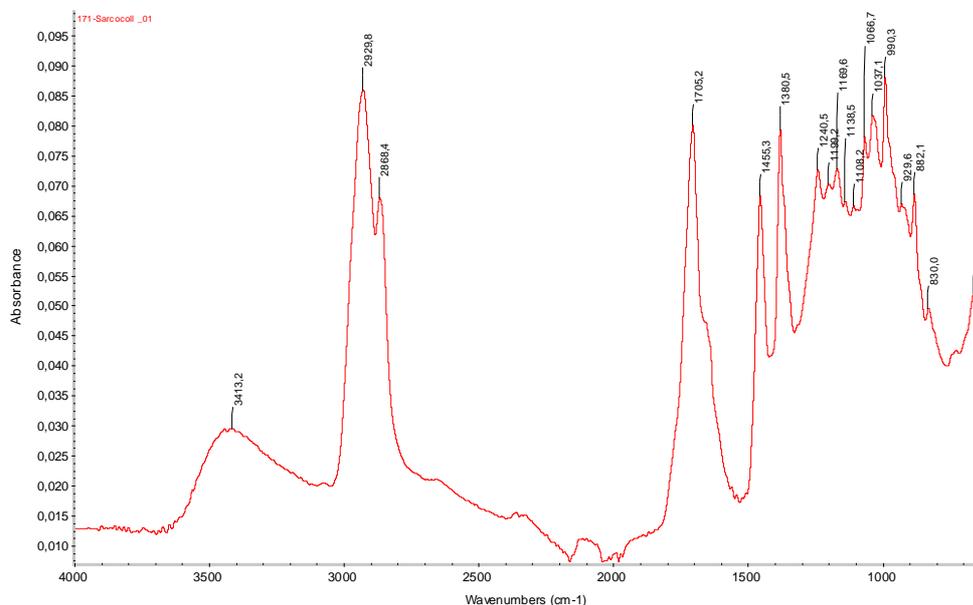


Figura 47: Spettro FTIR-ATR del campione LS171 Sarcocoll.

Tabella 22: Attribuzioni FT-IR del campione LS171

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Functional Groups	Attribution
3413	Stretching O-H	Resina terpenica
1240, 1199, 1169, 1138, 1108, 1066, 1037	Stretching C-O	
2929, 2868	Stretching -C-H	Resina terpenica
1455, 1380	Bending C-H	
1705	Stretching C=O	Resina terpenica
990, 929, 882, (830)	Bending ?	

Per quanto riguarda lo spettro del campione LS171 Sarcocoll (Fig. 47), sembra che i picchi ad alte lunghezze d'onda, ovvero quelli al di fuori della *fingerprint region*, siano confrontabili con quelli che caratterizzano la resina Dammar [36]. I massimi dei picchi relativi al campione sono spostati di 1 o 3 cm⁻¹ rispetto a quelli registrati nello spettro dello standard (*red-shift*). Considerando che gli spettri non sono stati registrati con lo stesso strumento, che in un caso si tratta di un composto puro (lo standard appunto) e che lo strumento utilizzato ha una risoluzione spettrale di circa 5 cm⁻¹, bisogna effettuare ulteriori analisi per poter dire con certezza che si tratti di questo tipo di resina. Potrebbe trattarsi di una miscela resine terpeniche.

▪ GC-MS LS225 e LS171

Entrambi i campioni LS171 e LS225 sono stati sottoposti all'analisi GC-MS e i risultati ottenuti mostrano una composizione del campione complessa molto simile, per questo motivo, d'ora in poi verranno trattati solo i dati relativi al campione LS225.

Il cromatogramma relativo al campione LS225 è rappresentato in figura 49, mentre in tabella 23 viene riportata l'interpretazione dell'analisi cromatografica in base al rapporto m/z.

Di seguito viene riportato il flusso di lavoro seguito per cercare di identificare la composizione del campione LS225 che può essere definito "incognito".

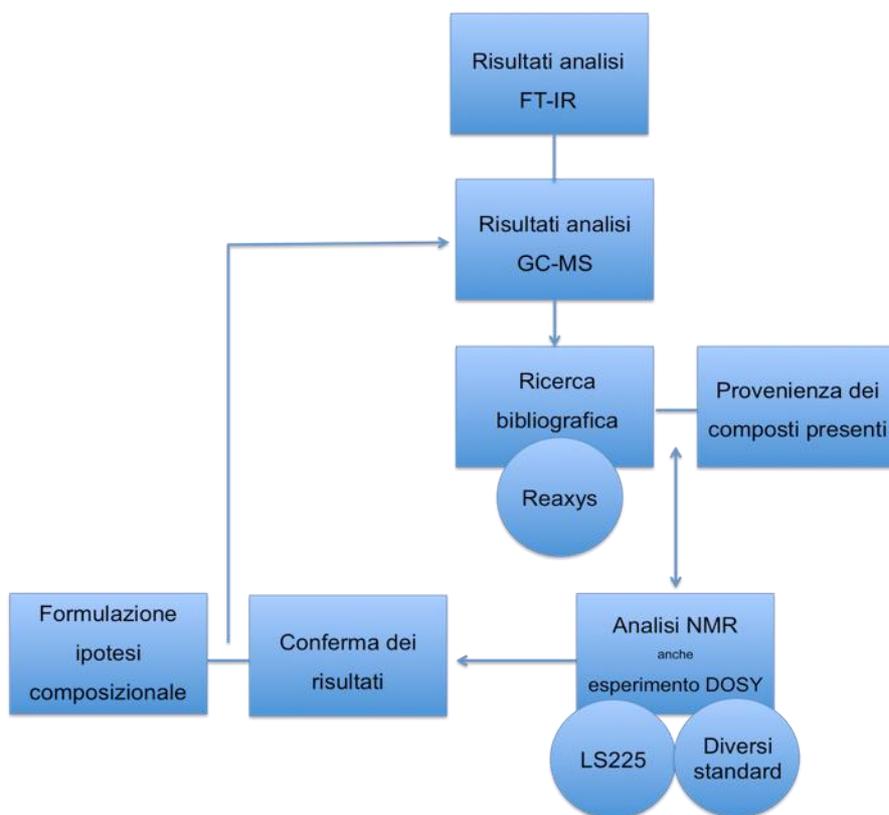


Figura 48: Flusso di lavoro seguito

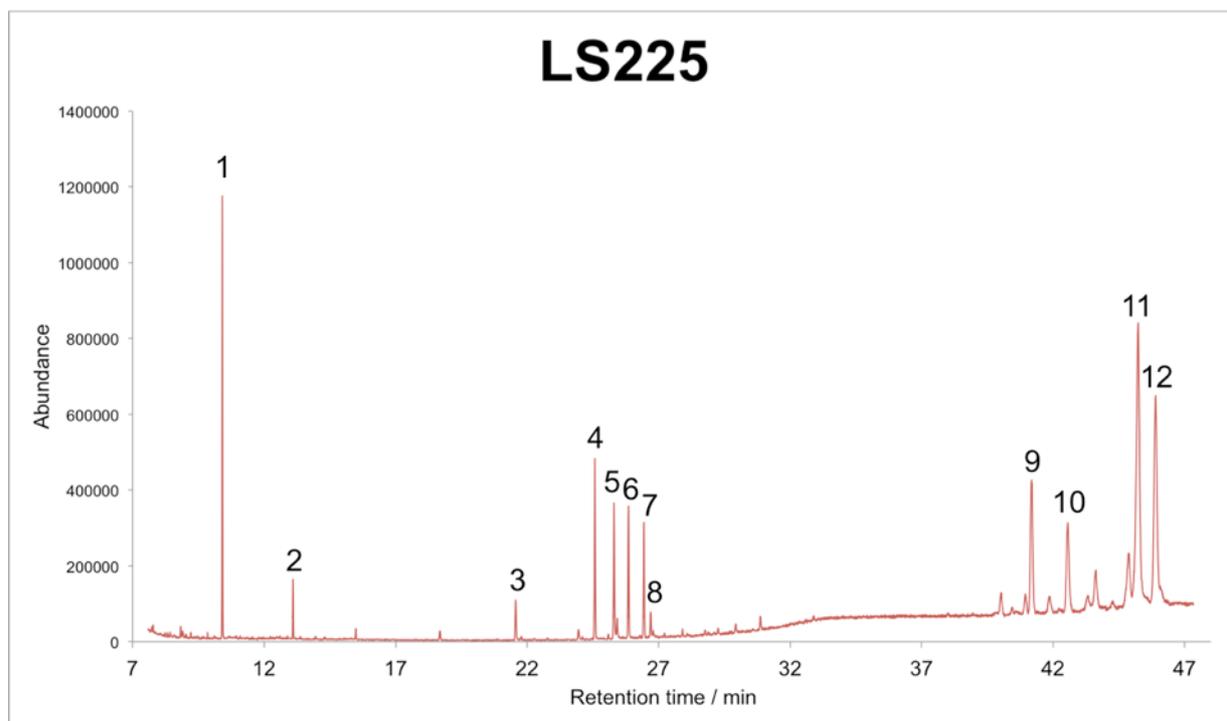


Figura 49: Cromatogramma del campione LS225 derivatizzato

Tabella 23: interpretazione dell'analisi in GC-MS dei campioni LS225 e LS171

LS 225 (without name)			LS171 Sarcocol
Peak number	RT (min)	Composti	RT (min)
1	10.41	Acido decanoico (o caprico) ME	10,17
2	13.09	Acido dodecanoico (o laurico) ME	
3	21.56	Epimannolo	21,32
4	24.57	Acido Nonadecanoico ME (internal standard)	24,16
5	25.30	Larixolo	25,42
6	25.85	Acido Isopimarico ME	25,42
7	26.44	Acido deidroabietico ME	26,01
8	26.69	Larixolo acetato	23,67
9	41.17	Betullina	
10	42.54	Beta- amirina	39,13
11	45.24	Lupeolo o lupenone	40,25 (lupeolo acetato)
12	45.86	Alpha- amirina	41,51
			26,49 Ursa-9(11),12-dien-3-ol

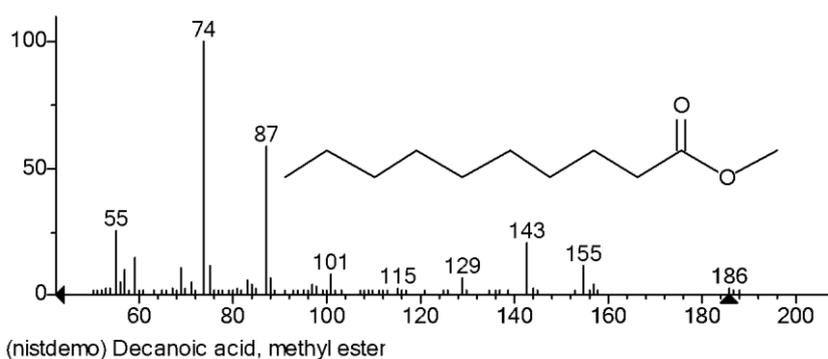


Figura 50: Spettro di massa dell'acido caprico (0:10)

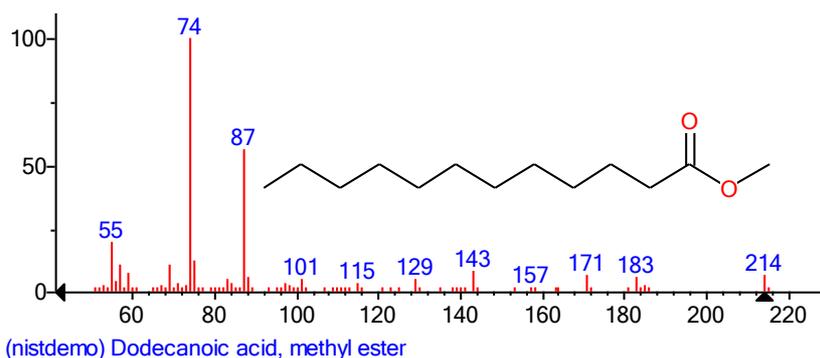


Figura 51: spettro di massa dell'acido laurico (0:12)

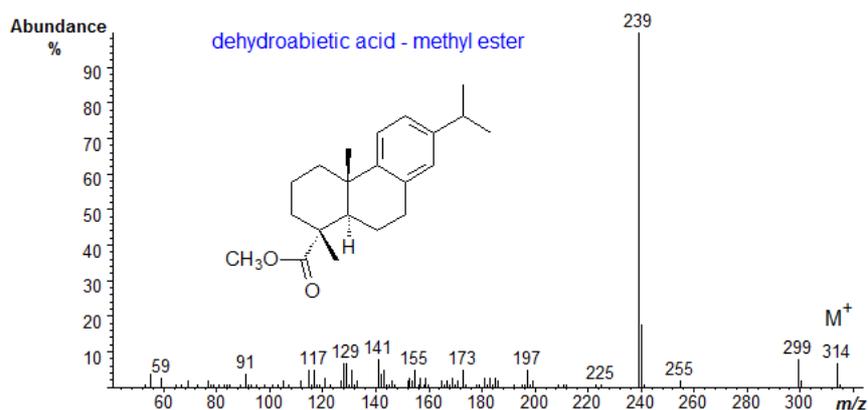


Figura 52: Spettro di massa dell'acido deidroabietico

Dalla Tabella 23 è evidente un'elevata eterogeneità nella composizione della preparazione farmaceutica sconosciuta, sebbene i composti identificati siano principalmente costituiti da materiali di origine vegetale. La presenza di acidi monocarbossilici, cioè acido decanoico e dodecanoico, è visibile nella prima parte del cromatogramma. Durante l'identificazione con GC-MS, la presenza di biomarcatori caratteristici dei diterpeni ha permesso di valutare la presenza di una resina pinacea. Infatti, la presenza simultanea di acido pimarico e acido deidroabietico sottolinea che il materiale contiene una resina ottenuta dalla distillazione di un pezzo di legno della famiglia Pinacee [37]. Inoltre, altri derivati delle resine di conifera sono stati impiegati nella preparazione di questo rimedio sconosciuto: epimannolo, larixolo e larixolo acetato (la cui struttura è riportata nella figura 53) sono stati rilevati da GC-MS. Questi sono considerati biomarcatori per l'identificazione di resine semi-liquide estratte da *Larix decidua*, in particolare la trementina di Venezia (detta anche trementina di larice) [9]. Sono stati rilevati anche triterpenoidi quali betulina, lupeol e alfa / beta-amminina (Figura 53).

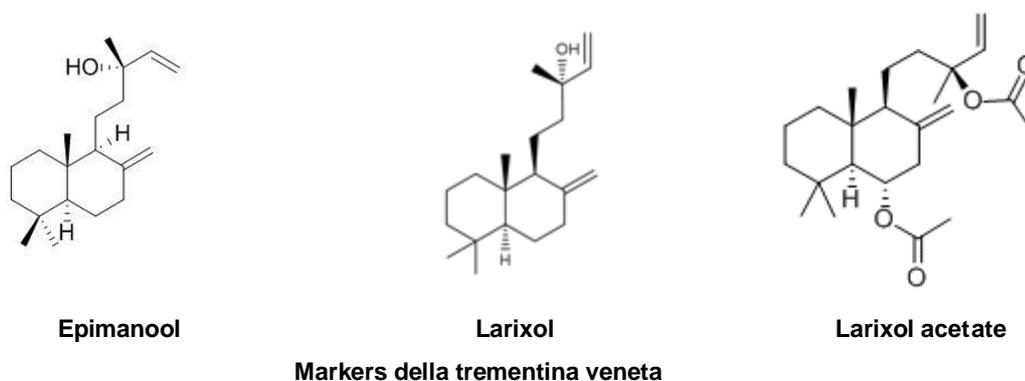
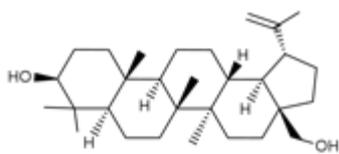
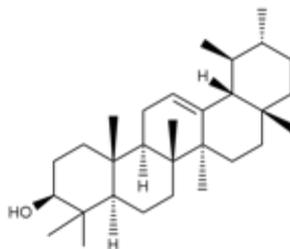


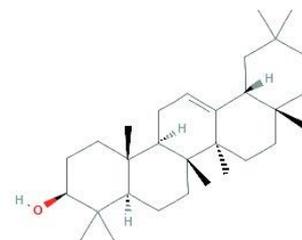
Figura 53-a: strutture dei composti maggiormente presenti nel campione LS 225



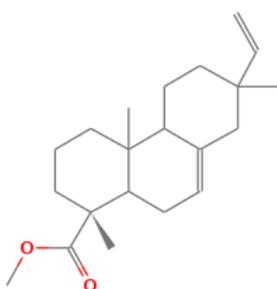
Betullina



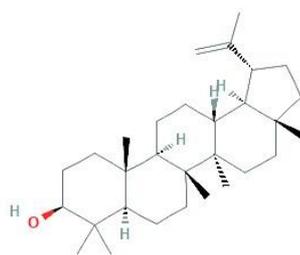
Alfa-amirina



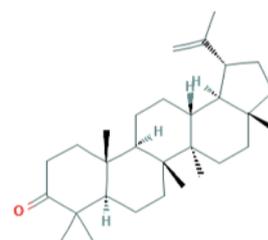
Beta-amirina



Acido isopimarico



Lupeolo



Lupenone

Figura 53-b: strutture dei composti maggiormente presenti nel campione LS 225

Per capire meglio e distinguere tra strutture simili, l'analisi NMR è stata eseguita su questo campione. Lo spettro corrispondente è illustrato nella Figura 54.

▪ **NMR LS225**

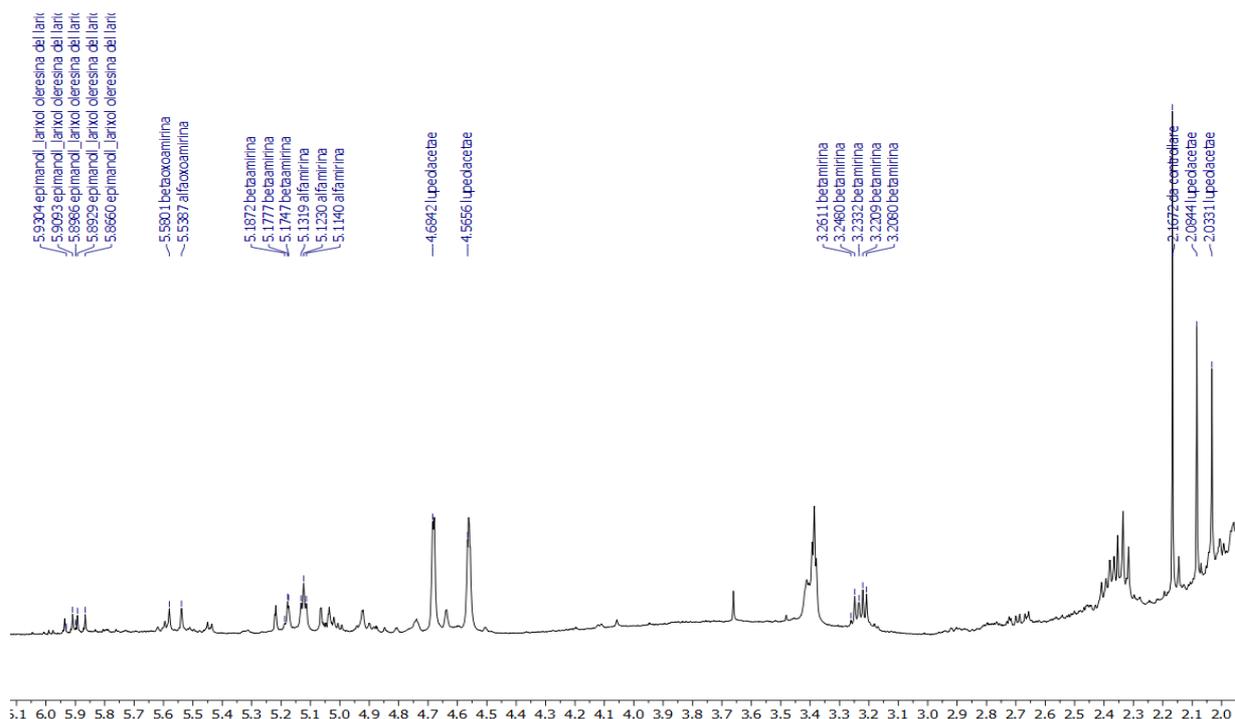


Figura 54: NMR 1H relativo al campione LS225

L'NMR corrobora e conferma i risultati ottenuti con GC-MS: acidi grassi, composti diterpenici e triterpenici sono presenti.

Come riportato in letteratura, Fingolo et al. (2013) hanno isolato e analizzato i prodotti naturali provenienti dalla *Dorstenia arifolia*, un genere erbaceo della famiglia delle Moraceae. Le *Dorsteniae*³³ sono presenti ai tropici, soprattutto in Africa e in Centro e Sud America [38]. medicina popolare, la specie *Dorstenia arifolia* veniva utilizzata come antipiretico, espettorante e anti-infiammatorio, ma le proprietà farmacologiche non sono ancora state studiate [39].

³³ Solo una specie (*Dorstenia indica*) nelle foreste tropicali dell'India meridionale e dello Sri Lanka.

Le piante del genere *Dorstenia* tradizionalmente sono state usate per il trattamento di infezioni, morso di serpente e dolori reumatici [39].

Le specie sudamericane venivano usate nella preparazione di tonici, antipiretici e antidoti nella medicina popolare sudamericana. Ma anche quelle africane venivano impiegate nella medicina popolare dell'Africa occidentale. La ricerca scientifica ha dimostrato che contiene numerosi composti flavonoidi che hanno effetti antimicrobici, anti-trascrittasi e anti-infiammatori. Di seguito vengono riportate le informazioni filogenetiche riguardanti la specie *Dorstenia arifolia*.

Origin: New world; Habit: herbaceous; Geophyte: geophytic; Stem: acaulescent; leaf margin: lobate; Petiole length: long; Pistilloide: absent; Distribution: New world; Leaf variegation: absent; Endosperm size: microspermous; Inflorescence bracts: absent; Storage unit: tuber or rhizome present; Leaf apex: rounded; leaf base: rounded; Stipile: persistent; staminate flower fragment: evenly dispersed [40].

I costituenti chimici della *Dorstenia arifolia* sono cumarine/furanocumarine, flavonoidi, triterpenoidi³⁴ e esteri triterpenoidi. Attraverso lo studio fitochimico sono stati isolati e identificati 18 triterpeni esterificati da acidi grassi, 5 triterpeni senza esterificazione, 12 triterpeni esterificati con acido acetico e solo uno già noto furanocumarina. La maggior parte dei terpeni rivelati in gas cromatografia deriva da α - e β -amirina, due composti che sembrano essere presenti anche nel nostro campione (Tab.23) [38].

Dopo una ricerca approfondita della letteratura sul tipo di pianta (riportata nella Tabella 24), non è possibile stabilire con certezza quale sia esattamente il genere da cui proviene la resina triterpenica, ma possono essere formulate alcune ipotesi.

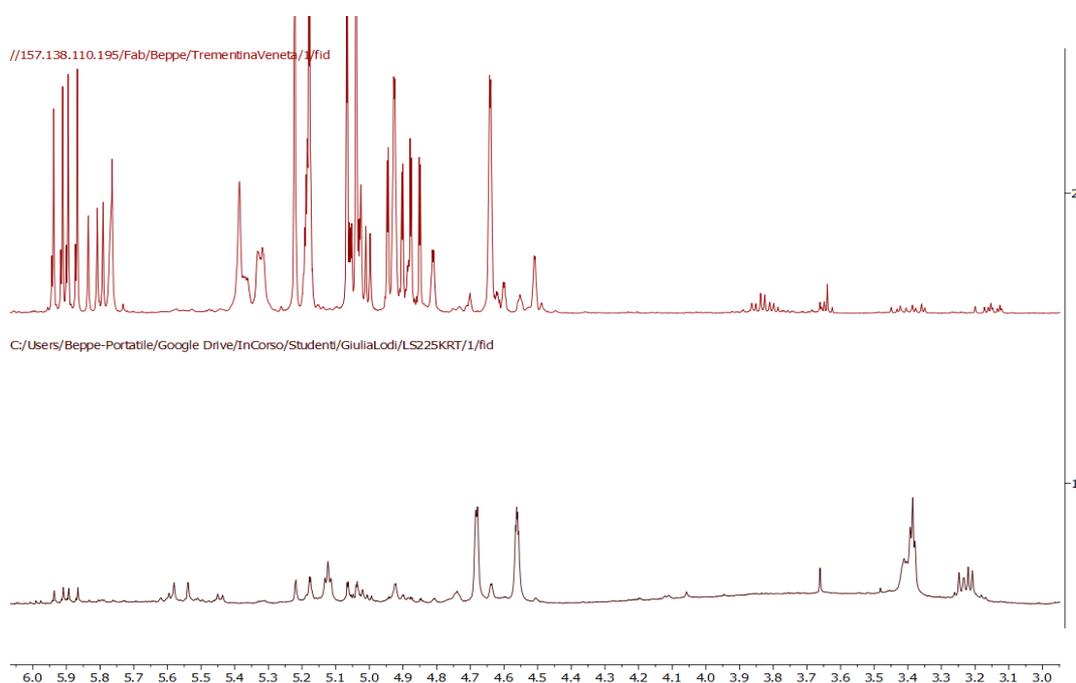


Figura 55: Spettri protonici NMR Trementina veneta e campione LS225

L'acido deidroabietico è presente nelle resine fresche, ma la sua concentrazione tende ad aumentare nel tempo. Nelle resine antiche infatti, la frazione volatile diminuisce mentre la percentuale di diterpeni aumenta: l'acido deidroabietico è presente in gran quantità nelle resine antiche quale prodotto di degradazione degli acidi abietadienici, facilmente degradabili a causa di un doppio legame coniugato [41, 42].

³⁴ I triterpeni sono una classe di prodotti naturali che si trovano soprattutto nelle piante. Gli acidi triterpenici mostrano importanti attività biologiche e farmacologiche, compresi effetti antinfiammatori, antimicrobici, antivirali, citotossici e cardiovascolari. Le piante medicinali contengono i composti α -amirina e β -amirina, conosciuti per le loro proprietà bioattive. Alcuni studi hanno dimostrato che la miscela di triterpeni di α - e β - amirina ha anche molte funzioni biologiche, tra cui proprietà analgesiche, antimicrobiche e antinfiammatorie.

Tenendo conto dei risultati ottenuti da questa indagine incrociata e delle conferme ottenute, si può ipotizzare che i campioni LS225 e LS171 siano una miscela di oleoresina proveniente dal larice (tremontina veneziana) e un essudato proveniente da una pianta di origine sudamericana. Questa miscela avrebbe potuto essere usata come un unguento con uno scopo anti-infiammatorio poiché le strutture steroidei spesso determinano questa proprietà. Plinio nel suo trattato *Naturalis Historia* ha riportato l'utilizzo di una miscela costituita da resine e oli per uso medico. Viene anche descritta la composizione di unguenti profumati: gli ingredienti sono alcune resine e oli, insieme a spezie ed essenze profumate [15].

All'interno del campione sono presenti epimannolo, larixolo e larixolo acetato. La presenza simultanea di questi composti labdanici neutri è determinante per identificare la sostanza da cui provengono, il larixolo e il larixolo acetato infatti sono marker tipici della resina proveniente dal *Larix decidua*, ovvero della tremontina veneta [13, 15, 43].

Sembrano essere presenti anche dei composti ursanici: ursa-9(11),12-dien-3-one e ursa-9(11),12-dien-3-olo [44, 45], ma i picchi nel cromatogramma sono talmente poco intensi che in una miscela così complessa non possono essere confermati con l'NMR.

I composti che sembrano essere presenti in grandi quantità sono composti triterpenici presenti in natura: beta amirina, lupenone, betullina, alfa-amirina, lupeolo acetato. Questi composti (a parte il lupenone) sono già stati identificati tramite le analisi NMR (H^1 , HMBC, Dosy ad alta risoluzione). Si è deciso allora di cercare in letteratura diverse combinazioni di questi composti con lo scopo di risalire al tipo di pianta utilizzato in questo medicamento (Tabella 24)

Tabella 24: Combinazioni dei composti individuati tramite GC-MS e possibile piante li contiene

Composti					Altri composti rilevati in GC-MS	Pianta
Beta-amirina	Lupenone o lupeolo	Betullina	Alfa-amirina	Lupeol acetato		
x			x	x	oleana-9(11),12-dien-3-yl acetate	<i>Dorstenia arifolia</i> (Moraceae) (Brasile) [38]
	x (lupeolo)					<i>Dorstenia harmsiana</i> (Moraceae) (Africa) [46]
	x (lupenone e lupeolo)				acido betulinico (non rivelato in GC)	<i>Dorstenia convexa</i> (Moraceae) (Africa) [47]
x	x (lupeolo)		x	x	Alfa e beta amirina acetate (non rivelati in GC)	<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i> (Asteraceae) (Brasile) [48]
x	x (lupeolo)			x	beta amirina acetata e acido betulinico (non rivelati in GC)	<i>Viscum album</i> (Santalaceae) [49]
	x (lupeolo)			x	amirina acetata (non rivelata in GC)	<i>Ficus benghalensis</i> (Moraceae) (India) [50]

	x (lupenone e lupeolo)		x			<i>Deertongue</i> <i>Scolopendrium officinale</i> <i>C. Odoratissimus</i> [51]
x	x (lupenone e lupeolo)				Acido betulinico (non rivelato in GC)	<i>M. Caesalpinifolia</i> (Brasile) [52]
x	x (lupenone e lupeolo)		x		Acido betulinico (non rivelato in GC)	<i>Phoradendron brachystachyum</i> (<i>Viscaceae</i>) [53]
x	x (lupenone e lupeolo)	x	x			<i>Terminalia brasiliensis</i> (<i>Combretaceae</i>) (Brasile) [54]
x	x (lupenone e lupeolo)	x	x			<i>Byrsonima microphylla</i> (<i>Malpighiaceae</i>) (Brasile) [55]
x	x (lupeolo)	x (in crude extract)	x			<i>Roupala montana</i> (<i>Proteaceae</i>) (Brasile) [56]
x	x (lupeolo)	x (in crude extract)	x	x		<i>Struthanthus syringifolius</i> (<i>Mart.</i>) (<i>Loranthaceae</i>) (Brasile) [56]
	x (lupenone e lupeolo)	x (in crude extract)				<i>Schefflera vinosa</i> (<i>Araliaceae</i>) (Brasile) [56]
x	x (lupenone e lupeolo)		x		Acido betulinico e acido cinnamico (non rivelati in GC)	<i>Anadenanthera colubrina</i> (<i>Mimosaceae</i>) (Sud America) [57]
x	x (lupenone)				Acido betulinico e acido ursolico (non rivelati in GC)	<i>Euphorbia chrysocoma</i> (<i>Euphorbiaceae</i>) (CINA) [58]

Alla luce della ricerca bibliografica sulla tipologia di pianta non si può stabilire con certezza quale sia esattamente il *genus* da cui proviene la resina triterpenica.

I triterpeni rappresentano una classe varia e importante di composti naturali. In tal caso i composti rilevati tramite gas cromatografia sono tutti composti pentaciclici e sono noti per le loro attività antiinfiammatorie. I composti ursanici e gli oleanici differiscono solo per la posizione del gruppo metilico. L'alfa amirina è un triterpene a struttura ursanica mentre la beta amirina presenta una struttura oleanica, sono conosciuti per le loro attività antiinfiammatorie e gastro protettive [59, 60].

I triterpeni di tipo lupano-pentaciclico possiedono diverse proprietà medicinali. Le proprietà antitumorali degli estratti vegetali triterpenici derivati da lupano sono state dimostrate negli ultimi 25 anni per la loro attività citostatica su vari sistemi modello di cancro in vivo. La betullina e il suo acido (l'acido betulinico) fanno parte di questa classe di triterpeni pentaciclici e hanno proprietà antitumorali. Entrambi i composti hanno anche dimostrato di possedere un'attività antiinfiammatoria che è stata attribuita all'inibizione di percorsi non neurogenici. Ricerche precedenti hanno suggerito che l'acido betulinico inibisse la replicazione dell'HIV-1. Inoltre sembrano avere attività antimalariche, antimicrobiche e spasmogeniche [61].

3.2.2.4 Gli altri campioni indagati: LS37 Gumin Kui, LS39 Resin Mechioar, LS174 Balsam S.Ton, LS232 Resin Scamon

La Tabella sottostante (Tab. 25) riporta i risultati ottenuti mediante analisi FT-IR e GC-MS. Come si può osservare, i campioni sono caratterizzati da miscele abbastanza complesse di composti organici. In appendice 1 sono riportati gli spettri IR e GC-MS dei campioni. Questa complessità si riflette nella difficoltà nell'assegnare alcune sostanze. Il nome sull'etichetta non può sempre essere usato come chiave per leggere ed interpretare i dati ottenuti. In alcuni casi, l'etichetta è addirittura assente; in altri, non è stata trovata alcuna corrispondenza tra il nome riportato e i dati ottenuti. Le interpretazioni devono anche tenere conto della presenza di prodotti che possono essere formati seguendo i processi ossidativi naturali dei rimedi farmaceutici, anche all'interno di contenitori sigillati.

Tabella 25: Riassuntiva dei risultati ottenuto tramite FT-IR e GC-MS

Numero campione	Nome Campione	FT-IR	Composti principali rivelati tramite GC-MS	Considerazioni
37	Gumin. Kui	Composti terpenici; gomme? 3210 cm ⁻¹ Stretching O-H 1278,(1243), 1192, 1103, 1058 cm ⁻¹ Stretching C-O 1602 1518 cm ⁻¹ Stretching C=C	Benzene (Dimethoxy- , trimethoxy-, Tetramethoxy- and Pentamethoxy-) Acido Benzoico (Methoxy-, Dimethoxy- and trimethoxy-) ME Fatty acids (Acido Palmitico , acido tridecanoico e acido heptanoic dimethyl) ME Acido Metossi- Succinico diME acido Abietico Dibutil ftalato	Campione abbastanza complesso contenente acidi carbossilici aromatici
39	Resin Mechioar	Derivato della resina Shellac ? 3383 cm ⁻¹ Stretching O-H 1259, 1129, 1056 cm ⁻¹ Stretching C-O-C 1025 cm ⁻¹ Stretching C-O 2926, 2856 cm ⁻¹ Stretching -C-H 1450, 1376 cm ⁻¹ Bending -CH ₂ 1707 cm ⁻¹ Stretching C=O 1638, (1511) cm ⁻¹ Stretching C=C 893, 839, 804, 767,729 cm ⁻¹ bending OOP	Acido Cinnamico ME Acidi grassi (tridecanoic acid , capric acid, palmitic acid, oleic acid, stearic acid, nonandecanoic acid) Tridecanone	Campione abbastanza complesso contenente una frazione lipidica (acidi grassi) e acidi carbossilici aromatici
174	Balsam S.Ton	Composti terpenici (diterpenoidi?) 3385 Stretching O-H 1242, 1197, 1111; Stretching C-O; Diterpenoid resin (Pinaceae or cupressaceae) 2931, 2874 Stretching -C-H 1378; Bending C-H; Diterpenoid resin (Pinaceae or cupressaceae resin) 1688, (1641) Stretching C=C 1450; Stretching C=C; Diterpenoid resin (Pinaceae or cupressaceae resin)	Monoterpenes (Camphor, Borneol, Endoborneol) Benzyl alcohol Cedrol acido Geranico Acido tereftalico	Miscela abbastanza complesse di composti balsamici (monoterpeni e olii essenziali). l'acido geranico è tipico della Dammar invecchiata

232	Resin scamon	<p>Miscela complessa di terpeni e acidi grassi</p> <p>3408 cm⁻¹ Stretching O-H 2949, 2923 cm⁻¹ Stretching -C-H from CH₃ and CH₂ 2852 cm⁻¹ Stretching C-H 1719 cm⁻¹ Stretching C=O 1637 cm⁻¹ Stretching C=C 1450 cm⁻¹ Metilene -CH₂</p>	<p>Coryanthin Rhamnopyranosil (scammonic acid) Fatty acids (Capric acid, pentadecanoic acid, myristic acid, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, dimethyl-undecanoic acid, tridecanoic acid) ME Hydroquinone Glucopyranoside (scammonic acid) Esadecanol diMethoxy-cinnamic acid ME Myristic alcohol Methoxyxadecanoate Dimethyl tridecanoate <u>Dehydroabietic acid ME</u></p>	<p>Miscela estremamente complesse di resina di scammonne, acidi grassi (olio vegetale con insaturazione), carboidrati.</p> <p>Coryanthin è un alcaloide della Amsonia elliptica brevifolia [62]. Rhamnopyranosil e Glucopyranoside sembrano essere dei pezzi di Acido scammonico, un acido glucosidico che Noda et al. (1990) trovano essere il maggior costituente della resina scammonia. Radice di scammonne, cioè la radice di Convolvulus scammonia L., e la sua resina estrattiva di etanolo, scammonne, è stata usata come purgante in Europa. L'ingrediente attivo è noto per essere il cosiddetto glicoside di resina che è caratteristico di piante convolvulacee. La prima sostanza chimica l'indagine su questa resina è stata effettuata da Johnston. Nel 1858, Spigatis esaminò l'etere-solubile porzione della resina (scammonina) e ha riferito che su idrolisi acida dava glucosio e acido idrossi-grasso. [63].</p>
88	Gum. Gutt	<p>Gomma polisaccaridica?</p> <p>3319 (3060) cm⁻¹ Stretching O-H 2968, 2924 cm⁻¹ Stretching -C-H from CH₃ and CH₂ 2846 cm⁻¹ ν(C-H) from CH₃ 1735 Ketone, ester 1687 cm⁻¹ Stretching C=C 1629 1590 cm⁻¹ Stretching C=C 1433, (1401), 1378, 1330 cm⁻¹ bending CH₂ CH₃</p>	<p>Acidi grassi (Acido palmitico, stearico) TMSE monomeri saccharidici (Arabinosio mannosio o galattosio ?) TMS</p>	<p>Miscela abbastanza complessa di monosaccaridi e acidi grassi. Grazie alla preparativa specifica sono stati identificati Arabinosio, mannosio e galattosio.</p>

3.2.3 Lipidi, misti e proteine,: LS139 Sen Synap Alb, LS142 Babam odintalg, LS26 Bezoar, LS223 Ladon

La Tabella sottostante (Tab.26) riporta i risultati ottenuti mediante analisi FT-IR e GC-MS, i cui spettri sono riportati in appendice 1. Anche in questo caso si tratta di miscele abbastanza complesse di composti organici.

Tabella 26: Riassuntiva dei risultati ottenuti tramite FT-IR e GC-MS

Numero campione	Nome Campione	FT-IR	Composti principali rivelati tramite GC-MS	Considerazioni
139	Sen Synap. Alb.	Acidi grassi 1708 cm ⁻¹ Stretching C=O (3008), 2923, 2853 cm ⁻¹ Stretching CH ₂ 1282, 1242, 1164, 1095 cm ⁻¹ Stretching C-O; 1460 cm ⁻¹ O-H in plane; 943 721 cm ⁻¹ O-H out of plane	Glucoside Azelaic acid Penta methyl glycoside Saturated Fatty acids (palmitic acid , stearic acid, arachidic acid, behenic acid) Unsaturated Fatty acids (Oleic acid, Gondoic acid, Erucic acid, Nervonic acid) ME	Questi semi risultarono essere semi di senape, grazie alla presenza di specifici biomarcatori (acido gondoico, acido erucico).
142	Babam odintalg	Acidi grassi, protein? Terpeni? 2927, 2864 Stretching C-H alkane; 1701 Stretching C=O ester; 1635, 1601, 1512, 1450 Stretching C=C Alkene; (1375) 1268, 1203, 1159, 1114, 1069, 1027; Stretching C-O	Hydrocinnamic aldehyde Cinnamic acid ME Vanillin methyl ether Patchoulene Veratric acid ME Fatty acids (palmitic acid , oleic acid, stearic acid) ME Methyldehydroabietate Junicedric acid	Miscela complessa di composti terpenici, composti balsamici e acidi grassi. L'acido Junucedrico sembra essere uno dei terpeni che costituiscono l'Araucaria araucana, una piante di origine argentina che veniva usata per il trattamento contusioni, ulcere, per aiutare la cicatrizzazione ed era anche applicata ai ferite [64]
26	Bezoar	Carboidrati ?	Acido Dimetossi-benzoico Acidi grassi (acido palmitico, acido stearic) ME	Campione contenente una frazione grassa e carboidrati probabilmente dalla radice di una pianta della famiglia Moracee
223	Ladon	Carbohydrate?; terpenic compounds; fatty acids	Hydrocinnamic and cinnamic acid ME Dimethoxybenzaldehyde Azelaic acid ME Benzoic acid ME Fatty acids (myristic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid) ME Manoyloxide and dihydromanoyloxide Norambleninolide Larixol Methyl-hydroxy-diepoxy-abietanoate	Miscela estremamente complessa contenente la resina 'Ladano' di Cistus creticus, altri diterpeni di pino e larice, acidi grassi. Laudanum: utilizzato per creare profumi, non in medicina. [65] Fin dall'antichità, il nome greco comune di questa resina è "Ladano". Questa resina è usata nella medicina popolare per il trattamento di diverse malattie e nel industria cosmetica [66].

I fenoli sono uno dei principali gruppi di micronutrienti presenti nel mondo vegetale e costituiscono una parte importante della dieta umana e animale. Presentano diverse strutture e attività chimiche e comprendono più di 8000 diversi composti. La maggior parte di questi composti sono potenti antiossidanti necessari per il corretto funzionamento delle cellule vegetali [10]. Gli acidi fenol-carbossilici (acido benzoico e cinnamico e i loro derivati) sono i costituenti di molte specie del regno vegetale (piante, frutta secca). Nel set di antichi medicinali sono anche presenti cortecce d'albero che venivano impiegate anche per uso cosmetico e fragranza [30].

Lo scheletro cinnamico è considerato un'impalcatura interessante per il sviluppo di nuovi antimicrobici, tuttavia si sa poco sul suo meccanismo antimicrobico di azione [67].

L'estratto di propoli è una miscela estremamente complessa di sostanze naturali, designa una serie di gomme, resine e balsami di consistenza viscosa che provengono da boccioli e le cortecce delle piante. Contiene aminoacidi, acidi fenolici, esteri di acido fenolico, flavonoidi, acido cinnamico, terpeni e acido caffeico.

La propoli è stata usata nella medicina popolare in tutto il mondo. È stato dimostrato che possiede attività antiinfiammatorie, immunostimolatorie, antivirali e antibatteriche [68].

3.3 Considerazioni finali

Questo studio si è dimostrato complesso a causa dell'eterogeneità dei campioni e a causa della difficoltà nel reperire informazioni sulla loro composizione e sul loro impiego. Inizialmente sono stati suddivisi i campioni in base all'osservazione al microscopio e ai risultati delle analisi spettroscopiche. Poi si è cercato di approfondire lo studio svolgendo analisi cromatografiche utilizzando preparative diverse per ogni sottoclasse.

Gli scopi di questo lavoro sono quelli di indagare la composizione chimica degli antichi medicinali e di trovare, quando possibile, una corrispondenza tra i risultati analitici ottenuti e il nome scritto sull'etichetta. Questo però non è sempre stato possibile a causa della difficoltà nel reperire informazioni bibliografiche che confermino i risultati delle analisi chimico-fisiche eseguite sui campioni reali. Per tal motivo la maggior parte dei campioni si può considerare come incognita; questo genera una sfida soprattutto per quanto riguarda l'interpretazione dei dati a causa della vasta gamma di classi di composti presenti, della frequente presenza di prodotti di degradazione e delle piccole quantità di materia antica disponibili [30].

Nella seguente tabella (Tab. 27) sono riassunti i risultati complessivi di questa campagna di analisi.

Tabella 27: Riassuntiva dei risultati ottenuti analizzando i campioni

Numero campione	Nome campione	Descrizione	FT-IR	HPLC	GC-MS	NMR
LS5	Tinct. Cascarilla	Piccoli frammenti irregolari color bruno Osservato in epi-fluorescenza presenta la fluorescenza caratteristica della clorofilla	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?	Amido		
LS101	Cascarilla	Frammenti piccolissimi (dell'ordine di 0,1 mm) che sembrano color legno	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?	Amido	Acidi carbossilici e fenolici	
LS7	E.coca	Frammenti che sembrano essere di natura legnosa. Osservato in epi-fluorescenza presenta la fluorescenza caratteristica della clorofilla	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?	Acido carbossilico e derivati, Amido, derivato della cocaina (famiglia della cocaina), acido benzoico, derivato dell'acido cinnamico		
LS27	Diapente	Frammenti irregolari	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?	Amido		
LS48	Mirabol Citrin	Corpo principale compatto dalla superficie scabrosa di color bruno rossastro. Da questo di sono sfaldati dei piccoli frammenti dello stesso colore.	Sembra essere un carboidrato diverso dall'amido perché non presenta gli stessi picchi caratteristici.	?		
LS56	Gran Paradis	Si tratta di pezzi compatti di forma sferica irregolare che si macinano con difficoltà a mortaio. Sembra si tratti di "palline" di legno archeologico.	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?	Amido, fenoli, cocaina		

# campione	Nome	Descrizione	FT-IR	HPLC	GC-MS	NMR
LS112	Santonico	Piccoli frammenti lignei irregolari	Amido + gommoresina ? + sostanza estrattiva?	derivati dell'acido carbossilico, Amido		
LS115	Lig Aloe	Due pezzi di grandi dimensioni (si misurano in cm). Manifestano una struttura simile a quella di una corteccia. Osservato in epi-fluorescenza presenta la fluorescenza caratteristica della clorofilla	Amido + Fenoli? Lignina? + cellulosa	Amido, caffeina	Acidi fenolici	
LS164	Lig. Aspal	Grossi frammenti lignei	Amido + Fenoli? Lignina? + cellulosa	Amido		
LS198	Fung Malit	Frammenti piccoli irregolari di colore bruno-rossastro e frammenti allungati con all'interno dei cristalli trasparenti.	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?	Amido, caffeina		
LS192	Anis Stellat	Tipici frammenti legnosi a forma di stella che contraddistinguono l'anice stellato. Conserva ancora una nota di profumo caratteristico. Osservato in epi-fluorescenza presenta la fluorescenza caratteristica della clorofilla	Amido + altri composti? Tracce di fenoli ?	fenoli		
LS227	Carb.Amm. Pyro oleos	Frammenti abbastanza grossi rispetto a quelli dei campioni precedenti. Color bruno scuro.	Fenoli + ?	Acido carbossilico e derivati, Amido, caffeina		
LS230	No se lee	Minuscoli frammenti quasi trasparenti che variano colore dal rosso-brunastro al giallo pallido passando per diversi toni aranciati.	?	?		

# campione	Nome	Descrizione	FT-IR	HPLC	GC-MS	NMR
LS63	Diagrid	Unico frammento compatto di colore nero totalmente opaco. La forma caratteristica a mezza luna fa pensare a una pillola rotta a metà. La superficie non è perfettamente liscia. Per tagliarlo con il bisturi si deve imprimere parecchia forza.	Amido + ?	Amido	X	
LS92	Mechoacan	Frammento grande e poroso di colore beige. È totalmente opaco e molto duro. Non si taglia facilmente con il bisturi	Amido + ?	Amido, fenoli		
LS141	Paolinia	Piccoli frammenti semi-trasparenti. Il colore varia dal bruno-rossastro al bianco.	Amido + ?	Amido, fenoli, caffeina		
LS103	Magist. Mart	Frammenti irregolari di color nero, lucidi in alcune aree.	Non presenta uno spettro simile a quello dell'amido Altra tipologia di glucide? Zuccheri(=mono o disaccaridi)	Amido		
LS23	Albumina	Frammenti di diverse misure di color giallo pallido trasparente.	Proteina: Albumina			
LS143	Viper Pulv	Piccoli frammenti allungati trasparenti.	Proteine			
LS201	Oss.cord. cerv.	Pezzi color beige abbastanza porosi. Sembrano pezzi di osso	Proteine			
LS223	Ladon	Il campione è composto da un corpo di dimensioni maggiori e da piccoli frammenti che si sono staccati in modo irregolare. La massa di dimensioni maggiori è di colore nero ed è completamente opaca, ha un aspetto butterato.	Carboidrati? terpeni e acidi grassi		Miscela estremamente complessa contenente la resina 'Ladano' di Cistus creticus, altri diterpeni di pino e larice, acidi grassi.	

# campione	Nome	Descrizione	FT-IR	HPLC	GC-MS	NMR
LS37	Gumin Kui	Frammenti irregolari con colorazioni diverse, alcuni più tendenti a un bruno-verdastro, altri bruno-rossastro. Non sono completamente trasparenti, presentano una velatura opaca. La superficie è abbastanza liscia. Sono leggermente appiccicosi.	Composti terpenici; gomme?		Campione abbastanza complesso contenente acidi carbossilici aromatici.	
LS39	Resin Mechioar	Frammenti molto piccoli (dell'ordine di 0,1mm). Colorazione bruno-rossastra. I frammenti non sono completamente trasparenti, presentano una velatura opaca. All'interno sembrano essere presenti delle micro-bolle. I frammenti sono leggermente appiccicosi e sembrano avere una densità maggiore rispetto agli altri campioni.	Derivato della resina Shellac?		Campione abbastanza complesso contenente una frazione lipidica (acidi grassi) e acidi carbossilici aromatici	
LS81	Benzoin	Un pezzo compatto e minuscoli frammenti leggermente appiccicosi. Colorazione bruno-rossastra. La superficie è scabrosa, sembrano essere presenti dei micro-inclusi di colore più scuro.	Resina fenolica (Resina benzoio)		Campione abbastanza complesso contenente una miscela di resina benzoio (Styrax) e acidi grassi. Sono presenti anche composti volatili (come il toluene)	Confermato Acido benzoico monosostituito e individuata vanillina DOSY: presenti molecole piccole (ex. Acido benzoico) e altre molecole con un raggio idrodinamico molto diverso che hanno un coefficiente di diffusione molto più alto. Quindi Miscela complessa
LS88	Gum Gut.	Corpo di dimensioni maggiori e frammenti di forma triangolare. Superficie abbastanza liscia, ma all'interno sembrano essere presenti piccole bolle. Colorazione bruno-giallastra.	gomma polisaccaridica ?		Miscela abbastanza complessa di monosaccaridie acidi grassi (N.B. è stata utilizzata la preparativa per gli zuccheri)	

# campione	Nome	Descrizione	FT-IR	HPLC	GC-MS	NMR
LS111	Gum. Dragant.	Frammenti di notevoli dimensioni rispetto ai frammenti descritti in precedenza. Superficie poco uniforme e rugosa in cui sembra accumularsi della polvere (anche spolverando con il pennello non si riesce a rimuoverla).	Ghatti gum?			
LS119	Res. Guajac	Piccoli frammenti alcuni sono traslucidi, altri presentano un velo opaco. Sono di diversa forma e colore (bruno, bruno-rossastro, rosso-giallastro, grigiastro e trasparente). Leggermente appiccicosi.	Fenoli, esteri, acido guaiacnico		Miscela complessa di resina di Guaiacum e una frazione grassa	Miscela molto complessa, identificati: Vanillina, acido veratrico, acido guaiacnico
LS193	Guiaco Resina	Frammenti minuscoli (μm) di forma e colore diverso: alcuni sono allungati e sottilissimi, somigliano quasi a scaglie, altri sono più simili a dei parallelepipedi. Variano dal color bruno-rossastro al giallastro, alcuni sono leggermente opachi, altri traslucidi. Tutti presentano all'interno delle micro-bolle. Sono leggermente appiccicosi.	Fenoli, esteri, acido guaiacnico (spettro sovrapponibile a quello di LS119)		Miscela complessa di resina di Guaiacum e una frazione grassa (composizione simile a LS119)	Miscela molto complessa identificati: Vanillina, acido veratrico, acido guaiacnico
LS130	Gum. Lacc	Resto unico, compatto e massiccio. Colorazione nera.	Non presenta i picchi caratteristici della resina Shellac			
LS171	Sarcocoll	Un pezzo più grande e compatto accompagnato da minuscole scaglie. Superficie poco uniforme e rugosa di color bruno rossastro in cui sembra accumularsi della polvere provoca dei riflessi gialli (anche spolverando con il pennello non si riesce a rimuoverla). Le scaglie sono di color giallastro.	Resina terpenica (Dammar?)		Miscela molto complessa di acidi grassi, resine diterpeniche (resina di pino e trementina veneta) e composti triterpenici (amirine e lupeolo).	

# campione	Nome	Descrizione	FT-IR	HPLC	GC-MS	NMR
LS174	Balsam S.Ton	Scaglie irregolari di colore giallo chiaro quasi bianco e giallo intenso. Presentano delle bolle piccolissime all'interno e anche degli inclusi piccolissimi di colore leggermente più scuro. Sembrano avere una densità decisamente inferiore rispetto a quella degli altri campioni.	Composti terpenici (diterpenoidi: resina pinacea o cipressacea)		Miscela abbastanza complesse di composti balsamici (monoterpeni e olii essenziali).	
LS178	Sin Etiqueta	Frammenti di colore bianco opaco dalla superficie scabrosa. Nelle scanalature si insinua una polvere nera che ormai è inglobata del campione.	?		X	
LS225	Sin identificar	Frammenti compatti di colore giallastro dalla superficie abbastanza liscia e leggermente opaca, sono leggermente appiccicosi e all'interno sono presenti delle bolle e due inclusi rossastri.	Composti terpenici		Miscela molto complessa di acidi grassi, resine diterpeniche (resina di pino e trementina veneta) e composti triterpenici (amirine e lupeolo). (simile a LS 171)	
LS232	Resin Scamon	Frammenti irregolari di colore bruno con qualche riflesso giallo-verdastro, presentano un leggera opacità superficiale	Miscela complessa di terpeni e acidi grassi		Miscela estremamente complesse di resina di scamone, acidi grassi (olio vegetale con insaturazione), carboidrati.	

# campione	Nome	Descrizione	FT-IR	HPLC	GC-MS	NMR
LS139	Sen synap Alb	Forma rotonda, di colore marrone chiaro. Sembra trattarsi davvero di un seme.	Acidi grassi		Questi semi risultarono essere semi di senape, grazie alla presenza di specifici biomarcatori (acido gondoico, acido erucico).	
LS26	Bezoar	Piccoli frammenti irregolari di colore bruno.	Carboidrati ?		Campione contenente una frazione grassa e carboidrati probabilmente dalla radice di una pianta della famiglia Moracee	
LS59	Lans. Fer Rubr.	Frammenti irregolari dell'ordine di grandezza dei mm. Colore bruno, superficie scabrosa da un lato più butterata rispetto all'altro.	?			
LS142	Babam odintalg	Frammenti di color bruno-rossastro, presentano una leggera opacità. La superficie è scabrosa. Presenza di probabili bolle interne	Acidi grassi, proteine? Terpeni?		Miscela complessa di composti terpenici, composti balsamici e acidi grassi.	
LS67	INSECT	Tanti frammenti separati dell'ordine dei μm che sembrano essere la cuticola di un insetto.	No	No	No	No

La presenza dell'amido in alcuni di composti è riconducibile al fatto che si tratta del carboidrato di riserva dei vegetali. Il glucosio viene immagazzinato al loro interno sotto forma di amido in qualità di fonte energetica, viene poi sintetizzato per via enzimatica partendo dal glucosio che viene prodotto dalla fotosintesi clorofilliana [5].

Gli acidi fenol-carbossilici (acido benzoico e cinnamico e i loro derivati) individuati possono essere interpretati come costituenti di molte specie del regno vegetale (piante, frutta secca). Nel set di antichi medicamenti sono anche presenti cortecce d'albero che venivano impiegate anche per uso cosmetico e fragranza [30].

La presenza di alcuni acidi grassi (acido palmitico, acido oleico, acido stearico) può essere spiegata dall'uso di olii come veicolanti per prendere il rimedio/per ridurre la viscosità del balsamo e come base per miscelare più ingredienti "esotici" [30]. La presenza in quantità elevata di acido oleico mostra un basso grado di ossidazione e suggerisce che l'ossidazione del materiale organico non è completata. Ciò può essere correlato alla chiusura dei contenitori: probabilmente erano sigillati così bene da rallentare i processi di ossidazione.

Per quanto riguarda le resine naturali, si fa riferimento alla figura 56 che rappresenta la vastità di utilizzo che le vede protagoniste, ma in questo caso sembrano essere state utilizzate come unguento con uno scopo anti-infiammatorio (la struttura steroidea determina questa proprietà). Molte sembrano essere essudati di piante importate dall'America e si ipotizza potessero essere state utilizzate in miscela secondo antiche ricette.

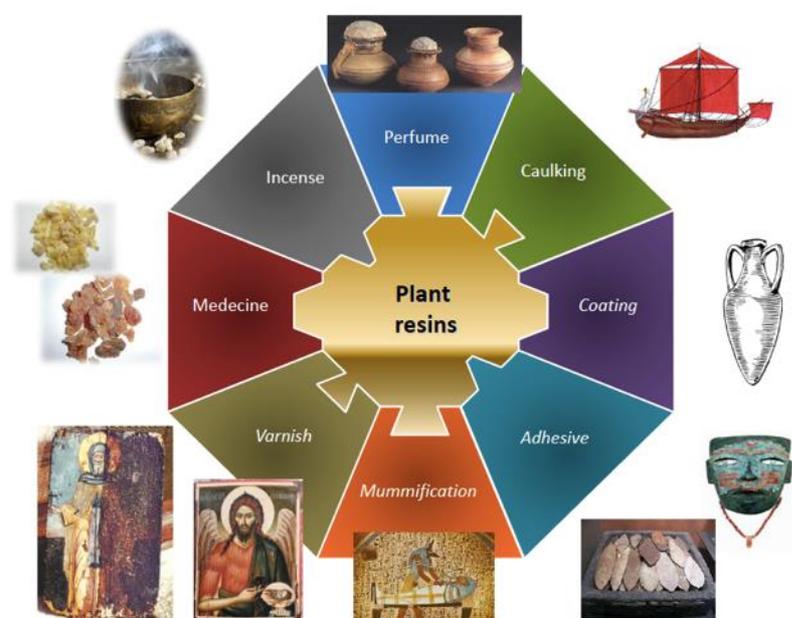


Figura 56: utilizzo delle resine vegetali [30].

3.3.1 Usi e provenienza dei medicinali studiati

In questa sezione viene riportata una tabella riassuntiva che interessa tutti i campioni studiati. Come già detto in precedenza, la difficoltà dello studio era insita anche nella difficoltà riscontrata nel trovare fonti che fornissero una connessione tra la composizione del farmaco e i nomi riportati sui contenitori. Per questo motivo di seguito sono riportate le informazioni ottenute relative a meno di un terzo dei medicinali.

In generale si può affermare che, come riportato da studi farmacologici riportati in letteratura, molte resine e oleoresine hanno proprietà antisettiche, antinfiammatorie, antibatteriche e venivano impiegate in cosmetica o come profumi o nell'incenso [65].

ID	Nome del medicamento riportato sull'etichetta	Nome botanico del medicamento	Nome scientifico della pianta	Paese di origine del campione riportato sull'etichetta	Nome scientifico (provvisorio) secondo la nomenclatura moderna	Uso
5 / 101	Cascarilla/ Tinct. Cascarilla	Corteccia di Cascarilla	Croton eluteria	indie occidentali	Croton eluteria (L.) W.Wright	Usato come tonico (Flückiger) utilizzato per trattare febbri, malaria, dissenteria, dispepsia e come digestivo, aromatico amaro, stimolante aromatico e tonico del corpo. olio essenziale come componente di fragranza in saponi, detergenti, creme, lozioni e profumi
7	Estratto di coca	E. coca Bolivian or Huánuco coca (E. coca var. coca) Truxillo coca Columbian or Java coca Amazonian coca cocaine plant, and spadic.	Erythroxylum coca L. E. novogranatense var. truxillense E. novogranatense var. novogranatense E. coca var. ipadu	America del Sud		Anestetico locale, principalmente per gli interventi che interessavano cornea, naso e gola. per alleviare la fame, la stanchezza, i dolori reumatici, l'asma, il mal di stomaco, la stitichezza, la nausea, i crampi, diarrea, malessere generale, mal di montagna, disturbi mentali, emorragia, amenorrea. Stimolante del sistema nervoso centrale. crea dipendenza
115	Lig. aloe	Aloe	Aloe vera			Purgative Il gel di aloe è ampiamente usato per alleviare le ustioni termiche e le scottature solari e per promuovere la guarigione delle ferite. Il gel di aloe e talvolta l'aloè della droga sono usati in varie formulazioni cosmetiche e farmaceutiche come idratanti, emollienti o agenti di guarigione delle ferite. La frazione grassa della foglia viene utilizzata nell'industria cosmetica come trasportatore di pigmenti.

192	Anis Stellat	Star anise o Illicium verum	Pimpinella anisum L		Illicium verum Hook. F. (before 1888 Illicium anisatum L.)	Carminativo, diuretico, espettorante e stimolnte (dell'appetito, della secrezione del latte) che può anche essere bruciato come incenso. Veniva utilizzato anche trattamento per l'epilessia e le convulsioni. spasmodici leggeri, antibatterici deboli ed espettoranti nelle miscele per la tosse e nelle losanghe. utilizzato internamente per disturbi dispeptici; esternamente come inalante per la congestione del tratto respiratorio. Entrambi gli oli sono usati per mascherare indesiderabili odori in prodotti farmaceutici e cosmetici e come componenti di fragranza in dentifrici, profumi, saponi, detergenti, creme e lozioni,
223	Ladon	Ladanum			Cistus creticus L. (syn: Cistus À~ incanus subsp. creticus	Usato in profumeria
81	Benzoin	Benzoin resin Gum benjamin, gum benzoin, Siam benzoin, Sumatra benzoin	Genere: Styrax (Styraceae) Specie: Styrax benzoin e Styrax <i>Paralleloneurum</i> (Sumatra benzoin), <i>Styrax officinalis</i> (styrax).	Siam/Sumatra	Styrax benzoin Dryand.	Terapeutico (proprietà antinfiammatorie, disinfettanti, astringenti espettoranti). Cosmetico (proprietà antiossidanti e conservanti) Componente della miscela di composti organici bruciati come incenso
88	Gum Gut	ghatti gum gutta-percha	Anogeissus latifolia (Combretaceae) Palaquium oblongifolium (sapotaceae)			Emulsionante e stabilizzante in bevande e sciroppi. Stabilizzante nelle emulsioni olio-in-acqua. Usata anche come fissativo del sapore.

111	Gum dragant	Tragacantha gum	Astragalus verus (Leguminosae o Fabaceae)	Asia minore	Astragalus verus Oliver	La maggior parte dei suoi usi sono basati sulle sue capacità emulsionanti, addensanti e sospendenti e sulla sua stabilità all'acido e al calore. Agente legante o emulsionante in compresse e pillole.
119 / 193	Resin Guajac/ Guaiaco resin	Guaiacum resin	Guaiacum officinale o G. santum (Zygophyllaceae)	West Indies	Guaiacum officinale L.	Diaforetico e alterativo. Prescritto in caso di gotta e reumatismi (Flückiger)
232	Resin Scamon	Scammony resin and root	Convolvulus scammonia	Asia minor	Convolvulus scammonia L.	Lassativo (Ure, 1813)
139	Sen. Synap. Alb.	White mustard	Sinapis alba L. B. alba (Cruciferae or Brassicaceae).			L'olio volatile (isotiocianato di allile) viene utilizzato in alcuni linimenti rubefacenti e anti-irritativi. timolante, emetico, diuretico e rubefacente. Sono più comunemente usati esternamente per il trattamento di reumatismi, artrite e lombaggine.
142	Babam odintalg	Gamboge/ Camboge	Garcinia morella	Siam	Garcinia morella (Gaertn.) Desr.	Purgativo drastico (Flückiger)
camponi senza nome		Resina di pino	<i>Pinus</i>			balsamo medicinale, antisettico o rituale
		Trementina veneta	<i>Larix decidua Miller</i>	Europa	<i>Larix decidua Miller</i>	ingrediente in molti unguenti, linimenti e lozioni per il trattamento di dolori e dolori minori e raffreddori. Nella medicina tradizionale era impiegata principalmente nel trattamento dei reumatismi, dei dolori muscolari, delle articolazioni rigide, del mal di denti, delle bolle e delle piaghe per le sue proprietà rubefacenti e anti-irritanti. Può essere utilizzata come antimicrobico.

Tutte le identificazioni sono provvisorie e richiedono un lavoro più approfondito e dettagliato.

La corteccia di Cascarilla, la resina Guaiacum e la resina Scammonium erano presenti anche nella farmacopea di Londra del 1819 e nella farmacopea britannica del 1898 [65].

3.3.2 Utilizzo dei composti organici studiati in arte

Per concludere, il lavoro si cerca di riproporre quanto eseguito da altri gruppi di ricerca che stanno lavorando sul gruppo dei composti inorganici dei medicinali conservati presso la spezieria della scala: trovare un'analogia tra i composti lì conservati come medicinali e il loro uso in ambito artistico. Da quanto riportato da Vazquez et al. (2017 e 2018) sembra che la spezieria non svolgesse solo la sua funzione di luogo per la vendita dei medicinali ma che gli artisti si recassero lì a comprare prodotti artistici, quali pigmenti, coloranti, medium ecc. [69,70,71].

Alla luce dei risultati ottenuti tramite lo studio chimico-fisico si può affermare che, per quanto riguarda questa categoria, i materiali che realmente avrebbero potuto essere acquistati dagli artisti sono pochi: Benzoino, Albumina, Gomma adragante e gomma gutta.

Per quanto riguarda gli altri composti non si può escludere il fatto che gli artisti non li comprassero, ma ricerca storica è tutt'ora in corso.

I composti di natura terpenica, come già spiegato, si possono suddividere in base alla consistenza e possono essere utilizzati come solventi (oleoresine, ex. trementine), come pigmenti, come vernici (resine di e triterpeniche), leganti, adesivi e lacche [13].

Le resine solitamente erano utilizzate da sole o in miscela: nel primo caso gli artisti le applicavano sulle opere in qualità di vernici per proteggere le superfici pittoriche e renderle trasparenti, sfruttando le loro proprietà filmogene, idrorepellenti e adesive. Spesso per questo motivo si riscontrano dei problemi di conservazione perché ci si ritrova davanti a superfici pittoriche con la polvere inglobata all'interno della vernice. Quando invece erano utilizzate in miscela, gli artisti le mescolavano con altri leganti (come l'olio) per migliorare l'aspetto del colore e dare corposità, ma anche per facilitare la stesura e per modificare il processo di essiccamento [15].

In ambito artistico la resina benzoino (LS81) è stata utilizzata come prodotto verniciante soprattutto su supporti lignei a partire dal XVI secolo. Grazie alle sue proprietà filmogene era impiegata sia da sola che in miscela con la gommalacca per donare migliore scorrevolezza e brillantezza alla lucidatura [13].

All'interno del campione incognito LS225 è stata riscontrata la presenza di trementina veneta. Questa resina semisolido ha qualità plasticizzanti e viene impiegata dagli artisti in qualità di legante per la pittura a olio per conferire maggiore flessibilità e vita ai film rendendolo lucente, elastico e trasparente. Mescolata con oli più grassi e pigmenti facilita l'essiccazione del colore. E' incompatibile con i pigmenti basici (come Biacca, Azzurrite e Malachite) a causa dell'elevata acidità delle resine diterpeniche. Viene utilizzata anche nella preparazione di vernici, emulsioni, adesivi, colori e colla pasta per la foderatura dei dipinti su tela. Trova impiego anche come veicolante per i pigmenti in polvere per ceramica cotta a forno [15]. Se addizionata alla cera può aumentare coesione e adesione. Era la vernice più comune trovata nei primi libri di ricette ed era stata comunemente usata in Europa almeno dal tempo di Rubens. Inoltre è stata nominata più volte in ricettari antichi per la preparazione del resinato di rame verde trasparente [41].

Inoltre nello stesso campione è stata rilevata la betullina. Studi già eseguiti riportano che questo triterpene veniva estratto dalla corteccia della betulla ed era simile ai componenti della resina Dammar e Mastice. Queste resine sono note per avere effetti adesivi, probabilmente la betullina solidificando manteneva il contatto con il substrato, mentre i componenti volatili evaporavano [9].

L'amido, composto ritrovato all'interno dei campioni appartenenti al sottogruppo vegetali e carboidrati, in arte è conosciuto e utilizzato per le sue proprietà adesive. Veniva impiegato nella preparazione della tela per pittura a tempera. Anche la gomma adragante fa parte di quei materiali che gli artisti potevano acquistare presso la spezieria della scala. In qualità di colla polisaccaridica però è meno forte delle colle terpeniche e non è idrorepellente, infatti viene largamente impiegata nel restauro dei materiali cartacei. È utilizzata soprattutto perché in grado di modificare la reologia dei liquidi, è utilizzata come addensante, emulsionante e stabilizzante perché in grado di diminuire la tensione superficiale delle emulsioni magre e di aumentare la viscosità della fase acquosa. Può essere utilizzata anche come gelificante perché rigonfia facilmente in acqua. Sia amido che gomma adragante possono essere utilizzati nella pittura ad acquarello per rendere più corposi i colori mantenendoli trasparenti [13].

All'interno della vetrina principale è presente anche un contenitore con l'etichetta "Lig. Aloe". Dalle ricerche bibliografiche è emerso che i materiali conosciuti come aloe sono stati utilizzati in pittura o nelle arti decorative: il loro succo evaporando emerge dalle foglie tagliate di alcune specie di aloe (tra cui Aloe vera) formando un film giallo o giallo-marrone [9].

Bibliografia

- [1] Filippo Bussotti, Mohamed Hazem Kalaji, Rosanna Desotgiu, Martina Pollastrini, Tadeusz Łoboda, Karolina Bosa, *Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla*, Firenze, Firenze University Press, 2012.
- [2] Hui Lia , Xuan Wangb , Yong Zhuc, *Identification Characteristics for Amber and its Imitation*, 5th International Conference on Information Engineering for Mechanics and Materials (ICIMM 2015).
- [3] *Database: IRUG* (<http://www.irug.org/search-spectral-database>).
- [4] *Database: ATR-FT-IR spectra of conservation-related materials in the MID-IR and FAR-IR region*.
- [5] Brown et al, *Chimica organica*, EdiSes, 2010.
- [6] Lydon J. et al., The Effects of Ambient Solar UV Radiation on Alkaloid Production by *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*, *Photochemistry and Photobiology*, 2009, vol. 85, pp. 1156–1161.
- [7] Bijlsma et al. Investigation of degradation products of cocaine and benzoylecgonine in the aquatic environment, *Science of the Total Environment* 2013, vol.443, pp.200–208.
- [8] Moore J.M. et al., In-depth chromatographic analyses of illicit cocaine and its precursor, coca leaves (Review), *Journal of Chromatography A*, 1994, vol. 674, pp. 165-205.
- [9] J. S. Mills and R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworth-Heinemann, 2003.
- [10] Ali Liazid, Miguel Palma, Jamal Brigui, Carmelo G. Barroso, *Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction*, *Journal of Chromatography A* 2007, vol.1149 (1,2), pp. 29-34.
- [11] M. Hovaneissian et al. (2006), *Contribution de la chimie analytique à l'étude des exsudats végétaux styrax, storax et benjoin*, *C. R. Chimie* 2006, vol.9, pp. 1192–1202.
- [12] Modugno, Colombini, *Aromatic resin characterisation by gas chromatography–mass spectrometry Raw and archaeological materials*, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) pp. 298–304.
- [13] R. Beninatto and O. De Lucchi, *Chimica Organica per Artisti e Restauratori: Sostanze Naturali*. 2016.
- [14] Langenheim, J. H. (1996). *Chapter 1 biology of amber-producing trees: Focus on case studies of Hymenaea and Agathis*. In K. B. Anderson & J. C. Crelling (Eds.), *Amber, resinite, and fossil resins* (pp. 1–31). Washington DC: American Chemical Society, ACS Symposium Series 617.
- [15] Colombini, Modugno, *Organic Mass spectrometry in art and archaeology*, 2009
- [16] M. Hovaneissian et al., *Analytical investigation of styrax and benzoin balsams by HPLC- PAD-fluorimetry and GC-MS*, *Phytochem. Anal.* (2008) Vol.19, pp. 301–310.
- [17] Castel et al. (2006), *Volatile constituents of benzoin gums: Siam and Sumatra, part 2. Study of headspace sampling methods*, *Flavour Fragr. J.* Pp. 21: 59–67.
- [18] Sarret et al (2017), *Organic substances from Egyptian jars of the Early Dynastic period (3100–2700 BCE): Mode of preparation, alteration processes and botanical (re)assessment of “cedrium”*, *Journal of Archaeological Science: Reports* 14 (2017) pp. 420–431.

- [19] P. Burger et al., *New insights in the chemical composition of benzoin balsams*, Food Chemistry 210 (2016) pp. 613–622.
- [20] Caiqiong Yang, Wei Peng, Bijuan Yang, Junjie Zhang & Yegao Chen, A new sesquiterpenoid from *Polyalthia petelotii*, Natural Product Research 2016, vol. 30 (14), pp. 1565-1570.
- [21] Vijay N. et al., *NHC Catalyzed Transformation of Aromatic Aldehydes to Acids by Carbon Dioxide: An Unexpected Reaction*, Org. Lett. 2010, vol. 12,11 pp. 2653-2655.
- [22] Langenheim, J. H. (2003) *Plant resins: Chemistry, evolution ecology and ethnobotany*. Portland, Cambridge: Timber Press, p. 586.
- [23] Lardos et al., *Resins and gums in historical iatrosophia texts from Cyprus – a botanical and medico-pharmacological approach*, Frontiers in Pharmacology Ethnopharmacology 2011, July Vol. 2, Article 32, pp.1-26.
- [24] Leungs, (A Cura Di I. A. Khan And E. A. Abourashed), *Encyclopedia of common natural ingredients* 3rd edition, Wiley 2010.
- [25] <http://oliessenzialinaturali.blogspot.com/2013/06/benzoino-styrax-officinalis-e-altro-uno.html> consultato il 20.05.2019.
- [26] J. F. Kratochvil, R.H. Burris, M.K. Seikel and J.M. Harkin, *Isolation and characterization of a-guaiaconic acid and the nature of guaiacum blue*, Phytochemistry 1971, vol. 10, pp. 2529-2531.
- [27] Robert D. Haworth, Cecil R. Mavin and George Sheldrick, *The constituents of guaiacum resin. Part II. Synthesis of dl-guaiaretic acid dimethyl ether*, J. Chem. Soc., 1934, pp.1423-1429.
- [28] J.S. Buckleton, R.C. Cambie, G.R. Clark, P. A. Craw, C. E.F. Rickard, P. S. Rutledge, P. D. Woodgate, *A Oxidative Coupling of Lignans. II* Non-Phenolic Coupling of Diarylbutane Lignans Related to Matairesinol Dimethyl Ether*, Aust. J. Chem., 1988, 41, 305-24.
- [29] Munger, R.S, *Guaiacum, the Holy Wood from the New World*, in "Journal of the History of Medicine and Allied Sciences", 1944 vol. 4, pp. 196-229.
- [30] Mathe , *Analytical study of plant resins used in Art and Archaeology, Surface Processing of ceramic and cultural heritage materials*, University of Seville –Spain, 14-18 July 2014.
- [31] Hiroyuki Kasaaara, Mitsuo Miyazawa* And Hiromu Kameoka, *O-Demethylation Of 7,7'-Epoxy lignans By Aspergillus Niger*, Phytochemistry 1996, Vol. 43, No. 1. pp. 111-113.
- [32] Vijay N. et al., *NHC Catalyzed Transformation of Aromatic Aldehydes to Acids by Carbon Dioxide: An Unexpected Reaction*, Org. Lett. 2010, vol. 12,11 pp. 2653-2655.
- [33] L. Wang, X. Zhou, T. Xu, X. Yang and Y.Liu, *LIGNANS FROM Saururus chinensis*, Chemistry of Natural Compounds 2010, Vol. 46 (3).
- [34] V. Macías-Villamizar and L. Cuca-Suárez, *Structural modification of lignan compounds isolated from Nectandra species (Lauraceae)*, J. Chil. Chem. Soc. 2017, vol. 62 (2) pp. 3427- 3431.
- [35] Farmacopea francese 1884.
- [36] Prati et al. *Application of ATR-FAR infrared spectroscopy to the analysis of natural resins*, Anal Bioanal Chem (2011) 399, pp. 3081–3091.
- [37] M. P. Colombini et al., *Characterisation of organic residues in pottery vessels of the Roman age from Antinoe (Egypt)*, Microchemical Journal, 2005, vol. 79, pp. 83– 90.

- [38] Fingolo CE., TS. Santos, MD. Filho, MA. Kaplan (2013). Triterpene Esters: natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae), *Molecules* 18: 4247–4256.
- [39] Zapata-Sudo G., TC. Mendes, MA. Kartnaller, TO. Fortes, NF. Freitas, MA. Kaplan & RT. Sudo (2010). Sedative and anticonvulsant activities of methanol extract of *Dorstenia arifolia* in mice, *J Ethnopharmacol.* 6;130 (1): 9-12.
- [40] Misiewicz & Zerega, phylogeny, biogeography and character evolution of dorstenia (moraceae), *EDINBURGH JOURNAL OF BOTANY* 2012 69 (3): 413–440.
- [41] Luigi Campanella, et. al. *Chimica per l'arte*. Zanichelli. 2007. p.512.
- [42] Domingo et al., Iodine, a Mild Reagent for the Aromatization of Terpenoids, supporting info.
- [43] Häfner et al., A (+)-Larixol Congener with High Affinity and Subtype Selectivity toward TRPC6, *ChemMedChem* 2018, 13, 1028 – 1035.
- [44] Frankenberg et al., UPLC-ESI-QTOF-MS2 characterisation of *Cola nitida* resin fractions with inhibitory effects on NO and TNF- α released by LPS-activated J774 macrophage and on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*, *Phytochemical Analysis.* 2018;29:577–589.
- [45] Lai and Ito, Studies on the constituents of *Marsdeina formaosa* Masamune, *Chem Pharm. Bull.* 1979, vol 27 (9), pp. 2248-2254.
- [46] Poumale et al., Long-chain alkanolic acid esters of lupeol from *Dorstenia harmsiana* Engl. (Moraceae), *Natural Product Research* Vol. 26, No. 8, April 2012, 749–755
- [47] Poumale H.M., D. Amadou, Y. Shiono, G. D. Wabo Fotso Kapche & B. T. Ngadjui (2011). Chemical Constituents of *Dorstenia convexa* (Moraceae), *Asian J. Chem.* 23 (2): 525-527.
- [48] De Amorim M.L.L., Godinho W.M., Archanjo F.C. & Grael C.F.F. (2016) Chemical constituents of *Pseudobrickellia brasiliensis* leaves (Spreng.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae), *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 18 (2): 408-414.
- [49] Urech K., J. M. Scher, K. Hostanska & H. Becker (2005). Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L., *JPP* 57: 101–109.
- [50] Verma V. K., N. Sehgal & O. Prakash (2015). Characterization and screening of bioactive compounds in the extract prepared from aerial roots of *ficus benghalensis*, *IJPSR*, 6 (12): 5056-5069.
- [51] Appleton R. A. & C. R. Enzell (1971). Triterpenoids and aromatic components of deertongue leaf, *Phytochemistry* 10: 447-449.
- [52] Nery Monção N. B., B. Quirino Araújo, J. do Nascimento Silva, D. Jereissati Barbosa Lima, P. M. Pinheiro Ferreira, F. Pereira da Silva Airoidi, C. Pessoa & A. M. das Graças Lopes Citó (2015). Assessing chemical constituents of mimosa *Caesalpiniaifolia* stem bark: possible bioactive components accountable for the cytotoxic effect of m. *caesalpiniaifolia* on human tumour cell lines, *Molecules* 20: 4204-4224.
- [53] López-Martínez S., G. Navarrete-Vázquez, S. Estrada-Soto, I. León-Rivera & M. Y. Rios (2013). Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae), *Natural Product Research* 27 (2): 130–136.
- [54] Araújo D. S. & M. H. Chaves (2005). Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia Brasiliensis*, *Quim. Nova* 28 (6): 996-999.
- [55] Aguiar R. M., J. P. David & J. M. David (2005). Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*, *Phytochemistry* 66: 2388–2392.

- [56] Cunha N. L., C. Jacintho de Mendonça Uchôa, L. Silva Cintra, H. C. de Souza, J. Andrade Peixoto, C. Peres Silva, L. Guidi Magalhães, V. M. Meleiro Gimenez, M. Groppo, V. Rodrigues, A. A. da Silva Filho, M. L. Andrade e Silva, W. R. Cunha, P. Mendonça Pauletti & A. H. Januário (2012). In vitro schistosomicidal activity of some brazilian cerrado species and their isolated compounds, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2012: 1-8. DOI:10.1155/2012/173614
- [57] Guiterrez-Lugo M.T., J. D. Deschamps, T.R. Holman, E. Suarez, B. N. Timmermann (2004), Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*, *Planta Med.* 70:163-165.
- [58] Shi H.-M., B.-S. Long, X.-M. Cui & Z.-D. Min (2005). A new bisabolane sesquiterpenoid from *Euphorbia Chrysocoma*, *Journal of Asian Natural Products Research* 7 (6): 857–860.
- [59] Silva RO, Sousa FB, Damasceno SR, Carvalho NS, Silva VG, Oliveira FR, Sousa DP, Aragao KS, Barbosa ALR, Freitas RM, Medeiros JV: Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 2014; 28: 455-464.
- [60] Martins, Rearrangement and oxidation of β -amyrin promoted by growing cells of *Lecanicillium muscarinum*, *Natural Product Research* Vol. 24, No. 8, 10 May 2010, 767–774.
- [61] Kommera, et al., Synthesis and Anticancer Activity of Novel Betulinic acid and Betulin Derivatives, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2010, 8, 449–457.
- [62] Martina Sauerwein And Koichiro Shimomura, *17~0-methyllyohimbine and vallesiachotamine from roots of Amsonia elliptica*, *Phytochemistry* 1990, Vol 29 (10) pp. 3377-3379.
- [63] Noda et al, SCAMMONINS I AND II, THE RESIN GLYCOSIDES OF RADIX SCAMMONIAE FROM CON VOLVULUS SCAMMONIA, *Phytochemistry* 1990, Vol. 29 (11), pp. 3565-3569.
- [64] M Shahzad Aslam et al, Phytochemical and Ethno-Pharmacological Review of the Genus *Araucaria* – Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013, vol12 (4), pp. 651-659.
- [65] Mackonochie et al, *Materia medica chests: Investigating the 19th century use of botanicals by different medical professions*, *Journal of Herbal Medicine* 2019. Doi: 10.1016/j.hermed.2019.100255 .
- [66] Demetzos, C., Mitaku, S., Loukis, A., Harvala, C., & Gaily, A. (1994). A New Drimane Sesquiterpene, Isomers of Manoyl Oxide and Other Volatile Constituents from the Resin “Ladano” of *Cistus incanussubsp.creticus*(L.) Heywood. *Journal of Essential Oil Research*, 6(1), pp. 37–41.
- [67] Juan David Guzman, Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity, *Molecules* 2014, 19, pp. 19292-19349.
- [68] A Russo, R Longo, A Vanella, *Attività antiossidante della propoli: ruolo dell'acido feniletilico e galangina dell'acido caffeico*, *Fitoterapia* 2002, Volume 73, supplemento 1, pp. S21-S29.
- [69] M.L Vázquez de Ágredos Pascual et al., *Science, art and mythological greco-roman beliefs in the ancient pharmacy of santa maria della scala, rome*, 9th European symposium on religious art, restoration & conservation, Proceedings book, 2017, pp.116-120.

- [70] M. L. Vázquez de Ágredos Pascual et al., *Tradition and renovation in the ancient drugs of the Spezieria di Santa Maria Della Scala between scientific knowledge and magical thought*, European Journal of Science and Theology, 2018, vol. 14 (2), pp. 3-12.
- [71] Cavallo e M.L. Vazquez, *X-ray powder diffraction of mineral pigments and medicines from the 17th century pharmacy (Spezieria) Santa Maria della Scala in Rome, Italy*, Powder Diffr., 2018, pp. 1-9.

Conclusioni e prospettive future

Questo lavoro di tesi, svolto in collaborazione con l'Universidad de Valencia, ha preso in considerazione i materiali organici conservati all'interno della vetrina principale dell'antica spezieria di Santa Maria della Scala e si è focalizzato su diverse resine vegetali, gomme, balsami e materiali vegetali e grassi lì conservati. Le analisi condotte attraverso la microscopia ottica, la microscopia in epi-fluorescenza, la spettrofotometria in riflettanza diffusa, la spettroscopia FT-IR in modalità ATR, la cromatografia liquida (IT-SPME-CapLC-DAD) e quella gassosa (GC-MS) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) si sono concentrate sull'identificazione di questi antichi composti organici naturali. L'uso di diverse tecniche analitiche ha consentito di indagare i campioni in molteplici aspetti anche complementari, raccogliendo un set di dati che sono stati confrontati tra loro.

Attraverso la cromatografia liquida sono state indagate le sottoclassi di campioni vegetali e carboidrati ed è stata testata l'estrazione in tubo in fase solida per l'identificazione dei composti polari (carboidrati) di antichi medicinali. Mentre attraverso la gascromatografia associata alla spettrometria di massa sono stati indagati i composti apolari appartenenti alla sottoclasse delle resine e anche altri campioni di matrice diversa. La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare è stata utile per confermare i risultati ottenuti tramite l'analisi delle masse.

È emerso che questi materiali, utilizzati dai frati carmelitani per la preparazione di numerose ricette farmaceutiche, sono presenti in miscele più o meno complesse. Non è sempre stato possibile identificare con certezza ogni singola componente impiegata in queste miscele, data appunto la loro grande eterogeneità, ma sono state formulate alcune ipotesi, supportate anche dai dati presenti in letteratura.

Bisogna sottolineare che non è sempre stata trovata una corrispondenza tra il nome sull'etichetta e la composizione effettiva del prodotto. In alcuni casi, infatti, le etichette non erano facilmente leggibili o comprensibili, in altri addirittura assenti.

Le analisi sono state uno strumento necessario per capire se all'interno dell'antica spezieria della scala si vendessero anche materiali impiegati in ambito artistico. Nuove prospettive coinvolgeranno altre fonti di informazione come trattati storici, risultati inorganici, ecc. per consentire un'identificazione più precisa, anche dei composti presenti in piccole percentuali, e per comprendere meglio l'origine delle piante selezionate dai frati. In questo modo sarà possibile creare o riprodurre questi straordinari rimedi farmaceutici.

Questo è il primo lavoro relativo allo studio dei composti organici presenti nei prodotti conservati presso la spezieria della Scala. L'intero progetto interdisciplinare nasce con

l'ottica di valorizzare l'enorme patrimonio culturale custodito all'interno e si pone come obiettivo finale di renderla un museo fruibile al pubblico.