



Università
Ca' Foscari
Venezia

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea magistrale in
(ordinamento ex D.M. 270/2004)

Scienze Chimiche per la Conservazione ed il Restauro

—

Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Tesi di Laurea

**DETERMINAZIONE DELLE COLLE ANIMALI NEI
LEGANTI PITTORICI: MESSA A PUNTO E
APPLICAZIONE DI UN METODO
COLORIMETRICO**

Relatore

Prof. Paolo Ugo

Correlatrice:

Prof.ssa Ligia Maria Moretto

Laureanda

Teresa Peratello
Matricola 813350

Anno Accademico
2012 / 2013

Indice

1. Scopo	pg. 4
2. Introduzione	
2.1 <i>Tecnica a tempera</i>	pg. 5
2.1.1 Invecchiamento delle colle animali	
2.2 <i>Il collagene</i>	pg. 8
2.3 <i>Determinazione del collagene</i>	pg. 10
2.3.1 Idrolisi del collagene	
2.3.2 Procedimento per la determinazione del collagene	
2.3.3 Reazioni coinvolte nel processo di determinazione con il reagente di Ehrlich	
2.4 <i>Utilizzo del reattivo di Ehrlich per l'analisi ai beni culturali</i>	pg. 15
2.5 <i>Ippolito Caffi e la tecnica</i>	pg. 16
3. Parte sperimentale	
3.1 <i>Reagenti</i>	pg. 20
3.2 <i>Strumenti</i>	pg. 20
3.3 <i>Procedura</i>	pg. 20
3.3.1 Idrolisi del collagene	
3.3.2 Ossidazione dell'idrossiprolina	
3.3.3 Sviluppo del cromoforo e analisi della soluzione	
3.4 <i>Valutazione della stabilità del cromoforo</i>	pg. 22
3.5 <i>Campioni oggetto di studio</i>	pg. 23
3.5.1 Provini pittorici	
3.5.2 Campioni Reali	

4. Risultati e Discussioni

I PARTE – STUDIO DELLA FORMAZIONE E DELLA STABILITÀ DEL CROMOFORO

4.1 *Reazioni in presenza di idrossiprolina* pg. 28

4.1.1 Valutazione della quantità del reagente di Ehrlich e della concentrazione di propanolo

4.2 *Studio della stabilità del cromoforo* pg. 34

4.2.1 Studio della stabilità del cromoforo in modo continuo

4.2.2 Studio della stabilità del cromoforo ad intervalli di tempo regolari

4.3 *Applicazione del metodo di Collings e Young* pg. 45

II PARTE – IDROLISI DEL COLLAGENE

4.4 *Idrolisi del collagene* pg. 46

4.4.1 Titolazione della soluzione di idrolisi

4.4.2 Prove preliminari di idrolisi

4.4.3 Riduzione della quantità di campione

III PARTE – APPLICAZIONI SU PROVINI SINTETICI

4.5 *Analisi dei campioni dei provini pittorici* pg. 53

4.5.1 Provini eseguiti in laboratorio imitando la ricetta della colla animale di Cennino Cennini

4.5.2 Provini realizzati in laboratorio seguendo la ricetta colla animale e farina di Luigi Tito

4.5.3 Provini eseguiti in laboratorio conforme alla ricetta tempera al rosso d'uovo di Cennino Cennini

IV PARTE – ANALISI CAMPIONI REALI

4.6 *Analisi campioni provenienti dalle opere di Ippolito Caffi* pg. 58

4.6.1 Analisi del dipinto *Molo di Venezia* proveniente da Villa Giacomelli (UD)

4.6.2 Analisi del dipinto *Foro Romano* proveniente da Villa Giacomelli

4.6.3 Analisi del dipinto *Veduta del Pantheon* proveniente dalla Galleria Internazionale di Arte Moderna – Ca'Pesaro

5. Conclusioni pg. 62

6. Bibliografia pg. 64

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

ABS	Assorbanza
Cys	Cisteina
DMAB	p-dimetilaminobelzaldeide
Gly	Glicina
Hyp	Idrossiprolina
λ	Lunghezza d'onda
λ_{\max}	Lunghezza d'onda massima
PCA	acido carbossilico-2-pirrolo
Pro	Prolina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina

1. SCOPO

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo la messa a punto di un metodo colorimetrico per la determinazione delle colle animali utilizzate come legante nella pittura a tempera. Le colle animali sono costituite dal collagene, una proteina presente nel tessuto connettivo. La sua struttura primaria è caratterizzata dalla ripetizione dell'unità *Gly-X-Y*, in cui X ed Y sono rispettivamente, prolina (*Pro*) e 4-idrossiprolina (*4-Hyp*). L'idrossiprolina, un amminoacido non-standard, è il più abbondante in questa proteina; deriva dalle modifiche post-traslazionali della prolina (*Pro*), ed è presente unicamente nel collagene. L'idrossiprolina, permette dunque, di distinguere la colla animale dagli altri leganti pittorici a base proteica. L'individuazione delle colle animali parte dal procedimento messo a punto da Neuman e Logan per la determinazione dell'idrossiprolina nella caratterizzazione dei tessuti biologici, sfruttando la formazione di un cromoforo dalla reazione tra l'idrossiprolina ed il reagente di Ehrlich. L'idrossiprolina viene dapprima ossidata a pirrolo che, successivamente, viene fatto reagire con la p-dimetilamminobenzaldeide formando un cromoforo di colore porpora, caratterizzato da un massimo di assorbanza a circa 550 nm, con un eventuale lieve shift batocromo in presenza di acqua. Scopo di questo lavoro di tesi è adattare la procedura di letteratura, sviluppata per tessuti biologici, al caso dell'analisi di campioni di interesse nel campo nei beni culturali, in particolari nei dipinti. A tal fine, risulta cruciale migliorare la stabilità del cromoforo ed aumentare la sensibilità analitica in modo tale da poter ridurre al minimo la quantità di campione da prelevare per l'analisi. Come ossidante dell'idrossiprolina, si è focalizzata l'attenzione sull'uso del perossido d'idrogeno, anziché sulla clorammina-T (anch'essa usate in letteratura) in quanto quest'ultima è nota per essere una sostanza nociva, corrosiva ed allergenica. Per conseguire questi obiettivi, il lavoro di tesi si articola in quattro parti: nella prima parte viene studiata la formazione e la stabilità del cromoforo; nella seconda viene ottimizzato il processo di idrolisi ed infine nella terza e quarta parte viene sviluppata l'applicazione della procedura analitica, prima a stesure pittoriche a tempera eseguite in laboratorio imitando le ricette tradizionali di Cennino Cennini e Luigi Tito e successivamente a campioni reali provenienti da dipinti di Ippolito Caffi (1809-1866) e da tele di autore ignoto del XVIII secolo, conservate nella Chiesa di San Giorgio a Comeglians (UD).

2. INTRODUZIONE

L'esigenza da parte dell'uomo di esprimersi attraverso l'arte ha favorito lo sviluppo di numerose tecniche artistiche. I materiali utilizzati per tale scopo sono essenzialmente quelli disponibili in natura, sia organici (ad es. leganti e coloranti) che inorganici (ad es. pigmenti) o misti (ad es. lacche). Solo a partire dalla fine del XX secolo gli artisti hanno cominciato a fare largo uso dei materiali di sintesi. Le tecniche pittoriche prendono il nome e sono quindi caratterizzate dal tipo di legante utilizzato. I leganti pittorici, per poter essere utilizzati come tali, devono possedere un insieme di proprietà che comprendono l'assenza di colore, la trasparenza e non devono contribuire a variazioni cromatiche; inoltre, devono garantire coesione tra le particelle di pigmento, la loro adesione al supporto e devono possedere *proprietà filmogene*. Il legante deve avere elevata stabilità per non subire alterazioni delle sue proprietà meccaniche ed ottiche e deve essere stabile nei confronti dei pigmenti con i quali viene a contatto. In questo lavoro di tesi, l'attenzione sarà focalizzata sui leganti pittorici di natura proteica, con particolare attenzione per la colla animale.

2.1 *Tecnica a tempera*

Il termine *tempera* definisce tutte le tecniche che prevedono l'utilizzo di leganti in dispersione acquosa [1]. La loro classificazione avviene in funzione della natura proteica (colle animali, uovo, caseina ecc.) o polisaccaridica (gomme vegetali) del materiale disperso che le costituisce. Tra le tecniche pittoriche la *tempera* è una delle più antiche ed usate, anche se il suo impiego subisce un lento declino a partire dal XVI secolo, con l'arrivo della *tecnica ad olio*. Il periodo di transizione tra la grande diffusione della *tempera* e la predilezione per la pittura a base di leganti ad olio, è caratterizzato anche dalle tecniche miste suddivisibili in due grandi gruppi: *magre* perché costituite solo da leganti proteici e *grasse*, dovute ad una mescolanza di leganti proteici e lipidici. La tecnica a tempera per eccellenza, secondo Cennino Cennini, è quella all'uovo [2]; quest'ultimo poteva essere utilizzato intero, oppure tuorlo e albume potevano essere utilizzati separatamente. I leganti a base d'uovo favoriscono la formazione di film pittorici molto resistenti, dalle ottime proprietà coesive e resistenti all'ingiallimento; eventuali ingiallimenti, visibili sulle opere, sono

legati a ridipinture successive oppure alla presenza di un film sovrastante di vernice [3]. Un altro legante proteico molto utilizzato è la colla animale, ricavata dalla bollitura di cascami di pelli animali e dalle ossa dei vertebrati [4], precedentemente fatti rigonfiare in acqua fredda. La bollitura è necessaria per permettere la solubilizzazione del collagene presente nelle parti animali che subiscono il trattamento. Il procedimento di preparazione della colla animale è rimasto invariato nel corso della storia, ma sulle proporzioni ed i tempi di bollitura i trattati non forniscono indicazioni precise. Erano dunque gli artisti, a seconda della loro esperienza e delle loro esigenze, a definire le tempistiche di preparazione della colla e le proporzioni dei vari ingredienti [3]. La larga diffusione di questo legante sin dall'antichità è dovuta principalmente all'ampia disponibilità della materia prima in questione. Come già detto in precedenza, le colle animali sono costituite prevalentemente da collagene e da piccole quantità di sostanze non proteiche, sia organiche che inorganiche (sali), che ne influenzano il potere adesivo. Le colle meno pure, infatti, hanno potere adesivo maggiore e per questo motivo sono utilizzate come adesivi (*colla forte*), mentre le colle più pure sono utilizzate come leganti (*gelatina*). Le stesure pittoriche a base di colla animale sono caratterizzate da una grande luminosità, ma lo strato pittorico che ne deriva è più fragile rispetto a quelli ottenuti con altre materie prime (es. tempera ad uovo). Inoltre, l'asciugatura della colla a base di collagene può causare la formazione di macchie, dette *gore*, che derivano dalla penetrazione della colla all'interno degli strati pittorici [5]. Inoltre quando la colla asciuga le stesure pittoriche subiscono un notevole cambiamento dei toni [3].

2.1.1 Invecchiamento delle colle animali

I leganti proteici possono essere soggetti a degrado fisico, causato dal rigonfiamento della frazione proteica in essi presente, a quello biologico con la formazione di muffe e microorganismi ed infine ad un degrado di tipo chimico, dovuto alla luce, l'umidità e all'interazione delle proteine con altre specie (es. inquinanti atmosferici, prodotti usati nel restauro). In tutti e tre i casi si verifica una perdita delle capacità coesive del legante stesso. Le proteine del collagene sono abbastanza stabili all'ossidazione, mentre sono molto sensibili all'azione dell'umidità[3]. Le colle animali, rispetto agli altri leganti proteici, come ad esempio l'uovo, presentano un elevato contenuto di acqua e ciò può comportare delle grandi variazioni strutturali dovute proprio alla perdita di acqua [6]. Il primo

fenomeno degradativo della struttura proteica è provocato dall'essiccamento, che porta alla rottura dei legami ad idrogeno tra le catene di polipeptidiche e quindi al deterioramento della struttura terziaria e quaternaria delle proteine. Inoltre, durante il processo di essiccamento la proteina assume una nuova conformazione strutturale, a seguito di un riarrangiamento dei gruppi funzionali; infatti, gli amminoacidi idrofili cambiano orientazione spostandosi dall'interno della struttura proteica all'esterno, la diventando così più reattivi. L'entità della denaturazione strutturale è, di conseguenza, funzione della quantità di acqua presente al momento della stesura [6].

La fotoossidazione è un meccanismo di degrado indotto dalle radiazioni UV e visibili, che porta alla formazione di radicali liberi e idroperossidi [3, 6] la cui formazione è favorita dalla presenza di sostanze fotosensibili. Gli amminoacidi maggiormente soggetti a questo tipo di degrado sono il triptofano, l'istidina, la metionina, la tirosina, la cisteina, la lisina e la serina. I prodotti della fotoossidazione noti sono la cistina che forma il disolfuro cistina (*Fig. 1*) e la metionina da cui si formano molecole contenenti gruppi solfossido e solfone (*Fig. 2*).

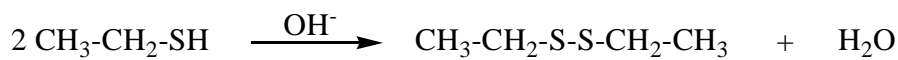


Figura 1. Reazione di fotoossidazione della cisteina [6]

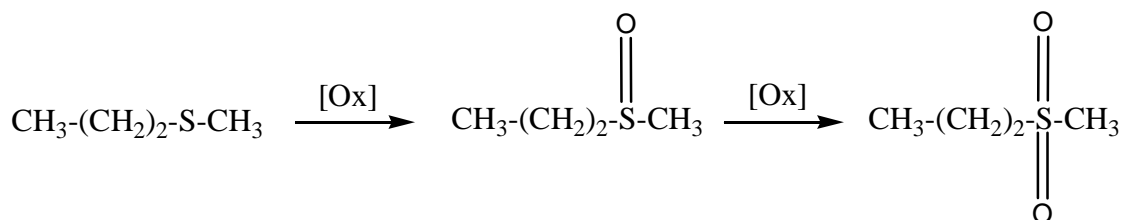


Figura 2. Reazione di fotoossidazione della metionina [6]

Il collagene non possiede il triptofano e nemmeno gli amminoacidi contenenti lo zolfo. Inoltre ha un basso contenuto di tirosina ed istidina e questo lo rende particolarmente resistente nei confronti della fotoossidazione.

Va notato inoltre che le proteine sono particolarmente sensibili alle variazioni di pH, dato che questo parametro ne influenza il grado di denaturazione: variazioni di pH possono comportare la rottura dei legami peptidici riducendo il peso molecolare della proteina, causando un indebolimento della struttura e quindi dello strato pittorico.

2.2 Il collagene

Il collagene costituisce la componente principale della matrice extracellulare del tessuto animale e ha funzione strutturale. Il termine collagene identifica tutte le proteine caratterizzate da una struttura fibrosa a tripla elica destrorsa allungata [7, 8], in cui l'unità strutturale è rappresentata dal tropocollagene, macromolecola costituita dalla ripetizione di trimeri (Gly-X-Y)_n (Gly = glicina). Le posizioni X e Y sono occupate molto spesso da prolina (Pro) ed idrossiprolina (Hyp) [7, 9-10]. La glicina costituisce un terzo degli amminoacidi totali, mentre prolina ed idrossiprolina assieme, costituiscono un altro terzo. Il rimanente 40 % circa è costituito dagli altri amminoacidi, ad esclusione del triptofano (Trp) e della cisteina (Cys) che sono assenti nel collagene [7, 11]. La *tabella 1* riporta la composizione amminoacidica del collagene.

Le strutture a triple eliche, che a loro volta sono raggruppate in fibrille solide, rendono il collagene insolubile in acqua fredda. Al contrario, se trattata con acqua calda, la proteina viene denaturata in modo irreversibile formando la gelatina, a causa della rottura dei legami ad idrogeno tra le catene polipeptidiche.

Tabella 1. Composizione amminoacidica del collagene in peso percentuale (g/g %) [12]

Amminoacidi	Abbreviazioni	(g/g %)
Glicina	Gly	26.6
Alanina	Ala	10.3
Valina	Val	2.5
Leucina	Leu	3.7
Isoleucina	Ile	1.9
Prolina	Pro	14.4
Fenilalanina	Phe	2.3
Tirosina	Tyr	1.0
Triptofano	Trp	0.0
Serina	Ser	4.3
Treonina	Thr	2.3
Cisteina	Cys	0.0
Metionina	Met	0.9
Arginina	Arg	8.2
Istidina	His	0.7
Lisina	Lys	4.0
Acido aspartico	Asp	6.9
Acido Glutammico	Glu	11.2
Ammoniaca ¹	NH ₃	0.6
Idrossiprolina	Hyp	12.8

¹ L'ammoniaca è prodotta durante l'idrolisi dalla decomposizione in particolare di *serina* e *treonina*. Per questa ragione l'ammoniaca non è in relazione con il numero di gruppi amidici della proteina considerata [14].

Le tre catene polipeptidiche possono avere la stessa sequenza di amminoacidi, dando luogo alla formazione di un *omotrimero* oppure, possono essere diverse tra loro portando alla formazione di un *eterotrimero*. Oltre che per la sequenza degli amminoacidi, esse possono differire anche per la lunghezza ed il peso molecolare. Questo porta all'esistenza di almeno ventisei tipologie di collagene (*Tab. 2*). Le catene polipeptidiche che costituiscono il collagene sono di tre tipologie, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e, in minore quantità, $\alpha 3$ e sono descritte in tabella 2. Il collagene di *tipo I* è il più diffuso, infatti costituisce più del 90 % della massa organica delle ossa ed è inoltre presente nei tendini, nella pelle, nei legamenti, nella cornea e nella maggior parte dei tessuti connettivi.

Tabella 2. Tipologie di collagene più diffuse [7]. La lettera greca α indica la tipologia di struttura secondaria adottata dal collagene; il *numero arabo* indica la tipologia di famiglia: 1, 2 e 3; il *numero romano* sottolinea il tipo di collagene a cui ci si riferisce; il numero al pedice indica il numero di catene appartenenti a quella famiglia.

Tipo	Composizione molecolare	Distribuzione nel tessuto
I	$\alpha 1(I)_{(2)}, \alpha 2(I)$	Ossa, tendini, cornea, legamenti
II	$\alpha 1(II)_{(3)}$	Cartilagine delle articolazioni
II	$\alpha 1(II)_{(3)}$	Pelle, pareti dei vasi sanguinei, fibre reticolari di molti tessuti (polmoni, fegato, milza, ecc.)
V	$\alpha 1(III)_{(1)}, \alpha 2(III)_{(1)}, \alpha 3(III)_{(1)}$	Polmoni, cornea, ossa, membrana fetale; si trovano assieme al collagene.
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	Cartilagine

Come già detto in precedenza, il collagene è una proteina resistente e compatta e per questo insolubile in acqua fredda. Tale caratteristica è legata alla presenza della glicina, il cui ridotto ingombro sterico e la capacità di formare legami ad idrogeno, permette una stretta adesione tra le catene. La prolina e l'idrossiprolina, invece, sono orientate verso l'esterno e, in particolare l'idrossiprolina assieme all'idrossilisina, permette l'interazione tra le catene di tropocollagene (unità strutturale del collagene) stabilizzandole. Le unità di tropocollagene si uniscono tra loro testa coda per formare una fibrilla.

L'idrossiprolina (*Fig. 3*) e l'idrossilisina, sono *amminoacidi non standard*, perchè derivano da specifiche modificazioni degli *amminoacidi standard* dopo la sintesi della catena polipeptidica; per

questo il processo prende il nome di modifica post traduzionale. L'enzima che catalizza la reazione di idrossilazione della prolina è la *prolina-4-idrossilasi* [13]. Le forme di idrossiprolina note sono la 3-idrossiprolina (3-Hyp) e la 4-idrossiprolina (4-Hyp), entrambe derivanti da specifiche modifiche post traduzionali. La funzione della 4-Hyp è la stabilizzazione della tripla elica grazie alla sua capacità di formare legami ad idrogeno, mentre quella della 3-Hyp non è ancora del tutto nota [13]. L'idrossiprolina è presente solo nel collagene, e per questo motivo ne permette la distinzione da altre proteine animali.

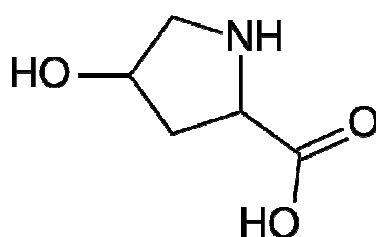


Figura 3. Struttura molecolare della 4-idrossiprolina (4-Hyp)

2.3 Determinazione del collagene

Il collagene, come detto precedentemente, è l'unica proteina caratterizzata dalla presenza dell'idrossiprolina (*Tab. 1*). Questa sua caratteristica ne permette l'identificazione tramite una reazione colorimetrica tra il reagente di Ehrlich (p-dimetilamminobenzaldeide, DMAB) e l'idrossiprolina preventivamente ossidata a pirrolo. Tale reazione viene sfruttata normalmente in istologia per lo studio dei tessuti, oppure per determinare i livelli di idrossiprolina nel sangue o nelle urine. Infatti, elevate quantità di questo amminoacido sono indice di malattie del tessuto connettivo, associate alla degradazione del collagene [14]. La reazione viene sfruttata anche per lo studio della qualità della carne [15, 16], dove elevate quantità di idrossiprolina sono indice di scarsa qualità essa. Un'altra applicazione del metodo è stata studiata da Collings e Young [17], per la determinazione della gelatina nei procedimenti fotografici.

L'utilizzo del reagente di Ehrlich porta allo sviluppo di un cromoforo dalla caratteristica tinta porpora fucsia (*Fig. 4*), il cui assorbimento nel visibile presenta un massimo a compreso tra 548 nm e 555 nm [19].

Un requisito importante affinché la reazione tra pirrolo (idrossiprolina ossidata) e DMAB avvenga, è che l'idrossiprolina sia libera in soluzione: per questa ragione, il collagene deve essere prima di tutto idrolizzato. Ulteriori dettagli sulle fasi del processo di ossidazione e della reazione con DMAB, sono discusse nel *paragrafo 2.3.3.*



Figura 4. Colorazione caratteristica del cromoforo ottenuto dalla reazione tra Hyp ossidata a pirrolo e la DMAB

2.3.1 *Idrolisi delle proteine*

Per permettere la determinazione dell'idrossiprolina, il collagene deve essere preventivamente idrolizzato. L'idrolisi è un processo che permette la rottura dei legami peptidici con il conseguente rilascio degli amminoacidi in soluzione sia per via chimica, che per via enzimatica. L'idrolisi chimica viene condotta sia in ambiente acido che in ambiente basico: nel primo caso l'idrolisi viene condotta in soluzione acida (HCl 6 M) ad una temperatura tra i 110°C-115°C, in un ambiente di reazione anaerobico, per evitare la degradazione degli amminoacidi da parte dell'ossigeno [7]. Per il trattamento termico possono essere utilizzati sia una stufa termica che un fornello a microonde; in quest'ultimo caso, i tempi di idrolisi sono ridotti drasticamente [20].

L'efficienza della reazione dipende da numerosi fattori tra cui la temperatura, il tempo di idrolisi, la pressione, il tipo di acido utilizzato e dalla presenza di altre sostanze non proteiche come, ad esempio, i carboidrati [21]. Questi ultimi possono portare alla produzione delle umine, sostanze scure che derivano dalla reazione di Maillard tra le aldeidi provenienti dai carboidrati, quando presenti, ed il triptofano, oppure tra il triptofano ed altri amminoacidi presenti.

Oltre all'ambiente acido, l'idrolisi può essere condotta anche in ambiente basico, utilizzando NaOH 2.5 M a 100°C. L'idrolisi basica è scarsamente utilizzata nella caratterizzazione delle proteine, in quanto numerosi amminoacidi subiscono racemizzazione. Per questa ragione, viene impiegata

solamente per la determinazione degli amminoacidi che presentano instabilità in ambiente acido, come il triptofano [22, 23].

L'idrolisi enzimatica, invece, sfrutta l'azione delle proteasi, enzimi altamente specifici che agiscono provocando la rottura dei legami peptidici. Se paragonata all'idrolisi acida, quella enzimatica è più blanda e raramente provoca alterazioni degli amminoacidi. Gli enzimi, data la loro specificità, non permettono una completa idrolisi della proteina, ma portano alla formazione di peptidi. Per ottenere una miscela di amminoacidi, e quindi una completa idrolisi della proteina, è necessario utilizzare una miscela di enzimi [21]. Per questa ragione l'idrolisi enzimatica non può sostituire quella acida [21, 22].

2.3.2 Procedimento per la determinazione dell'idrossiprolina

La reazione di determinazione del collagene tramite il reagente di Ehrlich, è rappresentata schematicamente in figura 5.

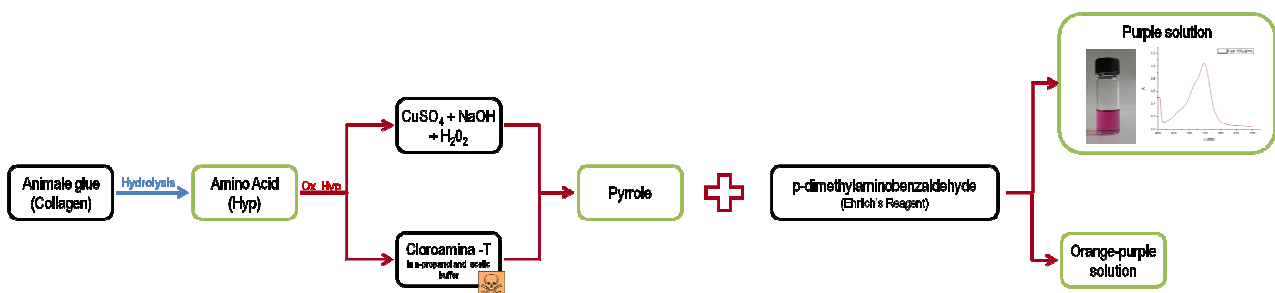


Figura 5. Schema della procedura per la determinazione del collagene

Il metodo è stato introdotto da Lang [24] e Waldschmidt-Leitz e collaboratori [25] negli anni '30 del XX secolo. La prima fase del processo veniva effettuata utilizzando come agente ossidante l'ipoclorito di sodio (NaClO), ma l'ossidazione non avveniva in modo completo, rendendo necessario l'uso di un coefficiente di correlazione per la quantificazione dell'idrossiprolina. Per ovviare a questo problema, Neuman e Logan [26] nel 1950, introdussero nella reazione il perossido di idrogeno (H₂O₂), in presenza di solfato di rame e idrossido di sodio. In questo modo era possibile determinare anche piccole quantità di idrossiprolina, ottenendo comunque valori di assorbanza intensi. Successivamente, Stegemann [27] sostituì il perossido d'idrogeno con la cloroamina-T, al fine di ridurre le interferenze da parte di altri amminoacidi [28].

La fase di ossidazione dell'idrossiprolina a pirrolo per azione del perossido di idrogeno viene condotta in presenza di ioni Cu^{2+} in ambiente alcalino (NaOH). La concentrazione del perossido di idrogeno applicata originariamente da Neuman e Logan era del 6 % in peso, ma è stata ridotta al 2 % da Grunbaum e Glick [29]. Infatti, elevate concentrazioni di H_2O_2 comportano una maggiore interferenza da parte della tirosina. La soluzione deve essere agitata e poi riscaldata a 80 °C per favorire l'eliminazione dell'eccesso di perossido di idrogeno dall'ambiente di reazione, in quanto tracce di H_2O_2 non reagito possono portare ad una tinta finale tendente all'arancione, ed una diminuzione dell'intensità del segnale [26]; il riscaldamento, inoltre, favorisce la reazione di ossidazione. Le reazioni coinvolte in questo processo verranno spiegate dettagliatamente nel paragrafo successivo. Al termine della fase di ossidazione, la soluzione viene lasciata raffreddare.

Il secondo stadio del processo prevede la reazione tra il pirrolo e la DMAB (reagente di Ehrlich) in ambiente acido. La soluzione, ottenuta nella prima fase del processo, viene acidificata mediante l'aggiunta di acido solforico, successivamente viene aggiunta la DMAB. La concentrazione dell'acido solforico inizialmente proposta da Neuman e Logan era di 1.5 M, ma in seguito Miyada e Tappel [30] proposero l'utilizzo di una concentrazione di 0.75 M, in quanto elevate concentrazioni di ioni H^+ in soluzione possono causare un rapido decadimento della tinta del cromoforo, in quanto minore è il pH della soluzione più veloce è il decadimento dei prodotti di reazione [31]. La concentrazione di propanolo, che viene utilizzato per solubilizzare la DMAB prima di impiegarla per la determinazione dell'Hyp, influenza la stabilità del cromoforo e, per questo motivo, è stata oggetto di diversi studi. Infatti, in presenza di una maggiore quantità di acqua, il cromoforo si decompone più rapidamente causando uno spostamento della lunghezza d'onda verso il rosso [32]. La reazione di condensazione avviene a 80°C ed il tempo applicato è quello consigliato da Miyada e Tappel [30]. Al termine dello sviluppo del cromoforo, la soluzione viene raffreddata e rapidamente analizzata, entro dieci minuti, tramite spettroscopia UV-Vis. Il valore di lunghezza d'onda relativa al massimo di assorbimento del cromogeno ottenuto, dipende dall'agente ossidante utilizzato. Nel caso dell'acqua ossigenata, varia tra 548 nm e 555 nm, mentre la forma dello spettro rimane pressoché costante (Fig. 6). Quest'ultima è caratterizzata dalla presenza di un'ulteriore spalla attorno ai 520 nm [19].

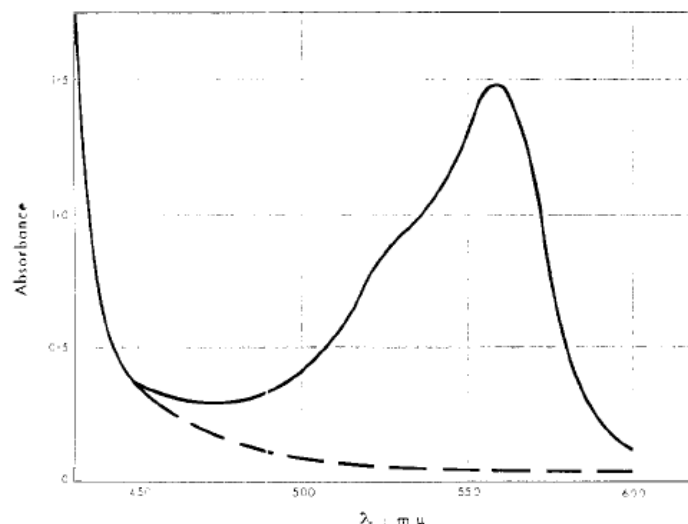


Figura 6. Spettro UV-Vis del cromoforo ottenuto dalla reazione tra il pirrolo e la DMAB [24]

2.3.3 Reazioni coinvolte nel processo di determinazione con il reagente di Ehrlich

Le reazioni coinvolte nella prima fase del processo di ossidazione di Hyp (*Fig. 7*) portano alla formazione del pirrolo attraverso due step: nel primo viene coinvolta la trasformazione dell'anello di pirrolidina a pirrolo [33], passando attraverso l'intermedio acido Δ -pirrolidina-4-idrossi-2-carbossilico, il cui riarrangiamento porta alla formazione acido carbossilico-2-pirrolo (PCA), *struttura III* [19], che costituisce il prodotto dell'ossidazione [34]. Nella seconda fase della reazione, il PCA subisce decarbossilazione termica con formazione del pirrolo [11].

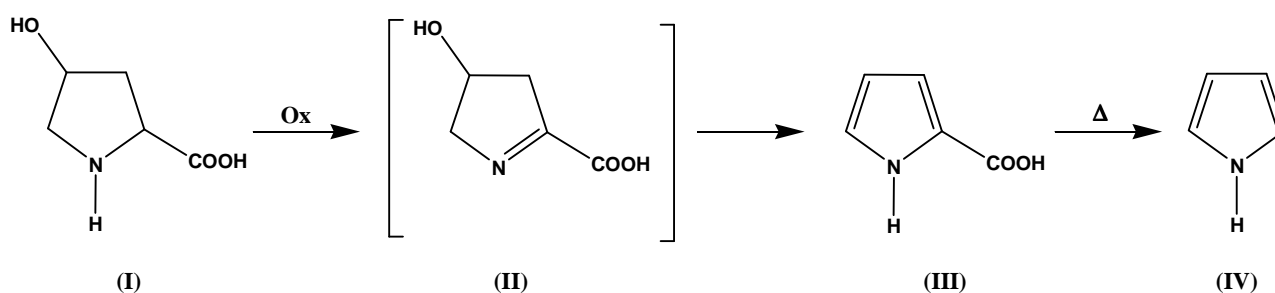


Figura 7. Reazioni di ossidazione dell'idrossiprolina coinvolte nella prima fase del processo [11]

Nella seconda fase, il pirrolo (I) reagisce con la DMAB (II) (*vedi figura 8*) attraverso una sostituzione elettrofila aromatica, in ambiente acido (H_2SO_4). Il prodotto della reazione è verosimilmente una quinoneimina (*struttura V e VI, Fig. 8*), il cui massimo valore di assorbanza cade a lunghezze

d'onda è 550 nm e 560 nm. La reazione è lenta e l'attacco elettrofilo è favorito in posizione α [35]. L'atomo di azoto dell'immina è carico positivamente e questo favorisce un'estesa coniugazione su tutta la molecola. Per questo motivo, la molecola assorbe nella regione del visibile.

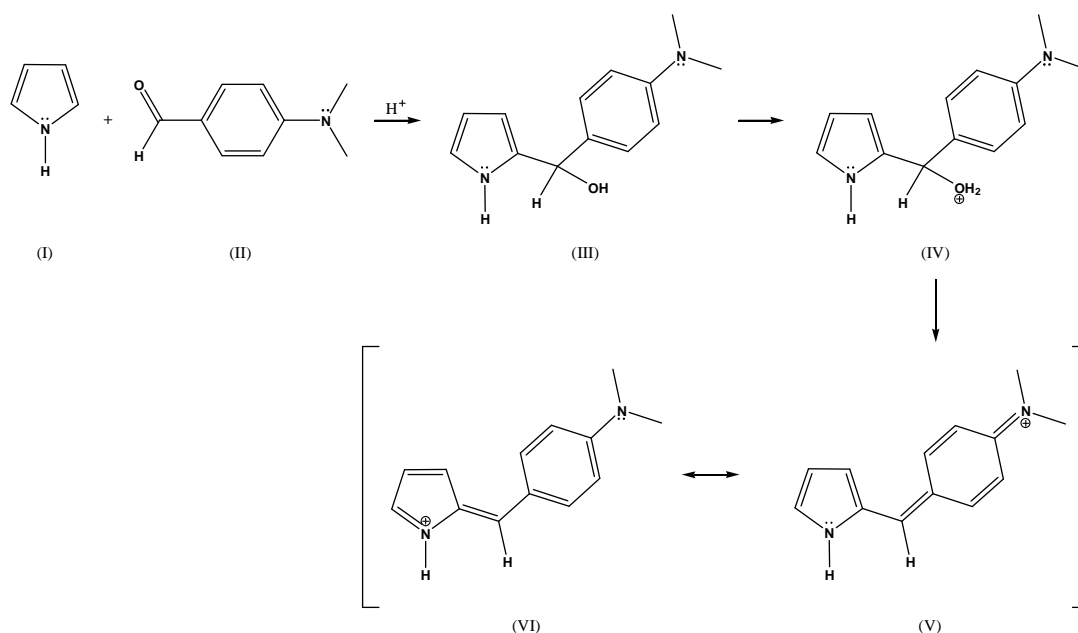


Figura 8. Reazione di condensazione tra il pirrolo (I) ed la DMAB (II) [11]

2.4 Utilizzo del reagente di Ehrlich per l'analisi di beni culturali

Sulla base delle potenzialità analitiche del metodo, a fronte dell'esiguità di applicazioni nel campo dei beni culturali, abbiamo ritenuto opportuno studiare la sua applicazione all'identificazione ed analisi del collagene in dipinti a tempera, dove la colla animale poteva essere stata impiegata come legante.

Considerato che nell'Ottocento si è assistito ad una riscoperta delle pitture a tempera, sia impiegata da sola che applicata come tecnica mista olio/tempera, abbiamo ritenuto interessante verificare l'applicabilità del metodo esaminando i dipinti del pittore veneto Ippolito Caffi, rappresentativo di quest'epoca e che, come noto, eseguiva le sue opere sia utilizzando la tecnica ad olio che a tempera.

2.5 Ippolito Caffi e la tecnica^[36-40]

Ippolito Caffi (1809-1866), è stato attivo nella prima metà dell'Ottocento. Nato a Belluno nel 1809, era un'insaziabile viaggiatore, ma le mete più incisive per lo sviluppo della sua tecnica saranno Venezia, Roma e l'Oriente. Si trasferì a Venezia nel 1825 per studiare all'Accademia di Belle Arti, dove approfondì lo studio del nudo e della figura, con una predilezione per la scuola di Prospettiva. Quest'ultima dimostra l'attaccamento della città lagunare alla tradizione canaletiana, caratterizzata da una rappresentazione scientifica della realtà, resa possibile grazie all'ausilio della camera ottica, rispetto al panorama europeo, in cui si respira un clima di innovazione.

Durante il soggiorno romano (1832-1848), l'artista superò gli schemi prospettici del vedutismo veneziano, a favore di una pittura in cui le vedute non sono più caratterizzate dalla prospettiva, ma da luci e colori. In particolare, il periodo a cavallo tra gli anni '30 e '40 del XIX secolo, fu una fase di grande sperimentazione per l'artista, in cui eseguì vedute con la luce notturna o con la neve, cogliendo così un aspetto diverso della città. In *figura 9a* e *9b* sono riportati due esempi di questo periodo artistico, testimoniando così il superamento da parte dell'artista della pittura di Canaletto.

L'evoluzione dello stile di Caffi, nell'ambiente romano, fu resa possibile dal vivace clima artistico presente nella città eterna, dovuto al convogliamento di artisti, provenienti da tutta Europa, che si confrontano con la pittura rinascimentale e barocca. Tale clima permise lo sviluppo di un nuovo modo di interpretare il paesaggio, non più caratterizzato da un approccio razionale e distaccato da parte dall'artista, ma da rappresentazioni il cui scopo è esprimere i suoi sentimenti e coinvolgere l'osservatore; si sviluppò, inoltre, la pittura dal vero e all'aria aperta.

L'evoluzione dello stile di Caffi, nell'ambiente romano, fu resa possibile dal vivace clima artistico presente nella città eterna, dovuto al convogliamento di artisti, provenienti da tutta Europa, che si confrontano con la pittura rinascimentale e barocca. Tale clima permise lo sviluppo di un nuovo modo di interpretare il paesaggio, non più caratterizzato da un approccio razionale e distaccato da parte dall'artista, ma da rappresentazioni il cui scopo è esprimere i suoi sentimenti e coinvolgere l'osservatore; si sviluppò, inoltre, la pittura dal vero e all'aria aperta.

Un'altra meta che segnerà Ippolito Caffi è il viaggio in oriente compiuto a partire dal 1843, in cui si porrà come un *viaggiatore-reporter*, con l'obiettivo di narrare la realtà, studiare la società ed i

costumi arabi. Questo modo di porsi rappresentò un cambiamento rispetto alla tradizione in cui gli artisti dipingevano sempre gli stessi soggetti, harem e arredi esotici, aderendo così alla *moda orientalista*. L'insaziabile voglia di viaggiare e documentare la realtà, lo condurrà alla morte. Ippolito Caffi perse la vita a soli 57 anni, nella battaglia navale di Lissa durante la Terza Guerra d'Indipendenza, perché imbarcatosi nell'ammiraglia *Re d'Italia*.



Figura 9. (a) Ippolito Caffi, *Venezia sotto la neve*, olio su tela, 1841, Trieste, Civico Museo Revoltella, Galleria d'Arte Moderna; (b) Ippolito Caffi, *Bombardamento notturno a Marghera*, 1848-1849, olio su tela, Venezia, Galleria Internazionale d'Arte Moderna di Ca' Pesaro.

Come già detto precedentemente Ippolito Caffi si potrebbe definire un *viaggiatore-reporter*, per la sua capacità di cogliere la realtà e tradurla nel dipinto attraverso un uso sapiente e nuovo della luce. Testimonianza di questa sua capacità sono i numerosi taccuini, che ci permettono di cogliere i momenti attraverso cui l'artista realizza l'opera, che si suddivide in due fasi: nella prima il pittore fissa nel taccuino le idee servendosi della matita, della penna e talvolta degli acquerelli. I disegni sono caratterizzati da una grande qualità e precisione, non si osservano quasi mai ripensamenti. Nella seconda fase Caffi trasferisce il disegno sulla tela, componendo l'immagine finale come se fosse un mosaico, i cui tasselli sono i bozzetti. I disegni, oltre ad essere un modo per fissare quello che vede, sono il punto di partenza da cui costruire l'opera. Si può quindi affermare che il fulcro della tecnica artistica del Caffi è il disegno, testimonianza della sua formazione accademica. Infatti, nella prima metà dell'Ottocento, nelle accademie si dava grande importanza al disegno e meno alla tecnica pittorica, la quale, secondo il pensiero del momento, poteva essere appresa facilmente e rapidamente negli atelier dei pittori.

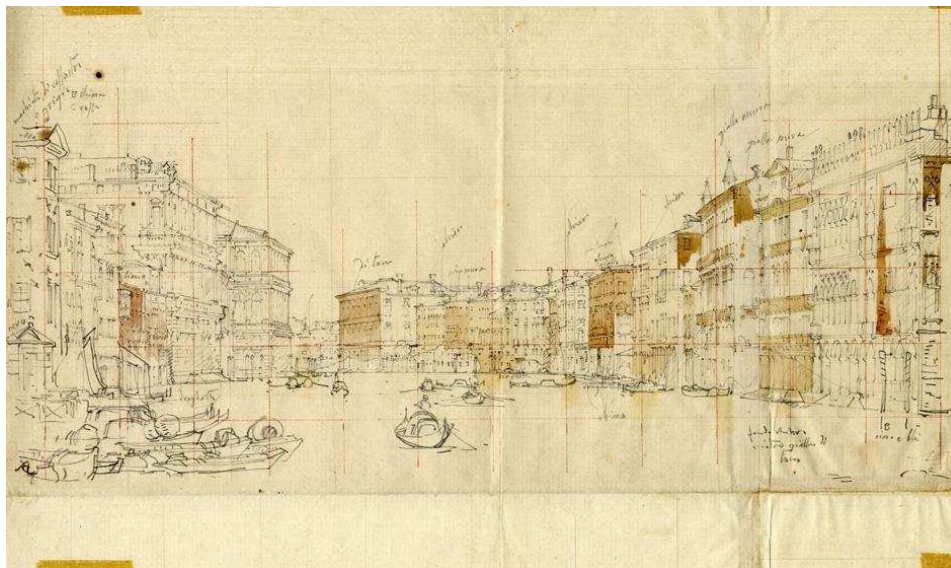


Figura 10. Ippolito Caffi, *Canal Grande Il Canal Grande dalla Ca' D'Oro*, data ignota, matita nera su carta, Venezia, Galleria Internazionale d'Arte Moderna di Ca'Pesaro

Per quanto riguarda i materiali pittorici, il 1800 è caratterizzato dall'introduzione dei materiali industriali, che cambiano il rapporto tra l'artista ed il modo di concepire l'arte. Fino al XIX secolo, la profonda conoscenza delle tecniche artistiche e delle proprietà dei materiali, permetteva all'artista di seguire tutte le fasi della realizzazione; a partire dal 1800 questo legame si spezza. Infatti il romanticismo, inteso come movimento artistico, rifiuta l'introduzione dei nuovi materiali e l'insegnamento accademico, in quanto non permettevano all'artista di sviluppare una propria personalità. L'obiettivo dei romantici è quindi, ricreare il legame diretto tra l'allievo ed il maestro caratteristico delle botteghe medievali. Ippolito Caffi, non si pone in modo completamente indifferente rispetto alle innovazioni, ma non si può nemmeno definire uno sperimentatore. Infatti, dagli studi effettuati sulla tecnica dell'autore [38], si sa che usava tele caratterizzate da una trama fitta, sottile e regolare per le opere di piccolo e medio formato; mentre, per le opere di grandi dimensioni, utilizza trame più grosse. Un esempio sono le opere collocate a Villa Giacomelli (Udine) ed oggetto di studio in questa tesi (Fig. 13). Le tele caratterizzate da una trama fitta e regolare sono prodotte industrialmente con l'ausilio dei telai meccanici. Un altro supporto molto utilizzato dall'artista è il cartoncino, appartenente alla nuova serie di materiali e supporti introdotti nell'Ottocento. I cartoncini dipinti venivano poi intelati dallo stesso artista, malgrado sia noto dai cataloghi della *Winsor&Newton* e della *Lefranc*, che questa tipologia di supporto fossero anche

prodotti industrialmente. Tale ipotesi è sostenuta dall'assenza di timbri delle ditte, sul retro della tela. Un esempio di opera eseguita su cartone intelato è *Veduta del Pantheon* (1837) analizzata nel presente lavoro di tesi (*Fig. 12*). I cartoncini erano particolarmente utilizzati in questo periodo, per la facilità con cui potevano essere trasportati. Per quanto riguarda i leganti Ippolito Caffi, fa largo uso dei leganti ad olio. Si può avere un riscontro scorrendo le opere del catalogo della collezione della *Galleria Internazionale d'Arte Moderna di Ca'Pesaro* [40]. Inoltre utilizzava, anche se in modo meno continuo, la tecnica a tempera e la tecnica mista. Per quanto riguarda i pigmenti Caffi, predilige quelli tradizionali, come ad esempio le terre. Purtroppo le informazioni sull'utilizzo dei pigmenti da parte dell'artista, sono ancora scarse, perché gli studi sono ancora in corso.

In base alle informazioni pervenute, si può quindi concludere che la tecnica di Ippolito Caffi è un misto tra novità e tradizione, quindi fa uso di alcuni materiali industriali o di nuova introduzione, come il cartone o le tele di produzione industriale, ma mantiene comunque un legame con la tradizione, sottolineando ancora una volta la continuità con l'accademia veneziana.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Reagenti

L'idrossiprolina (trans-4-hydroxy-L-proline, >99%) e la p-dimetilamminobenzaldeide (4-dimetilamminobenzaldeide, (per la determinazione dell'idrossiprolina, >99%, HPLC) sono state acquistate dalla *Sigma-Aldrich*.

3.2 Strumentazione

Le misure spettrofometriche sono state effettuate con uno Spettrofotometro UV-Vis Lambda 2 della Perkin Elmer. Sono state utilizzate cuvette di quarzo con un cammino ottico di 1 cm.

Le soluzioni sono state agitate su una piattaforma rotante MPM Instrument e mantenute a temperatura costante con un bagno termostato HAAKE B3 della Fisons.

3.3 Procedura

La procedura seguita in questo lavoro di tesi, prende spunto dal processo proposto da Neuman e Logan [26] nel 1950. Nel corso degli anni tale processo è stato ottimizzato con lo scopo di ridurre le interferenze e di stabilizzare il cromoforo. La procedura applicata nel presente lavoro di tesi tiene conto delle migliorie adottate nel corso degli anni [29, 30-32]

Le fasi del processo per la determinazione dell'idrossiprolina possono essere riassunte in quattro punti:

1. Idrolisi del collagene;
2. Ossidazione dell'idrossiprolina;
3. Sviluppo del cromoforo;
4. Analisi del cromoforo con lo spettrofotometro UV-Vis.

Le singole fasi sono state studiate ed ottimizzate di seguito.

3.3.1 Idrolisi del collagene

Nelle *prove preliminari*, in cui si utilizza l'idrossiprolina, non è necessario effettuare l'idrolisi, mentre per l'analisi del collagene è essenziale per generare l'amminoacido. L'idrolisi viene eseguita in forno a 110°C per quattro ore con HCl 6 M. La provetta contenente il campione viene

sigillata all'interno di una bomba in alluminio e teflon. Le quantità di acido e di campione utilizzate dipendono dal tipo di prova eseguita: per le prove preliminari, sono stati utilizzati 100 mg di colla animale ed 1 mL di acido cloridrico 6 M; mentre per lo studio dei campioni reali sono stati utilizzati 1 mg di campione e 100 µL di acido (Tab. 3). In quest'ultimo caso la quantità di campione è stata ridotta ad 1 mg con lo scopo rendere l'analisi il meno invasiva possibile.

Tabella 3. Quantità di campione utilizzate nell'idrolisi del collagene

Idrolisi acida	
<i>Prove preliminari (campioni di laboratorio)</i>	<i>Campioni Reali</i>
1 mL HCl 6 M 100 mg di campione	100 µL HCl 6 M 1 mg di campione

Al termine dell'idrolisi la soluzione è stata neutralizzata con idrossido di sodio. Il volume e la concentrazione di base necessaria sono stati accuratamente studiati titolando la soluzione alla fine di 4 h di idrolisi [14]. Allo scopo di valutare la concentrazione dell'acido alla fine dell'idrolisi le soluzioni sono state titolate prima con NaOH 6 M e successivamente con NaOH 3.3 M. Le titolazioni sono state effettuate con pHmetro della Metrohm e con l'ausilio dell'indicatore acido-base Blu Bromotimolo 0.04 %.

3.3.2 Ossidazione dell'idrossiprolina

La seconda fase della procedura prevede l'ossidazione dell'idrossiprolina a pirrolo per mezzo del perossido di idrogeno (2 %) in ambiente alcalino (NaOH 2.5 M). La reazione è catalizzata da solfato di rame 0.01 M. I reagenti sono stati aggiunti nel seguente ordine [26]: solfato di rame, idrossido di sodio e acqua ossigenata. La soluzione è stata agitata in modo blando per eliminare gli eccessi dell'agente ossidante e successivamente è stata riscaldata a 80°C per 5 minuti. La provetta viene lasciata raffreddare per qualche minuto, prima della fase successiva.

3.3.3 Sviluppo del cromoforo e analisi della soluzione

Lo sviluppo del cromoforo è stata eseguita in ambiente acido (H₂SO₄ 0.75 M); dopo l'acidificazione viene aggiunto il reagente di Ehrlich, la cui concentrazione ottimale (3 %g/mL o 5 %g/mL) è stata studiata durante questo lavoro di tesi. La soluzione è stata scaldata a bagnomaria a 80°C per 10 o

30 minuti per lo sviluppo del cromoforo. La provetta durante questa fase non è stata riparata dalla luce. Dopo essersi raffreddata fino a raggiungere la temperatura ambiente, la soluzione è stata rapidamente analizzata allo spettrofotometro UV-Vis, perché il cromoforo risulta instabile alla luce [30]. Per il raffreddamento della soluzione è stata usata acqua, in quanto il bagno di ghiaccio, suggerito da Neuman e Logan favorisce la precipitazione della DMAB e i cristalli interferiscono con l'analisi diffondendo la radiazione proveniente dalla sorgente.

Le fasi processo della procedura seguita e le condizioni utilizzate sono riassunte in *tabella 4*.

Tabella 4. Procedimento applicato nelle *prove preliminari* e nelle *prove su provini pittorici*

<i>Procedimento</i>		
	<i>Prove preliminari</i>	<i>Prove su provini pittorici</i>
<i>Idrolisi</i>	-	1 mg di campione in 100 μ L
<i>Hyp</i>	1 mL Hyp 100 μ g/mL	-
<i>Ossidazione</i>	1 mL CuSO ₄ 0.01 M 1 mL NaOH 2.5 M 1 mL H ₂ O ₂ 2 %	100 μ L CuSO ₄ 0.01 M 100 μ L NaOH 2.5 M 100 μ L H ₂ O ₂ 2 %
	mescolamento delicato con piattaforma rotante per 5min	mescolamento delicato con piattaforma rotante per 3min
	mescolamento vigoroso per 5min a 80°C con ancoretta magnetica bagno termostato	Riscaldamento per 3min a 80°C bagno termostato
	raffreddamento in acqua di rubinetto	Raffreddamento in acqua di rubinetto
<i>Sviluppo del cromoforo</i>	4 mL H ₂ SO ₄ 0.75 M 2 mL p-DMAB	300 μ L H ₂ SO ₄ 0.75 M 200 μ L p-DMAB
	riscaldamento a 80°C per 30 min	riscaldamento a 80°C per 10 min
	raffreddamento in acqua di rubinetto	raffreddamento in acqua di rubinetto

3.4 Valutazione della stabilità del cromoforo

Il cromoforo che si sviluppa dalla reazione tra la p-dimetilamminobenzaldeide (p-DMAB) e l'idrossiprolina (Hyp) ossidata a pirrolo, non è stabile alla luce [41, 42]. La sua stabilità è stata quindi valutata studiando il cambiamento dell'assorbanza in funzione del tempo sia in modo continuo che ad intervalli regolari di tempo. Nel secondo caso, per garantire una maggiore attendibilità e accuratezza, la soluzione viene divisa in due parti di cui solo una viene esposta alla luce. Infatti, per quanto la procedura utilizzata per lo sviluppo del cromoforo sia sempre la stessa, il sistema non è riproducibile, a causa dei numerosi fattori che influenzano il sistema. Per tutte le prove la concentrazione di idrossiprolina è pari a 100 μ g/mL.

Le condizioni sperimentali utilizzate nelle prove di stabilità sono espone in *tabella 4*. Nelle prove effettuate è stata cambiata la concentrazione di DMAB:

- a. [p-DMAB] = 5 %² in propanolo 99.5%
- b. [p-DMAB] = 3 % in propanolo 99.5%
- c. [p-DMAB] = 3 % in propanolo 40%

La condizione esposta nel *punto c* è stata applicata solo nelle prove in cui l'assorbanza viene misurata in funzione del tempo ad intervalli regolari.

3.5 Campioni oggetto di studio

3.5.1 Provini pittorici

Il metodo messo a punto in questo lavoro di tesi è stato sperimentato prima su provini pittorici preparati in laboratorio seguendo le ricette di Cennino Cennini tratte dal *Libro dell'arte* [2] e di Luigi Tito (1907-1991) [43]. Le stesure pittoriche sono state eseguite su vetro per evitare interferenze con le colle utilizzate nel processo di collatura della carta. Il pigmento, stemperato con acqua, è stato mescolato con il legante pittorico e successivamente steso. Ogni vetrino è stato preparato stendendo sei strati [44]; prima di ogni stesura quella precedente è stata asciugata con un getto di aria calda. Per ogni ricetta sono state eseguite quattro stesure: una di solo legante, mentre nelle altre il legante è stato mescolato con il pigmento. I pigmenti utilizzati sono: ossido di zinco (ZnO), ossido di ferro (Fe₂O₃) e verde di cromo (Cr₂O₃). Gli stessi pigmenti sono stati impiegati in una precedente tesi di laurea svolta presso il laboratorio di Sensori Elettrochimici del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi dell'Università Ca'Foscari [43] per la determinazione del tuorlo utilizzato come legante pittorico. I leganti scelti per questo scopo sono la colla animale, la tempera all'uovo e la tempera colla e farina. Di seguito saranno descritte le ricette tratte da [2] e [43].

² La concentrazione della DMAB è riportata in percentuale peso/volume (g/mL %). Tutte le concentrazioni percentuali si riferiscono alla concentrazione peso/volume. Eventuali eccezioni saranno espresse.

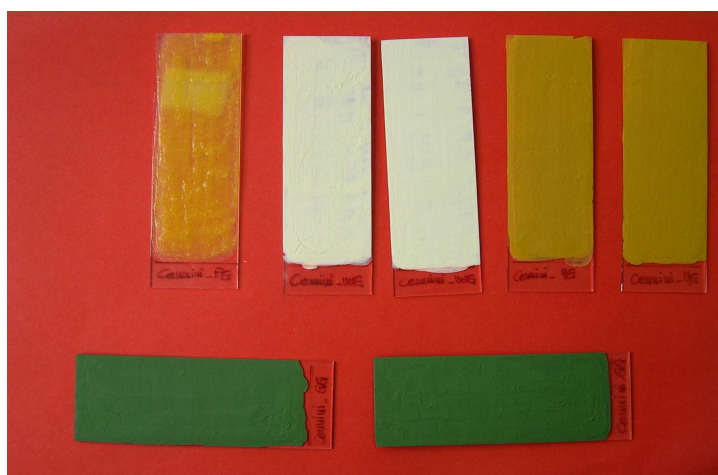


Figura 11. Esempio di stesure pittoriche su vetrino

✓ RICETTE DI CENNINO CENNINI – IL LIBRO DELL’ARTE [2]

- a. Cennino Cennini propone varie tipologie di colla, quella più usata in pittura la definisce *Perfetta colla a temperar gessi ed ancone o ver tavole* (Cap. CX, [2]). Cennini non fornisce indicazioni precise sulle proporzioni di acqua e colla da utilizzare, ma consiglia di lasciare la colla in grani immersa in acqua per una notte e poi scioglierla a bagnomaria.
- b. *Tempera al rosso d’uovo*: il tuorlo dell’uovo deve essere accuratamente separato dall’albume. I pigmenti sono poi stemperati con acqua e con il rosso d’uovo fino ad ottenere un impasto facilmente stendibile. Cennini definisce tale formula adatta per dipingere su qualsiasi superficie.

✓ RICETTE DI LUIGI TITO [43]

- a. *Tempera colla e farina*: la ricetta prevede la preparazione di due composti

<i>Colla di farina</i> Composto A	<i>Colla lapin</i> Composto B
3 parti di farina	1 parte di colla lapin
1 parte di olio di lino cotto	1 parte di aceto
1 parte di aceto	4 parti di acqua
14 parti di acqua	
1 cucchiaino di miele ³	

³ Miele, ha la funzione di umettante ed anti fermentante.

Il *composto A* viene preparato mescolando la farina, l'olio di lino, l'acqua, l'aceto ed il miele e successivamente portato ad ebollizione per cinque minuti. A parte si prepara il *composto B* sciogliendo la colla in acqua tiepida ed aceto. Quando i due composti sono freddi si uniscono due parti del *composto B* con una parte del *composto A*. I pigmenti vengono stemperati in acqua e successivamente si aggiunge la colla fino ad ottenere un impasto facilmente stendibile.

3.5.2 Campioni reali

I campioni reali provengono da tre opere di Ippolito Caffi, di cui una è conservata nel *Galleria Internazionale d'Arte Moderna di Ca'Pesaro* e le altre due tele, di grandi dimensione, sono collocate nella Villa Giacomelli a Pradamano (UD). Tutte le opere saranno descritte brevemente di seguito.

✓ OPERE DI IPPOLITO CAFFI (1809-1866)

La tela oggetto di studio, conservata nella collezione *Galleria Internazionale d'Arte Moderna di Ca'Pesaro*, è *Veduta del Pantheon* (1837). L'opera è stata eseguita durante i primi anni del soggiorno romano, infatti è caratterizzata da un'impronta settecentesca (*Fig. 12*). Ippolito Caffi esegue l'opera su un cartone intelato. Il quadro si trova in buono stato conservativo grazie ad un recente intervento di restauro eseguito da A. Bertoncetto verso la fine degli anni '70 del XX secolo, a causa del grave stato conservativo in cui versava l'opera [45]. Il prelievo è stato effettuato nel margine destro, più precisamente nel *punto 1*, segnato sulla *figura 12*.



Figura 12. Ippolito Caffi, *Veduta del Pantheon*, 1837, olio su cartone intelato, Ca'Pesaro - Galleria Internazionale di Arte Moderna a Venezia, olio, 35 x 50 cm

Le opere di Villa Giacomelli a Pradamano (UD), sono un ciclo di opere raffiguranti vedute di Roma, Venezia, Napoli e Firenze realizzate da Ippolito Caffi nel 1863, appartenenti alla maturità artistica. Eseguite a tempera su tela versano in uno stato di degrado avanzato, in quanto lo strato pittorico è scarsamente adeso al supporto. Gli aloni scuri, detti anche *gore*, presenti sulla superficie pittorica riconducono all'uso della colla animale come legante. Le opere analizzate sono *Molo di Venezia* e *Foro Romano* e sono mostrate nella *figura 13*. I campioni sono stati prelevati nel *punto 1* per l'opera *Foro Romano*; mentre per *Molo di Venezia* è stato prelevato nel *punto 2*. I punti di prelievo sono segnati sulle immagini in *figura 13*.



Figura 13. a) Ippolito Caffi, *Foro Romano*, 1863, Villa Giacomelli a Pradamano (UD), tempera, 320 x 180 cm (b): Ippolito Caffi, *Molo di Venezia*, 1863, Villa Giacomelli a Pradamano (UD), tempera, 320 x 180 cm.

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

Il metodo per la determinazione del collagene in campioni di interesse nel campo dei beni culturali, oggetto di questo lavoro di tesi, si basa su alcuni lavori presenti nella letteratura riguardanti l'applicazione di un metodo colorimetrico con il reagente di Ehrlich. Tale reagente è impiegato principalmente in istologia e nell'analisi di fluidi biologici. Le problematiche riscontrate nel campo dei beni culturali sono piuttosto diverse da quelle del settore bio-medico, motivo per cui è stato necessario un studio approfondito per l'adattamento delle condizioni sperimentali, soprattutto per quanto riguarda le quantità di campione prelevato per l'analisi, che nel caso di opere d'arte deve essere ridotta a valori dell'ordine del milligrammo.

Nella messa a punto della procedura è stata data attenzione alla pericolosità delle sostanze chimiche utilizzate. Infatti eventuali sostanze tossiche per l'operatore, ove possibile, sono state sostituite da sostanze meno nocive. In particolare si è preferito usare H_2O_2 come ossidante e non la cloroamina-T, proposta da Stegemann.

Il lavoro di tesi si è articolato in quattro parti che riguardano: lo studio della formazione del gruppo cromoforo; la procedura di idrolisi del collagene; l'applicazione del metodo a provini di laboratorio e infine l'applicazione a campioni provenienti da opere d'arte.

I PARTE

Studio della formazione e della stabilità del cromoforo

Lo studio preliminare riguardante l'ottimizzazione delle condizioni sperimentali di formazione del cromoforo è stato effettuato utilizzando l'idrossiprolina pura. L'idrossiprolina viene dapprima ossidata a pirrolo, che reagisce poi con il reagente di Ehrlich per formare il gruppo cromoforo, il cui colore caratteristico del prodotto di reazione è il porpora. Queste prove hanno permesso di studiare le migliori condizioni sperimentali da utilizzare per la identificazione delle colle animali. La stabilità del cromoforo viene indicata nella letteratura come un punto critico di questa

metodologia; si è quindi effettuato uno studio della stabilità del cromoforo, al fine di sfruttare al meglio la colorazione della soluzione come indicatore della presenza del collagene.

4.1 Reazione in presenza di idrossiprolina

Le condizioni sperimentali scelte come punto di partenza per la determinazione del collagene ed elencate nella *tabella 1* tengono in considerazione i miglioramenti applicati nel corso del tempo al procedimento originale di Neuman e Logan [26], quali la concentrazione dei reagenti, i tempi di riscaldamento ecc. [29-32]. Queste variazioni hanno lo scopo di ridurre le interferenze e di stabilizzare il prodotto della reazione tra l'Hyp ossidata a pirrolo e la DMAB, la cui struttura molecolare è dovuta al contributo delle due strutture molecolari visibili in *figura 14*, di cui una è caratterizzata dalla di una quinoneimina. L'elevata distribuzione elettronica/densità di carica di questo composto è legata alla presenza della carica positiva sull'azoto del gruppo dimetilamminico.

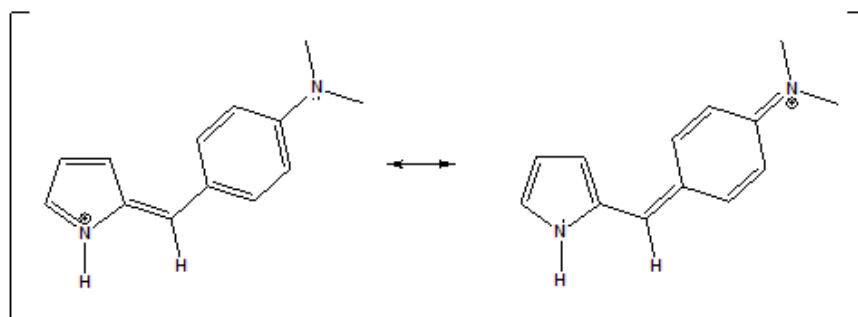


Figura 14. Cromoforo prodotto dalla reazione tra l'Hyp ossidata ed il reagente di Ehrlich

In base alla letteratura, è stata utilizzata una concentrazione di Hyp di 100 $\mu\text{g/mL}$, che è equivalente a 0.76 mM. Tale concentrazione è di molto superiore rispetto a quella che può essere disponibile in un campione reale proveniente da un'opera d'arte (10 $\mu\text{g/mL}$ circa), ma permette di ottenere un segnale intenso e quindi una migliore valutazione preliminare del processo.

In *tabella 5* sono presentate le condizioni sperimentali impiegate per la determinazione dell'Hyp. Tale procedura ha condotto allo sviluppo del cromoforo di colore porpora, il cui spettro di assorbanza è illustrato nella *figura 15*. Esso è caratterizzato da un massimo di assorbanza a λ_{max} di

549 nm e da una spalla intorno a 520 nm che contraddistingue lo spettro del cromoforo prodotto nella reazione [9]; infatti dalla letteratura si sa che lo spettro del cromoforo presenta un massimo valore di assorbanza è tra 540 nm e 560 nm. Il segnale con λ_{\max} a 410 nm, situato tra la regione dell'UV e quella del visibile, è attribuibile alla DMAB non reagita. Il valore di λ_{\max} registrato per il cromoforo, però, non è uguale a quello che riportato in letteratura (557 nm), dove è stata utilizzata la cloramina-T⁴ come ossidante [2]. Tale differenza può essere attribuita all'uso dell'acqua ossigenata nel processo di ossidazione. Altri fattori che influenzano il valore di λ_{\max} sono la diluizione della DMBA e la concentrazione del propanolo [8, 11]. Entrambi questi parametri verranno esaminati nel seguito.

Tabella 5. Condizioni sperimentali applicate per la determinazione dell'idrossiprolina

PROCEDIMENTO	
<i>HYP</i>	1 mL Hyp 100 µg/mL (0.1 % mg/mL) 0.76 mM
<i>OSSIDAZIONE</i>	1 mL CuSO ₄ 0.01 M 1 mL NaOH 2.5 M 1 mL H ₂ O ₂ 2%
	mescolamento blando per 5 min con piattaforma rotante
	mescolamento vigoroso per 5 min a 80°C con ancoretta magnetica
	raffreddamento in bagno di ghiaccio
<i>SVILUPPO DEL CROMOFORO</i>	4 mL H ₂ SO ₄ 0.75 M 2 mL DMAB 5 % in propanolo al 99.5 %
	riscaldamento a 80°C per 30 min
	raffreddamento in acqua di rubinetto

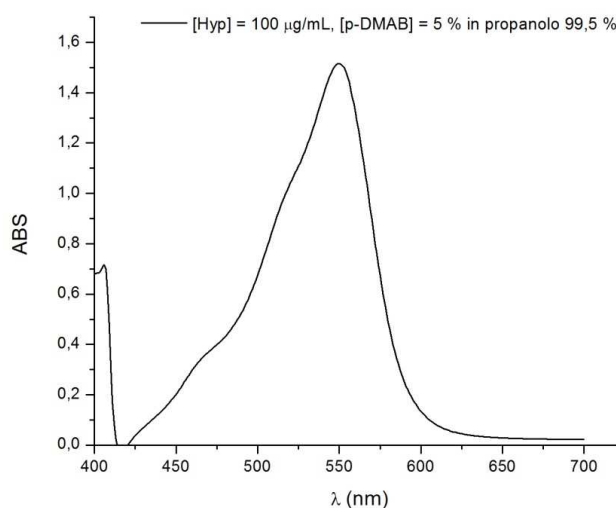


Figura 15. Spettro UV-Vis del cromoforo in [DMAB] = 5 % in propanolo al 99.5 %

⁴ Cloramina-T, agente ossidante introdotto da Stegemann H. [4, 10].

4.1.1 Valutazione della quantità del reagente di Ehrlich e della concentrazione del propanolo

Sulla base dei risultati preliminari ottenuti in questa prova, si è deciso di valutare sia l'effetto della concentrazione del *reagente di Ehrlich* che della concentrazione del propanolo sulla performance dell'analisi.

Da pubblicazioni successive a quella di Neuman e Logan, emerge che il massimo sviluppo di colore da parte del cromoforo si raggiunge già con una concentrazione di DMAB del 2 % [29, 32], quindi ulteriori aumenti della concentrazione non dovrebbero comportare alcun aumento del segnale. Si fa notare che una concentrazione di DMAB al 5% corrispondente a 0.34 M, è in notevole eccesso rispetto alla concentrazione di Hyp in queste prove che è 0.76 mM. Per questa ragione si è deciso di valutare i risultati ottenuti diminuendo, inizialmente la concentrazione DMBA al 3 %.

Un altro aspetto da verificare riguarda la concentrazione del propanolo utilizzato nella solubilizzazione della DMAB, perché insolubile in acqua. Neuman e Logan hanno proposto l'utilizzo di propanolo al 99.5%, mentre Hutter e Singer [32] hanno dimostrato che elevate concentrazioni di solvente comportano una scarsa stabilità del cromoforo. Per valutare questa questione sono state effettuate alcune prove diluendo il propanolo al 40 % con acqua.

Tabella 6. Concentrazioni di DMAB studiate

[DMAB]	[CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH]	[DMAB]	[CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH]
5 %g/mL - 0.34 M	99,5 %	5 %g/mL - 0.34 M	40 %
3 %g/mL - 0.20 M		3 %g/mL - 0.20 M	

Come primo approccio la concentrazione di DMAB è stata diluita mentre la percentuale propanolo/acqua è stata mantenuta costante. Le altre condizioni sperimentali non sono state cambiate (*tabella 5*). Confrontando lo spettro ottenuto diluendo la DMAB al 3 %, con quello ottenuto nelle condizioni proposte da Neuman e Logan ([DMAB] = 5 % e propanolo al 99.5 %), visibili in *figura 16*, non si osservano variazioni importanti. Infatti, il valore di λ_{\max} rimane pressoché costante (548 nm) e la forma del picco è quella caratteristica del cromoforo. Si osserva invece una lieve diminuzione dell'assorbanza. Tale variazione non può essere considerata significativa, in quanto il processo che porta alla formazione del cromoforo è soggetto, come già accennato precedentemente, a numerose variabili. La piccola variazione dell'assorbanza non può quindi essere attribuita con certezza al cambiamento delle condizioni sperimentali.

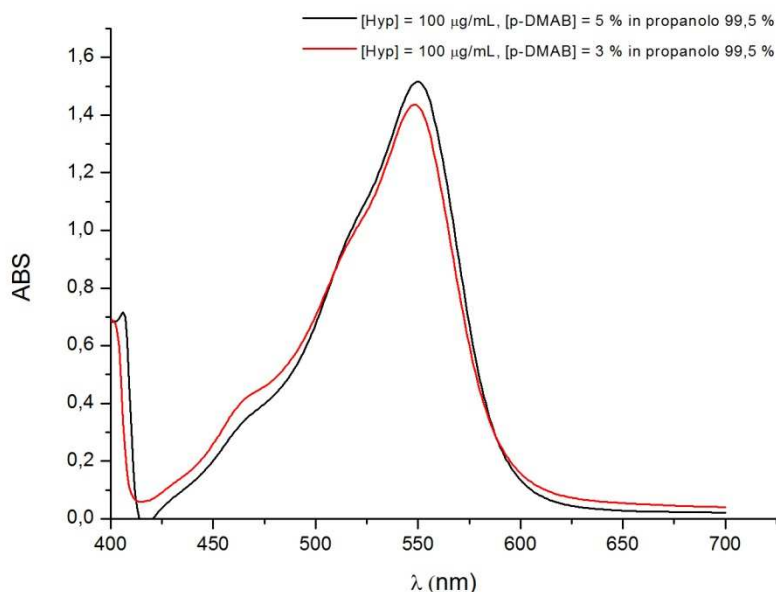


Figura 16. Spettro UV-Vis del cromoforo in [DMAB] uguale a 5 % (---) e 3 % (---), mantenendo costante la concentrazione del propanolo al 99,5 %.

Una variazione significativa si osserva invece modificando la percentuale propanolo/acqua dal 99,5 % al 40 %, come mostra la *figura 17*. Infatti la reazione di condensazione tra il pirrolo ed il reagente di Ehrlich porta all'eliminazione di una molecola d'acqua [35]. A tal proposito i solventi in grado di catturare le molecole di acqua favoriscono la formazione del cromoforo, perché spostano l'equilibrio verso i prodotti [46, 47]. In queste condizioni la λ_{max} registrata è 555 nm e la forma del picco rimane comunque quella caratteristica del cromoforo.

La *figura 17* illustra l'effetto della diminuzione della concentrazione del solvente alle due diverse concentrazioni di DMAB studiate. Si osserva che la diminuzione della concentrazione del propanolo provoca una modifica notevole dello spettro; il segnale di assorbanza è molto diminuito, mentre la forma caratteristica dello spettro del cromoforo è ancora visibile alla concentrazione più elevata di DMAB, mentre ad un valore minore si osserva la comparsa di un picco ad una λ_{max} di 492 nm e la spalla a 520 nm non è più visibile. Il confronto tra questi spettri evidenzia, inoltre, uno spostamento del valore di λ_{max} a valore più elevati di lunghezza d'onda. Questo shift batocromo può essere attribuito all'aumento della concentrazione di acqua nella soluzione, in quanto la presenza di un solvente polare stabilizza lo stato eccitato e λ_{max} si sposta verso valore di energia minore.

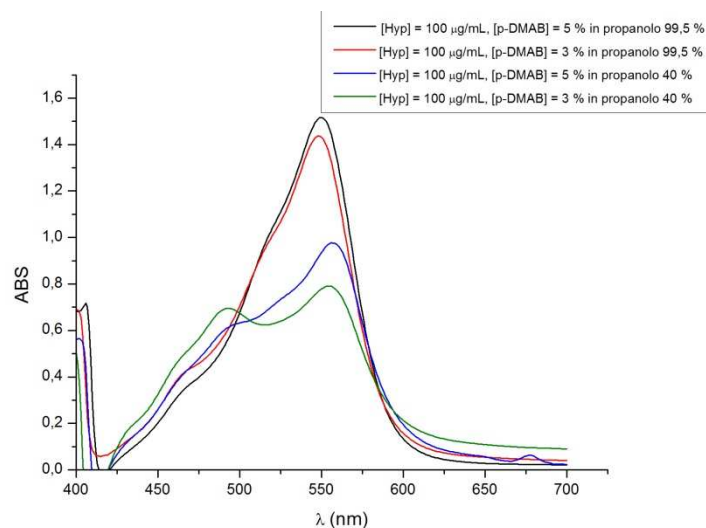


Figura 17. Spettri UV-Vis del cromoforo in [p-DMAB] = 5 % in propanolo al 99,5 % (---); del cromoforo in [p-DMAB] = 3 % in propanolo al 99,5 % (-.-) e del cromoforo in [p-DMAB] = 5 % in propanolo al 40 % (---) e del cromoforo in [p-DMAB] = 3 % in propanolo al 40 % (-.-)

Oltre all'assorbanza, un'altra proprietà che permette di identificare la presenza di idrossiprolina è la colorazione porpora che la soluzione assume al termine dello sviluppo del cromoforo. La sua intensità dipende dalle condizioni sperimentali applicate, ma anche dalla temperatura e dal tempo impiegati durante lo sviluppo del cromoforo [48], questo permette anche una valutazione semi-quantitativa.

4.2 Studio della stabilità del cromoforo

Secondo la letteratura [30, 41-42], il cromoforo che si sviluppa dalla reazione tra la DMAB e l'Hyp ossidata è poco stabile alla luce. Per valutare i problemi che questo comportamento potrebbe causare, nella metodologia proposta in questo lavoro, è stata studiata la sua stabilità. Lo studio si è svolto misurando il cambiamento dell'assorbanza del cromoforo in funzione del tempo sia in modo continuo che ad intervalli di tempo regolari, anche per stabilire se la sorgente dello strumento può influenzarne la stabilità.

4.2.1 Studio della stabilità del cromoforo in modo continuo

La *figura 18a* presenta lo spettro UV-Vis del cromoforo sviluppato per 30 minuti, come previsto dalla procedura proposta, ad una concentrazione di 5 % di DMAB in propanolo 99,5% nelle

condizioni sperimentali descritte nella *tabella 7*. La presenza dell'idrossiprolina è confermata dalla forma dello spettro (*Fig. 18a*) con un λ_{\max} a 553 nm, e dal colore porpora della soluzione alla fine dello sviluppo. Successivamente a questa scansione, è stata registrata l'assorbanza del cromoforo a 553 nm in funzione del tempo, per 1 h 15 min; la curva corrispondente è presentata nella *figura 18b*.

Tabella 7. Condizioni applicate nella *l prova*

PROCEDIMENTO	
<i>IDROLISI</i>	-
<i>[HYP]</i>	1 mL Hyp 100 µg/mL
<i>OSSIDAZIONE</i>	1 mL CuSO ₄ 0.01 M 1 mL NaOH 2.5 M 1 mL H ₂ O ₂ 2 %
	mescolamento delicato per 5 min con piattaforma rotante
	mescolamento vigoroso per 5 min a 80°C con ancoretta magnetica bagnetto termostato
	raffreddamento in un bagno di ghiaccio
<i>SVILUPPO DEL CROMOFORO</i>	4 mL H ₂ SO ₄ 0.75 M 2 mL p-DMAB 5 % in propanolo 99.5 %
	riscaldamento a 80°C per 30 min
	raffreddamento in un bagno di ghiaccio
<i>LUNGHEZZA D'ONDA (λ)</i>	548,98 nm

Dall'andamento della curva dell'assorbanza del cromoforo in funzione del tempo (*Fig. 18b*) si è ipotizzato una cinetica di primo ordine rispetto alla concentrazione del cromoforo. L'andamento non lineare di $\ln(A_0/A)$ con il tempo, dove A_0 rappresenta il valore di assorbanza iniziale e A l'assorbanza in funzione del tempo (*figura 18c*), non risulta in accordo con tale ipotesi. È d'altra parte da notare che risulta invece lineare l'andamento di $\ln [(A_0/A) + c]$ con il tempo, dove c è un opportuno valore costante. Questo sembra indicare un meccanismo più complesso coinvolgente più reazioni parallele. Lo studio di questo meccanismo complesso va oltre lo scopo di questa tesi. Comunque, la variazione percentuale dell'assorbanza (ΔABS %) dopo un intervallo di tempo di un'ora è del 4,7 %, come si osserva dal grafico in *figura 18b*. Il valore riportato è soddisfacente per lo scopo dell'analisi proposta in questa tesi.

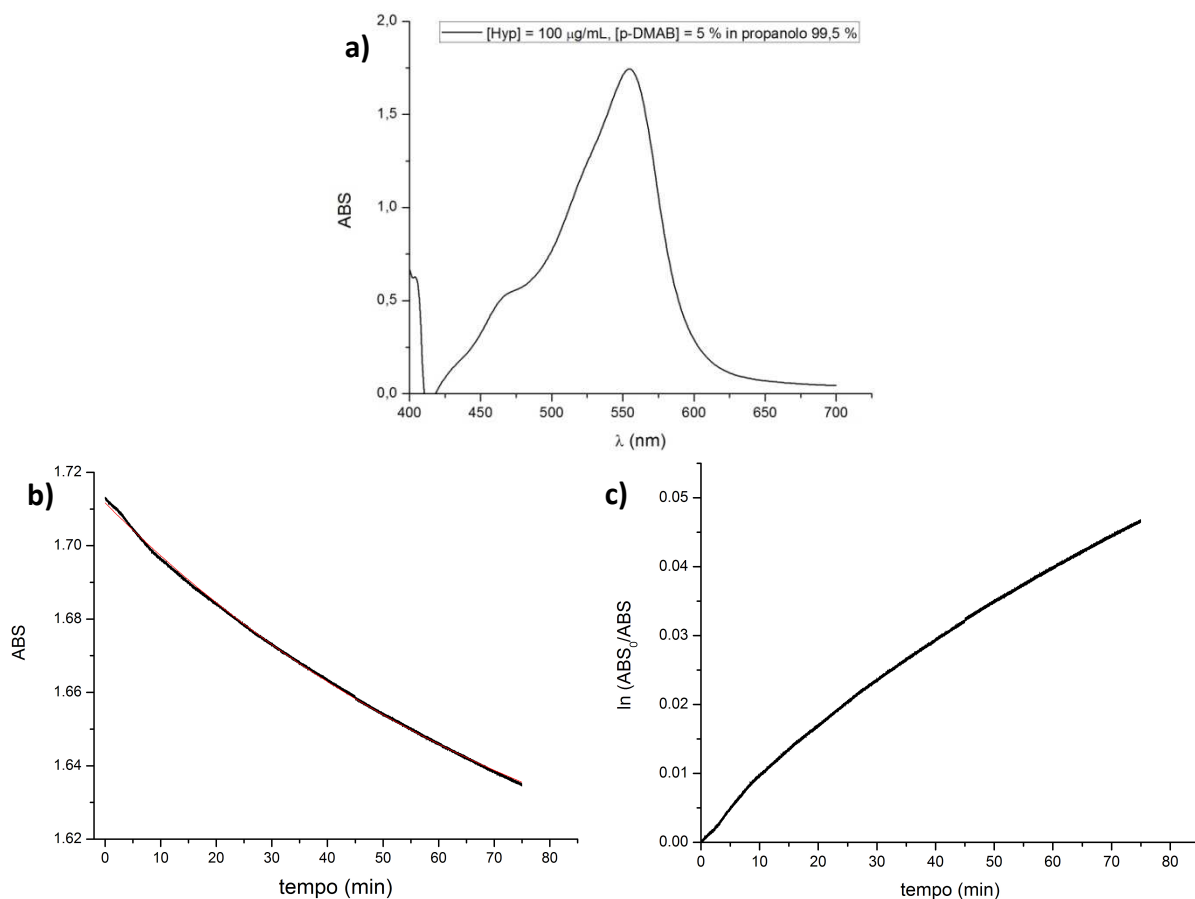


Figura 18. (a) Spettro UV-Vis del cromoforo. (b) Assorbanza in funzione del tempo: [DMAB] = 5 % in propanolo 99,5 %, (c) andamento del $\ln(\text{ABS}_0/\text{ABS})$

Prova analoga a quella appena descritta è stata eseguita con DMAB al 3 %, mantenendo le altre condizioni sperimentali invariate. I risultati ottenuti sono presentati nella *figura 19*. Si osserva che il λ_{max} 548 nm (*fig.19a*) e la variazione dell'assorbanza a questa lunghezza d'onda al variare del tempo (*figura 19b*) presenta un diminuzione del 25 % dopo 2 h 15 min.

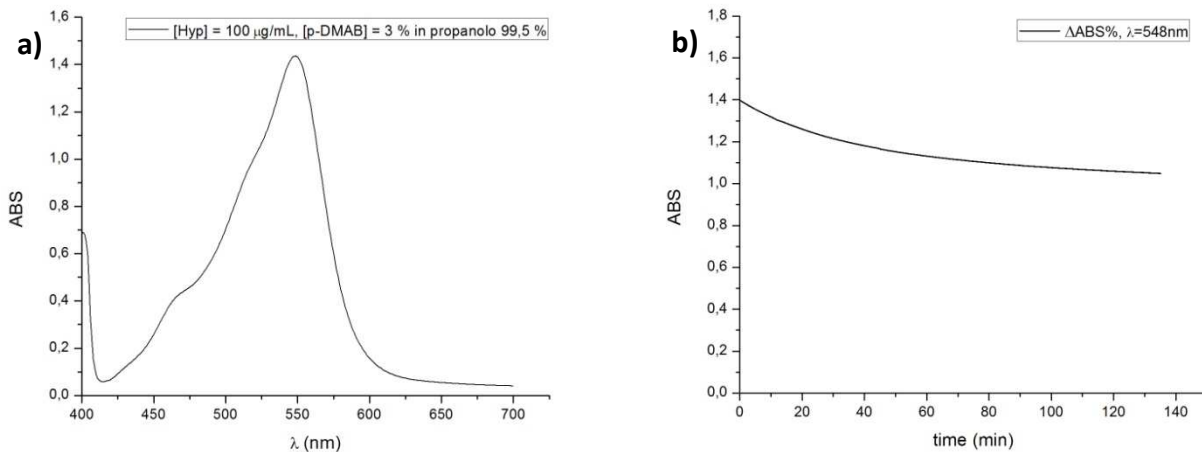


Figura 19. (a) Spettro UV-Vis del cromoforo. (b) Assorbanza in funzione del tempo: [p-DMAB] = 3 % in propanolo 99.5 %

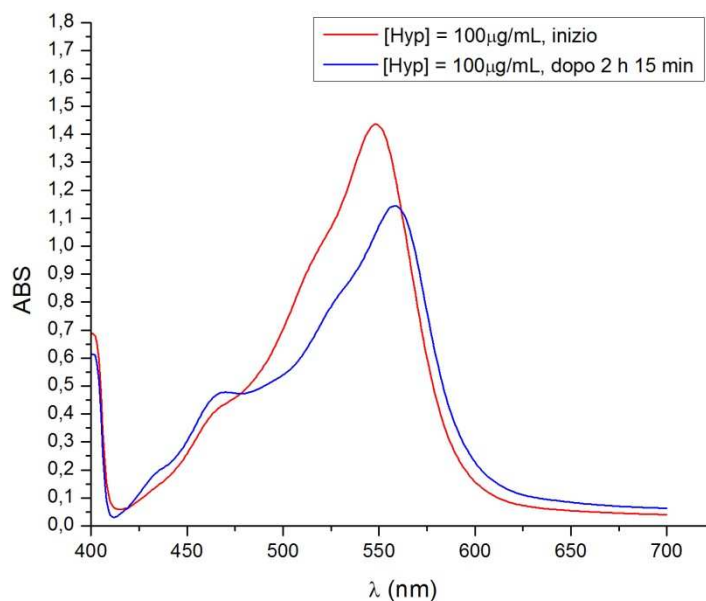


Figura 20. Spettro UV-Vis del prodotto di reazione analizzato subito dopo lo sviluppo del cromoforo (---) e dopo 2 h e 15 min (---)

Come si osserva dal grafico in *figura 19b*, la diminuzione dell'assorbanza è rapida nei primi 40 minuti e successivamente rallenta, ma senza raggiungere la stabilità nell'intervallo di tempo considerato. Oltre ad una rapida diminuzione dell'assorbanza si osserva il simultaneo spostamento del picco di assorbimento massimo verso il rosso (da 548 a 558 nm), dovuta alla presenza di una maggiore quantità di acqua dovuta alla diluizione del propanolo, la quale accelera la decomposizione del cromoforo [46], anche se lo spettro mantiene la sua forma caratteristica. Lo spostamento della lunghezza d'onda verso il rosso è stato osservato anche da Bergmaan e Loxely [48]. Lo spostamento batocromico di λ_{\max} e la diminuzione dell'assorbanza continuano anche dopo

tre giorni, come si osserva dagli spettri in *figura 21*. Questo significa che si tratta di un lento processo degenerativo intrinseco al sistema.

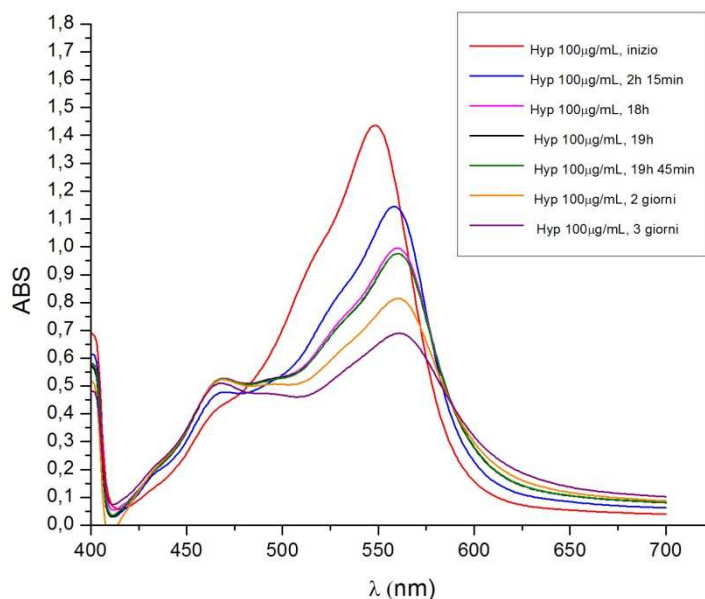


Figura 21. Spettro UV-Vis del prodotto di reazione registrato subito dopo lo sviluppo del cromoforo e gli spettri registrati a tempi diversi fino a tre giorni.

La *figura 22* presenta le curve relative alla variazione dell'assorbanza percentuale, $\Delta\text{ABS} \%$, delle prove eseguite con il reagente al 3 e al 5 %; per essere confrontabili sono stati normalizzati rispetto al valore iniziale. Confrontando gli andamenti registrati si osserva che lavorando ad una concentrazione minore di DMAB si ottiene una variazione di assorbanza maggiore (*Tab .8*) e molto più rapida (*Fig. 22*). Tale comportamento è legato quindi alla concentrazione del reagente di Ehrlich, unica condizione sperimentale ad essere stata modificata.

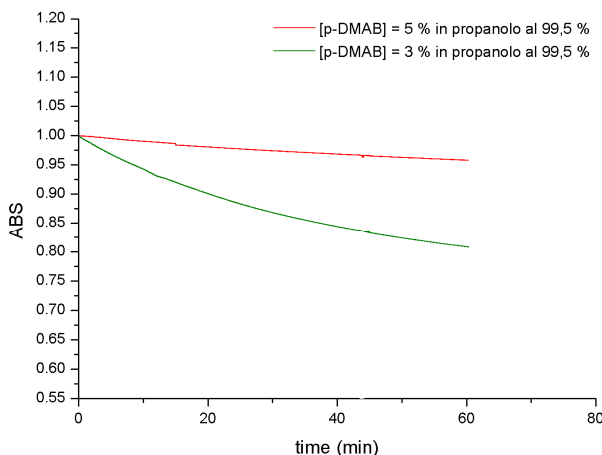


Figura 22. Confronto dell'andamento di $\Delta\text{ABS} \%$ tra la I prova (---) e la II prova (---)

Tabella 8. Confronto tra i valori Δ ABS % della *I prova* e della *II prova*. Entrambi i valori sono stati calcolati ad 1 h 15 min.

[P-DMAB]	5 %	3 %
Δ ABS %	4,7 %	21 %

4.2.2 Studio della stabilità del cromoforo ad intervalli di tempo regolari

Per completare lo studio e assicurarsi che l'esposizione continua alla luce della sorgente dello spettrofotometro non influisca sul risultato, la stabilità del cromoforo è stata valutata misurando l'assorbanza e la lunghezza d'onda ad intervalli regolari di tempo. Al termine dello sviluppo del cromoforo la soluzione è stata divisa in due parti: una è stata protetta con carta stagnola per evitare l'esposizione alla luce; l'altra invece è rimasta esposta alla luce ambiente. In questo modo la soluzione analizzata è sempre la stessa e permette un confronto diretto dei risultati. Le misure sono state effettuate utilizzando le concentrazioni del reagente di Ehrlich impiegate nelle prove precedenti; inoltre è stata modificata la concentrazione del propanolo (*Tab. 9*)

Tabella 9. Concentrazioni del reagente di Ehrlich applicate per lo studio della variazione di assorbanza percentuale in funzione del tempo

	[P-DMAB]	[CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH]
<i>I PROVA</i>	5 %	99,5 %
<i>II PROVA</i>	5 %	40 %
<i>III PROVA</i>	3 %	40 %

Il processo applicato per ottenere il cromoforo è riassunto in *tabella 5*. Al termine dello sviluppo del cromoforo la prima soluzione ad essere analizzata è quella conservata al riparo dalla luce. Lo strumento utilizzato per l'analisi è solo uno per cui le cuvette sono state introdotte nello spettrofotometro in maniera alternata. Le misure vengono effettuate, per ogni soluzione, ad intervalli di 10 minuti. In *figura 23a* si possono osservare gli spettri delle due soluzioni all'inizio dell'analisi, ovvero subito dopo lo sviluppo del cromoforo e dopo 3 h e 10 min. In entrambi i casi gli spettri hanno l'andamento, caratteristico del prodotto di reazione e si sovrappongono. Inoltre dopo 3 h 10 min si osserva una diminuzione dell'assorbanza ed uno spostamento della lunghezza d'onda verso il rosso in modo continuo in funzione del tempo.

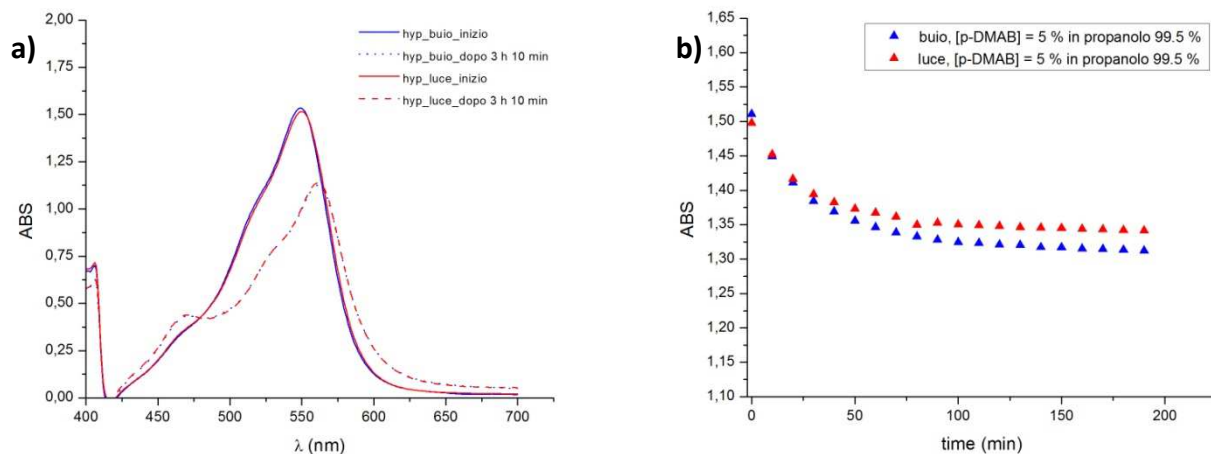


Figura 23. (a) Spettri UV-Vis della soluzione subito dopo lo sviluppo del cromoforo e dopo 3 h 10 min. (b) Andamento dell'assorbanza in funzione del tempo.

Una valutazione completa del sistema è possibile, osservando l'andamento in funzione del tempo. Come si osserva dalla *figura 23b* l'assorbanza varia rapidamente entro la prima ora rallentando successivamente. Inoltre valutando la variazione percentuale dell'assorbanza ($\Delta ABS\%$) dopo un intervallo di 3 h 10 min si nota che la soluzione non esposta alla luce ha una variazione maggiore rispetto a quella esposta (vedi *Tab. 10*). Tale comportamento anche se contrario alle aspettative, può essere legato alla rapidità con cui l'assorbanza decade, questo fa sì che il suo valore iniziale nelle due condizioni non sia lo stesso.

Tabella 10. Variazione percentuale di assorbanza ($\Delta ABS\%$) della soluzione esposta alla luce e della soluzione conservata al riparo dalla luce

$\Delta ABS\%^5$	
LUCE	BUIO
10.5%	13.1%

Nella prova successiva (*II prova*) la concentrazione della DMAB è rimasta invariata, cambia invece la concentrazione del propanolo da 99,5 % al 40 %. Infatti Hutterer F. e Singer E. J. [32] sostengono che elevate concentrazioni di propanolo possono provocare la separazione tra la fase organica e la fase acquosa. L'obiettivo è comunque valutare come la concentrazione del solvente influenza la stabilità del cromoforo. Le condizioni sperimentali applicate sono quelle esposte in *tabella 5*, eccetto per la concentrazione del reagente di Ehrlich. La soluzione è stata analizzata nello stesso

⁵ $\Delta ABS\%$, è stata calcolata con l'equazione 1.

modo della prova precedente, per un tempo totale di 2 h 45 min. In *figura 24a* sono riportati gli spettri subito dopo la fine dello sviluppo del cromoforo e dopo 2 h e 45 min. Come si può osservare, in entrambe le condizioni, gli spettri hanno lo stesso andamento, suggerendo che la differente Δ ABS % non è dovuta alla presenza della luce, ma alla rapidità con cui varia l'assorbanza.

Il confronto dei valori della variazione percentuale dell'assorbanza (Δ ABS %) tra le due prove indica l'effetto della diluzione del solvente (propanolo) sulla stabilità del cromoforo. Come si può osservare dai dati in *tabella 11*, fino a 90 minuti la variazione dell'assorbanza tra le due prove non presenta sostanziali differenze; mentre dopo 120 minuti il cromoforo, preparato con p-DMAB in propanolo al 40%, risulta meno stabile, come è confermato dal grafico in *figura 24a*. La presenza di acqua, come spiegato precedentemente, comporta uno spostamento dell'equilibrio verso i reagenti sfavorendo la reazione di sviluppo del cromoforo e quindi una diminuzione del segnale pur mantenendo costante la concentrazione di idrossiprolina (100 μ g/mL) (*fig.24b*). La minor concentrazione di cromoforo in soluzione probabilmente rende più rapido e più evidente l'instabilità del cromoforo. I valori di Δ ABS % (*Tab. 11*) delle due soluzioni, esposta alla luce e protetta al buio, non hanno una differenza significativa.

Tabella 11, Confronto valori percentuali Δ ABS % tra i dati ottenuto con [p-DMAB] = 5 % in propanolo 99,5 % e [p-DMAB] = 5 % in propanolo 40 % - misure effettuate in modo discreto.

Δ ABS %				
	[P-DMAB] = 5 % IN PROPANOLO 99,5 %		[P-DMAB] = 5 % IN PROPANOLO 40 %	
TEMPO (min)	LUCE	BUIO	LUCE	BUIO
90	9.8%	12.3%	9.2%	12.2%
120	10%	12.6%	24.4%	23.3%
190	10.5%	13.1%	-	-

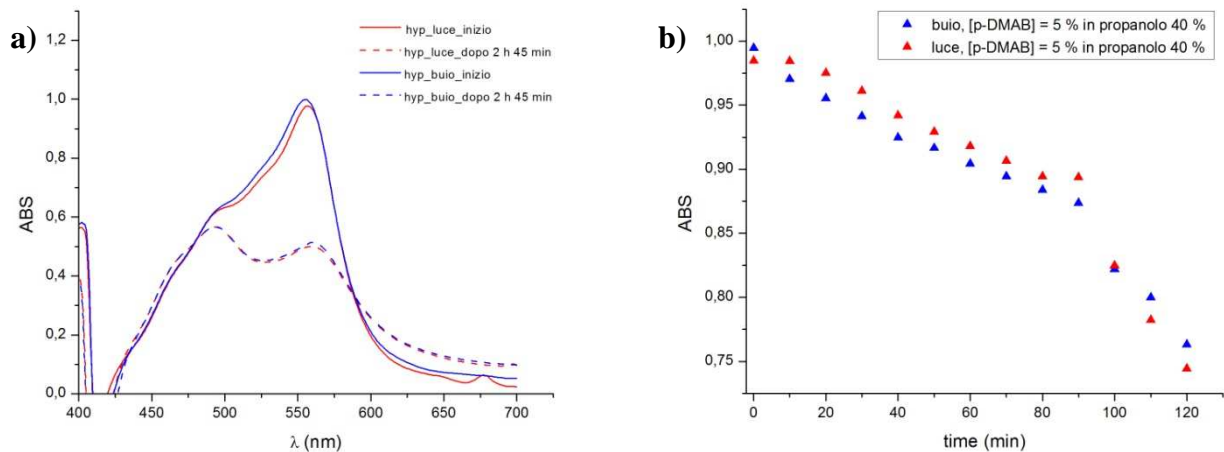


Figura 24. (a) Spettri UV-Vis della soluzione subito dopo lo sviluppo del cromoforo e dopo 2 h 45 min e (b) andamento dell'assorbanza in funzione del tempo della soluzione esposta alla luce e della soluzione conservata al buio.

Nell'ultima prova (*III prova*) è stata ridotta la concentrazione di DMAB, mantenendo costante quella di propanolo. Il procedimento seguito per lo sviluppo del cromoforo (*Tab. 5*) ed il trattamento della soluzione per lo studio della variazione di assorbanza (Δ ABS %) sono uguali alle prove precedenti. La soluzione al termine del processo, per ottenere il cromoforo, è porpora ed il massimo dell'assorbanza è a 554 nm, entrambi questi parametri permettono di individuare la presenza dell'idrossiprolina. Mentre a causa della crescita del picco a circa 493 nm non è individuabile la spalla a circa 520 nm che normalmente caratterizza la forma dello spettro del cromoforo (*Fig. 26a*).

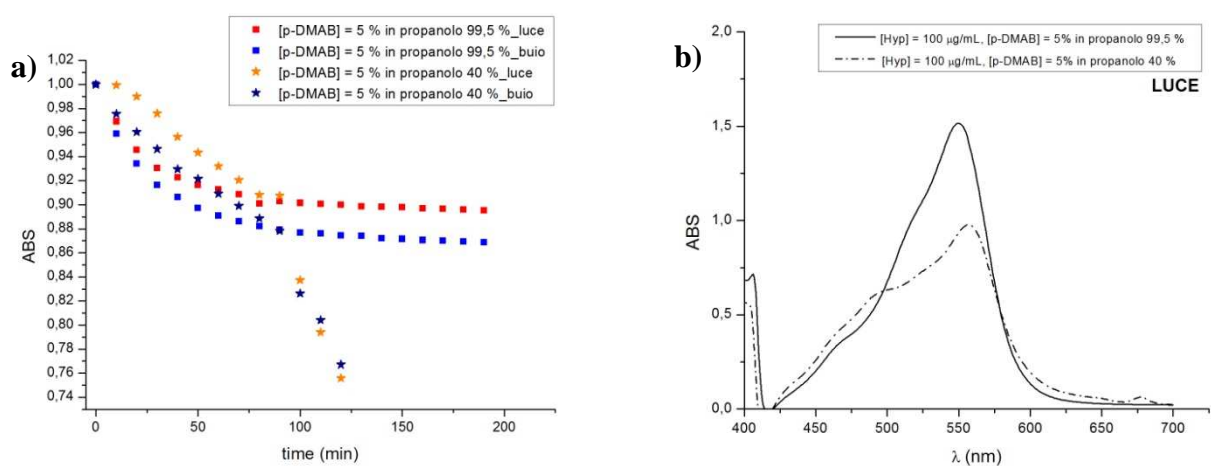


Figura 25. (a) confronto tra la *I prova* e la *II prova* dell'andamento dell'assorbanza in funzione del tempo⁶. (b) Spettri UV-Vis tra la *I prova* e la *II prova* subito dopo la fine dello sviluppo del cromoforo.

⁶ I valori di assorbanza delle due prove sono stati normalizzati per poterli confrontare.

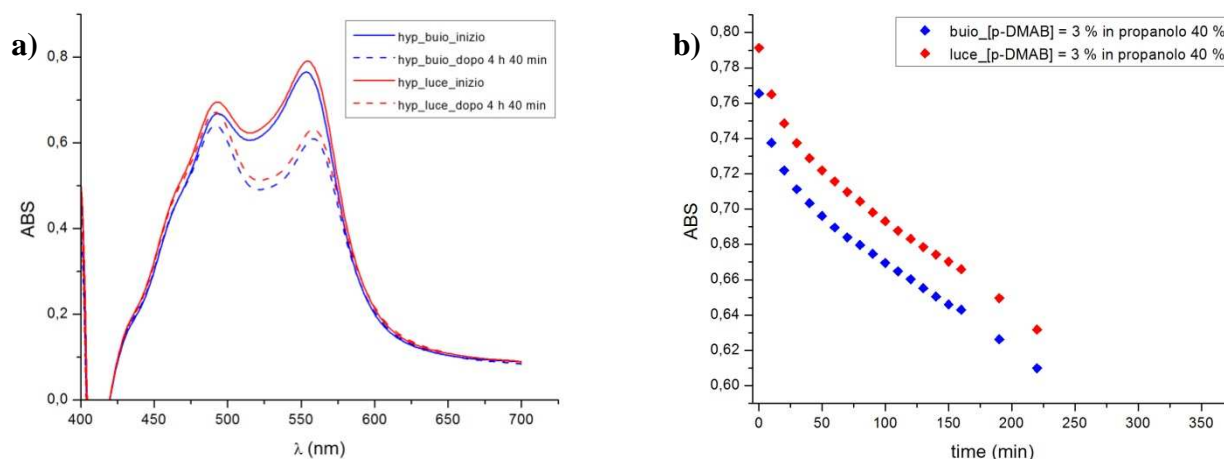


Figura 26. (a) Spettri UV-Vis della soluzione subito dopo lo sviluppo del cromoforo e dopo 4 h 40 min. (b) Andamento dell'assorbanza in funzione del tempo

Gli spettri ottenuti subito dopo lo sviluppo del cromoforo e dopo 4 h e 40 min hanno lo stesso andamento ma non si sovrappongono (Fig. 26a). La differenza di assorbanza tra gli spettri, anche se non è significativa, è legata alla rapidità con cui essa diminuisce, come si può osservare dal grafico dell'ABS in funzione del tempo (Fig. 26b). Infatti le due soluzioni non vengono analizzate contemporaneamente, ma prima quella esposta alla luce e dopo quella esposta al buio. La causa di questo comportamento è da attribuire ad un'elevata instabilità della soluzione dovuta alla concentrazione del reagente di Ehrlich utilizzata e non all'influenza della luce.

Tabella 12, Confronto valori percentuali della variazione di assorbanza tra i dati ottenuto con [p-DMAB] = 5 % in propanolo 99,5 %, [p-DMAB] = 5 % in propanolo 40 % e [p-DMAB] = 3 % in propanolo 40 %.

$\Delta ABS \%^7$						
	I PROVA		II PROVA		III PROVA	
	[P-DMAB] = 5 % IN PROPANOLO 99,5 %		[P-DMAB] = 5 % IN PROPANOLO 40 %		[P-DMAB] = 3 % IN PROPANOLO 40 %	
MINUTI	LUCE	BUIO	LUCE	BUIO	LUCE	BUIO
90	9.8%	12.3%	9.2%	12.2%	11.9%	11.8%
120	10%	12.6%	24.4%	23.3%	13.7%	13.7%
190 ⁸	10.5%	13.1%	-	-	15.6%	15.3%

Dal confronto dei dati della III prova con quelli delle due prove precedenti (Tab. 9), si può concludere che le condizioni che permettono una migliore stabilità del cromoforo sono quelle

⁷ Percentuale di variazione dell'assorbanza, è stata calcolata con l'equazione 1.

⁸ I dati della III prova sono stati calcolati a 150 minuti, perché mancava il dato a 190 minuti.

utilizzate nella *l prova*. Infatti permettono di ottenere un'elevata assorbanza ed un prodotto di reazione più stabile nel tempo (*Fig. 25a*). Inoltre anche la forma dello spettro è quella caratteristica, in quanto la spalla a 525 nm è ben visibile. In tutte le condizioni si può sostenere con buona certezza che l'instabilità della soluzione non dipende dalla presenza della sorgente luminosa, ma è una proprietà intrinseca del prodotto di reazione. Lo spostamento della λ_{\max} osservato diluendo il propanolo dipende dall'agente ossidante. Infatti utilizzando l'acqua ossigenata la lunghezza d'onda si sposta da 548 nm a 555 nm. La diluizione del propanolo invece provoca una diminuzione del segnale. Infatti il propanolo fungendo da disidratante è in grado di sottrarre le molecole di acqua, derivanti dalla reazione tra la DMAB ed il pirrolo, favorendo lo spostamento dell'equilibrio verso i prodotti. Una minor concentrazione del propanolo comporta quindi un minor effetto disidratante e quindi una minor concentrazione del prodotto di reazione. La concentrazione più vantaggiosa per la p-dimetilamminobenzaldeide è del 5 %. Questo valore è ottimale per materiali biologici e permette di ottenere un segnale più alto [32].

Sulla base dei risultati ottenuti, *tabella 13* e *figura 27* dello studio dell'assorbanza in funzione del tempo in modo continuo e ad intervalli di tempo regolari, la sorgente non influenza la stabilità del cromoforo. Questo comportamento può essere legato ad una minore esposizione della soluzione alla luce solare. Si può quindi concludere che nelle prove successive sarà utilizzata una concentrazione di DMAB pari al 5 % in propanolo al 99.5 %; la procedura applicata per il resto delle prove è riassunta in *tabella 14*.

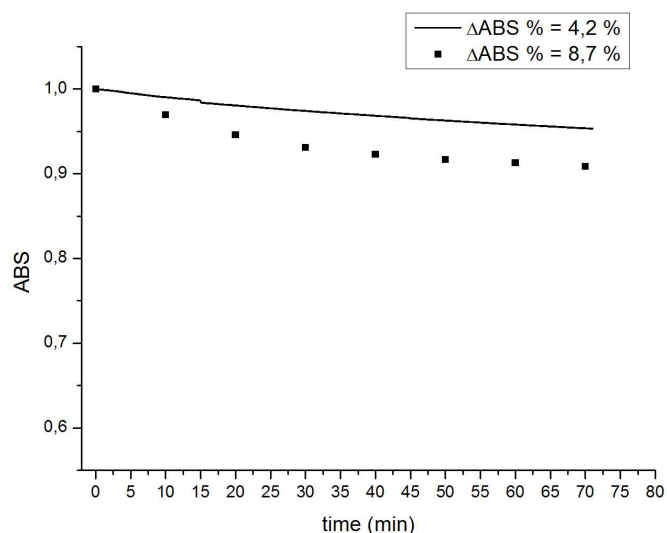


Figura 27. Confronto dell'andamento dell'assorbanza in funzione del tempo misurata in modo continuo (—) e ad intervalli di tempo (■)

Tabella 13, Confronto tra valori della variazione di assorbanza determinati esponendo la soluzione in modo continuo alla sorgente dello strumento (*Luce - continua*) e ad intervalli di tempo regolari (*Luce - intervalli*)

Δ ABS %		
	[p-DMAB] = 5 % IN PROPANOLO 99,5 %	
MINUTI	LUCE - CONTINUA	LUCE - INTERVALLI
60	4.2%	8.7%

Tabella 14, Procedimento applicato per la determinazione colorimetrica dell'idrossiprolina

PROCEDIMENTO	
<i>IDROLISI</i>	-
<i>HYP</i>	1 mL Hyp 100 ug/mL
<i>OSSIDAZIONE</i>	1 mL CuSO ₄ 0.01 M
	1 mL NaOH 2.5 M
	1 mL H ₂ O ₂ 2%
	mescolamento delicato per 5min con piattaforma rotante
	mescolamento vigoroso per 5min a 80°C con ancoretta magnetica
	raffreddamento in un bagno di ghiaccio
<i>SVILUPPO DEL CROMOFORO</i>	4 mL H ₂ SO ₄ 0.75 M
	2 mL p-DMAB 5 % in propanolo al 99,5 %
	riscaldamento a 80°C per 30 min
	raffreddamento in acqua di rubinetto

4.3 Applicazione del metodo di Collings e Young

La procedura applicata da Collings e Young [17] per la determinazione della gelatina nei procedimenti fotografici collagene, ha costituito il punto di partenza per l'applicazione nella

determinazione delle colle animali nella tecnica a tempera in questo lavoro di tesi. Il procedimento da loro applicato, rispetto a quello originale di Neuman e Logan, ha subito delle modifiche: l'idrolisi è stata condotta in NaOH 4 M a bagnomaria per 5 minuti, la soluzione al termine dell'idrolisi non è stata neutralizzata e nella fase di ossidazione non è stato aggiunto l'idrossido di sodio. Prove preliminari sono state eseguite in questo lavoro applicando il metodo di Collins e Young. Malgrado la procedura sia stata accuratamente seguita e le prove ripetute, i risultati ottenuti sono negativi: la soluzione rimaneva torbida ed incolore, probabilmente dovuto all'incompleta idrolisi della proteina. I risultati negativi ottenuti per determinazione del collagene, applicando il metodo proposto da Collings e Young, hanno reso necessario uno studio approfondito del sistema a cominciare dalle condizioni di idrolisi.

II PARTE

IDROLISI DEL COLLAGENE

4.4 Idrolisi acida del collagene

La determinazione colorimetrica del collagene, attraverso la reazione tra l'idrossiprolina ossidata a pirrolo ed il reagente di Ehrlich, richiede che l'amminoacido sia libero in soluzione. Per questa ragione è necessario effettuare l'idrolisi della proteina prima di iniziare la procedura per permettere la sua determinazione. Come si osserva dalla *figura 28*, il processo di idrolisi coinvolge la rottura dei legami peptidici, permettendo così il rilascio degli amminoacidi in soluzione:

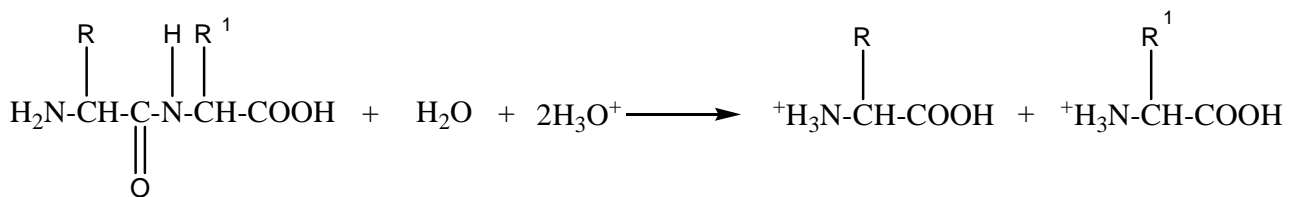


Figura 28. Reazione generica coinvolta durante l'idrolisi della proteina

Le condizioni normalmente applicate e proposte nella letteratura richiedono procedure elaborate e tempi lunghi [41, 44]. Ad esempio in alcuni casi l'idrolisi viene effettuata in forno a microonde in presenza di acido cloridrico 6 M. L'idrolisi avviene in un ambiente chiuso, in presenza dell'acido in fase vapore ed in assenza di ossigeno (N₂) [20]. L'obiettivo di questa parte del lavoro è dunque

mettere a punto una procedura di idrolisi che permetta l'uso di apparecchiature non troppo complesse, ma comunque efficiente. A tale scopo si propone di seguire il metodo applicato Ito et al. [14] in cui 100 mg di pelle di topo vengono idrolizzati in 1 mL di acido cloridrico 6 M in forno a 120°C per 4 h. La stessa procedura è stata applicata a 100 mg di colla lapin in forma di dispersione acquosa colloidale, preparata seguendo la ricetta proposta da Cennino Cennini [2]. La provetta con il campione è stata sigillata all'interno di una bomba in teflon ed alluminio, per evitare l'ossidazione degli amminoacidi durante il processo di idrolisi [7]. Al termine delle 4 h la quantità di acido non reagito presente nella soluzione deve essere ridotta al minimo tramite neutralizzazione con NaOH, in modo da ridurre le interferenze da parte degli altri amminoacidi [44, 50]. Inoltre elevate concentrazioni di acido in soluzione provocano un rapido decadimento della tinta [30]. Il procedimento di idrolisi applicato da Ito ed i suoi collaboratori, non richiede altri passaggi oltre all'eliminazione dell'eccesso di acido. Il prodotto dell'idrolisi può essere conservato in frigo. La concentrazione dell'idrossido di sodio, necessaria per neutralizzare l'acido, è stata determinata titolando la soluzione acida al termine d'idrolisi.

La colla animale utilizzata per queste prove preliminari è stata prodotta in laboratorio seguendo la ricetta di Cennino Cennini. Nella soluzione, al termine dell'idrolisi, è contenuta la miscela di amminoacidi.

4.4.1 Titolazione della soluzione di idrolisi

Al termine dell'idrolisi l'acido deve essere eliminato con l'aggiunta di NaOH, per ridurre le interferenze da parte degli altri amminoacidi [50]. Per individuare il volume di idrossido di sodio da aggiungere è necessario determinare la concentrazione dell'acido dopo le 4 h di idrolisi. A tale scopo è stata effettuata una titolazione seguita sia con il pHmetro che con l'indicatore acido-base blu bromotimolo⁹, il cui punto di viraggio è tra 6.0 e 7.6 [7]. Quest'ultimo è stato utilizzato per permettere anche un approccio visivo nella determinazione del punto di equivalenza. I volumi utilizzati da Ito ed i suoi collaboratori sono troppo bassi per permettere la titolazione della soluzione d'idrolisi con il pHmetro, in quanto la parte sensibile dell'elettrodo a vetro non è

⁹ *Blu Bromotimolo*, a pH molto acidi la soluzione è gialla, a pH debolmente acidi è verde, mentre a pH basici la soluzione è blu.

immersa in soluzione. Per questa ragione il volume è stato aumentato mantenendo il rapporto *volume di acido - massa del campione* costante; sono stati quindi utilizzati 4 mL di HCl 6 M e 400 mg di colla animale. La soluzione è stata titolata con NaOH 6 M.

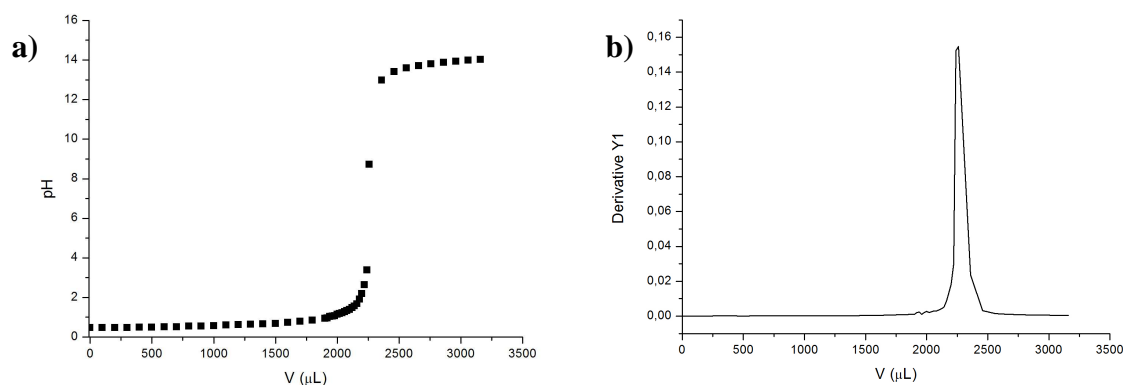


Figura 29. (a) Curva di titolazione dell'acido cloridrico dopo 4 h di idrolisi con NaOH 6 M. (b) Derivata prima della curva di titolazione

La *figura 29* presenta la curva di titolazione della soluzione acida prodotta nell'idrolisi della colla. Il punto di equivalenza è stato raggiunto dopo l'aggiunta di 2.25 mL di NaOH e la concentrazione dell'acido al termine dell'idrolisi è circa 3.4 M. Il risultato ottenuto indica che l'acido durante l'idrolisi viene consumato. Dalle foto in *figura 30* si vede che la soluzione dopo l'aggiunta dell'indicatore è rosa e non gialla, a causa dell'elevata acidità della soluzione.

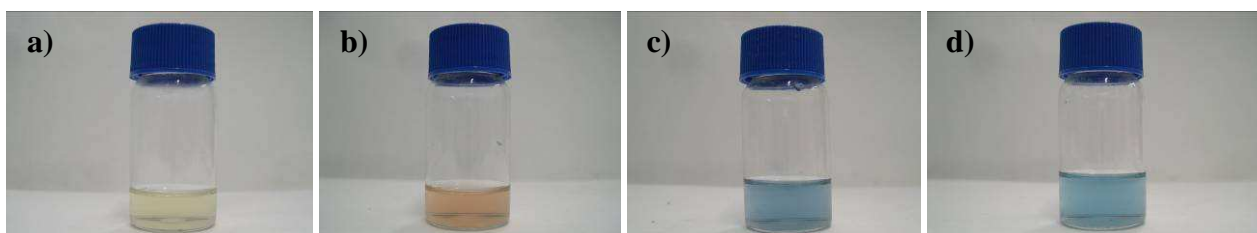


Figura 30. Variazione colorimetrica della soluzione di HCl dopo 4 h di idrolisi: a) soluzione senza l'indicatore; b) soluzione dopo l'aggiunta dell'indicatore; c) soluzione pH 8,72 (punto equivalente); d) soluzione a pH 14.

Vista la necessità di semplificare la procedura e l'impossibilità di utilizzare il pHmetro, dati i bassi volumi (1 mL) che saranno utilizzati nell'idrolisi dei provini sintetici, viene effettuata un'altra titolazione con NaOH 3.3 M, in questo modo si valuta la possibilità di aggiungere un volume di base simile a quello dell'acido. Il punto di equivalenza in questo caso ($[NaOH] = 3.3 M$) viene

raggiunto dopo l'aggiunta di 4.4 mL di idrossido di sodio e la concentrazione finale dell'acido cloridrico è 3.6 M.

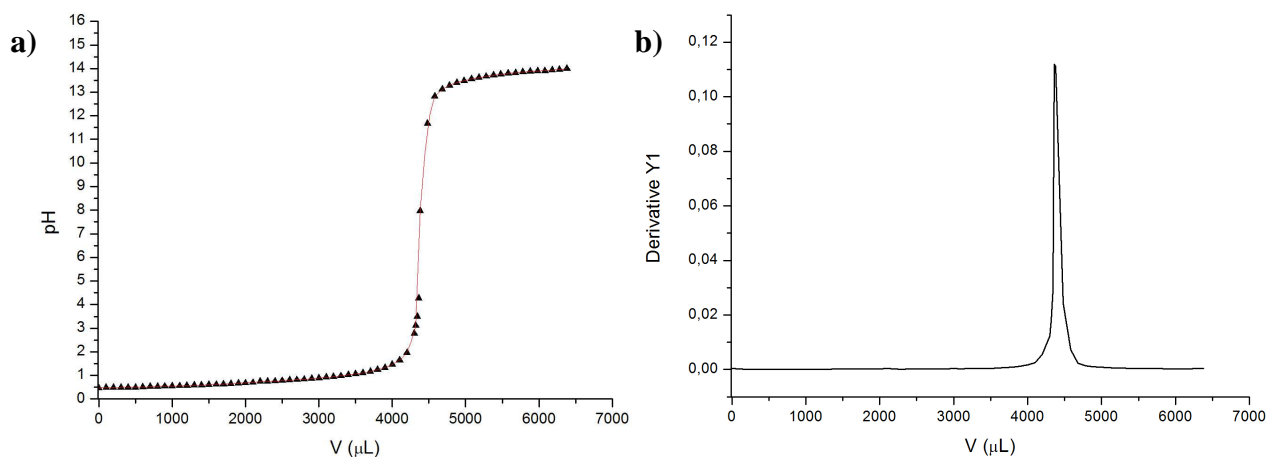


Figura 31. (a) Curva di titolazione dell'acido cloridrico dopo 4 h di idrolisi con NaOH 3,3 M. (b) Derivata prima della curva di titolazione

La seconda titolazione suggerisce che la concentrazione dell'acido al termine dell'idrolisi non sarà sempre la stessa, per questa ragione nelle prove successive l'acido in eccesso sarà eliminato attraverso l'aggiunta graduale della base e ad ogni aggiunta il pH sarà controllato con la cartina indicatrice. Sulla base dei dati ottenuti la concentrazione di NaOH utilizzata per la neutralizzazione della soluzione di idrolisi nelle prove successive sarà 3.3 M, perché permette di aggiungere un volume simile a quello dell'acido.

4.4.2 Prove preliminari di idrolisi

Le prime prove di idrolisi del collagene sono state effettuate utilizzando 100 mg di colla animale, prodotta in laboratorio seguendo la ricetta di Cennino Cennini, ad essa sono stati aggiunti 1 mL di HCl, quindi la soluzione è stata lasciata in forno a 120°C per 4 h e successivamente neutralizzata con 1,09 mL di NaOH 3,3 M. L'analisi del collagene è stata eseguita seguendo il procedimento schematizzato nella *tabella 14*. Alla fine dello sviluppo del cromoforo la soluzione si presentava di colore fucsia, come mostra l'immagine nella *figura 32a*. Lo spettro UV-Vis, presentato nella *figura 32b*, è quello caratteristico del prodotto di reazione tra l'idrossiprolina ossidata a pirrolo e la DMAB. Infatti la λ_{\max} è 549 nm ed è visibile la spalla a circa 520 nm. Il picco a 414 nm è attribuibile alla DMAB.

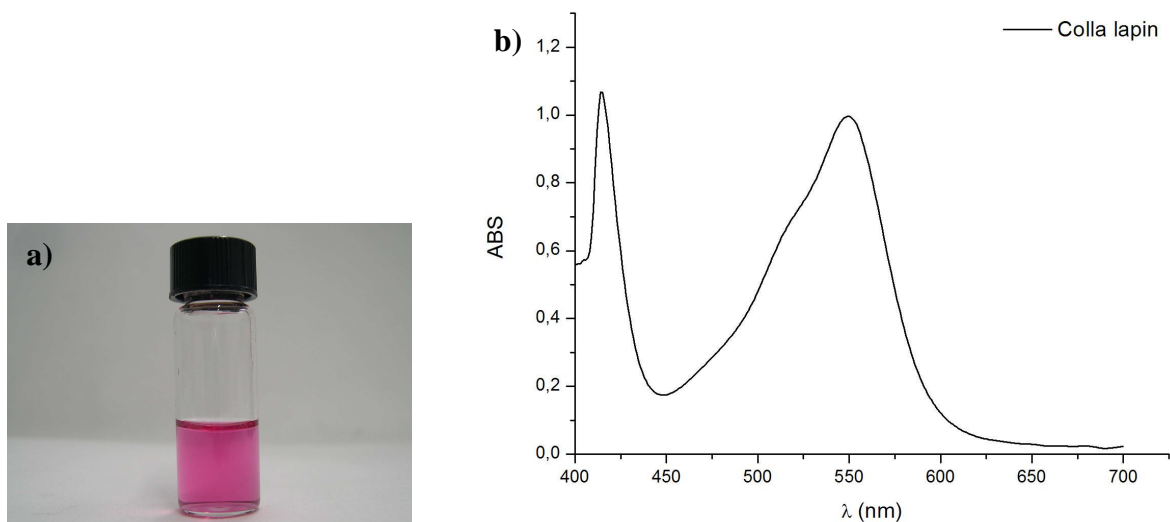


Figura 32. (a) Soluzione del prodotto di reazione al termine dello sviluppo del cromoforo. (b) Spettro UV-Vis del cromoforo.

La concentrazione di idrossiprolina determinata in 0.091 g di collagene è pari 13 % mg/mL. Tale valore è circa mille volte più piccolo rispetto ai valori di Hyp nel collagene tabulati (vedi *Tab. 1*); probabilmente il tempo (4 h) applicato per l'idrolisi non idrolizza completamente il collagene, ma permette comunque di idrolizzarlo parzialmente rilasciando in soluzione l'idrossiprolina, senza la necessità di ricorrere ad apparecchiature e metodologie troppo complesse: la soluzione è fucsia, la forma dello spettro è quella caratteristica del cromoforo e la λ_{\max} è in accordo con la letteratura [19].

Le condizioni sperimentali applicate nella prova preliminare di idrolisi saranno quindi utilizzate nelle prove successive: la colla animale sarà idrolizzata con acido cloridrico 6 M, a 120°C. La provetta contenente il campione sarà sigillata all'interno di una bomba di teflon e alluminio per evitare l'ossidazione degli amminoacidi da parte dell'ossigeno [7]. L'eccesso di acido, al termine delle 4 h, sarà eliminato con NaOH 3.3M.

4.4.3 Riduzione delle quantità del campione

Le prime prove sono state effettuate mantenendo le quantità di campione utilizzate da Ito ed i suoi collaboratori. L'obiettivo, in questa fase del lavoro, sarà ridurre la quantità da 100 mg ad 1 mg [49], perché nel campo dei beni culturali il prelievo del campione è un danno per l'opera oggetto di studio. Per questa ragione la quantità di campione necessaria per l'analisi deve essere ridotta al

minimo, con l'obiettivo di minimizzare il danneggiamento dell'opera. Per raggiungere questo obiettivo è necessario individuare il minimo volume di acido da utilizzare nel processo di idrolisi che consente di ottenere un segnale distinguibile dal bianco.

Nelle prove effettuate è stato mantenuto costante il peso del campione (1 mg), mentre il volume di acido è stato diminuito passando da 1 mL, a 200 μ L ed infine a 100 μ L, mantenendo le altre condizioni di idrolisi costanti (4 h in forno a 120°C). Le soluzioni al termine della prova sono state neutralizzate con un volume appropriato di NaOH 3.3 M e il pH controllato con la cartina indicatrice.

Come si osserva dagli spettri in *figura 33*, utilizzando 1 mL e 200 μ L di acido il segnale, rispetto alle prove preliminari, non è intenso. Focalizzando l'attenzione solo sul picco del cromoforo (*Fig. 33b*) e tralasciando quello della DMAB a 410 nm, malgrado i valori di assorbanza siano molto bassi rispetto a quelli ottenuti precedentemente (*Fig. 32*), lo spettro ha comunque tutti gli elementi che permettono l'identificazione dell'idrossiprolina. La tinta della soluzione (*Fig. 34a e 34b*) però ha perso saturazione non permettendo di limitare l'identificazione della colla animale ad un approccio visivo. La diminuzione dell'assorbanza e del colore è legata alle basse concentrazioni di Hyp (*Tab. 15*), perché i volumi di acido utilizzati comportano un'eccessiva diluizione della miscela di aminoacidi; per questa ragione il volume viene ridotto ulteriormente a 100 μ L. In queste condizioni il segnale del cromoforo è intenso (*fig.33a*) e anche la tinta della soluzione è satura (*fig.34c*). Infatti, come si vede in *tabella 15*, la concentrazione di Hyp è più alta e simile al valore ottenuto precedentemente idrolizzando 100 mg di colla lapin in 1 mL di HCl, in cui si otteneva una concentrazione 13% mg/mL.

Tabella 15. Valori di assorbanza e concentrazioni di Hyp determinati variando il volume di acido per l'idrolisi

V_{HCl}	1 mL	200 μ L	100 μ L
ABS	0.037	0.05	0.68
[HYP] (mg/mL)	0.5 % mg/mL	0.7 % mg/mL	9.1 % mg/mL

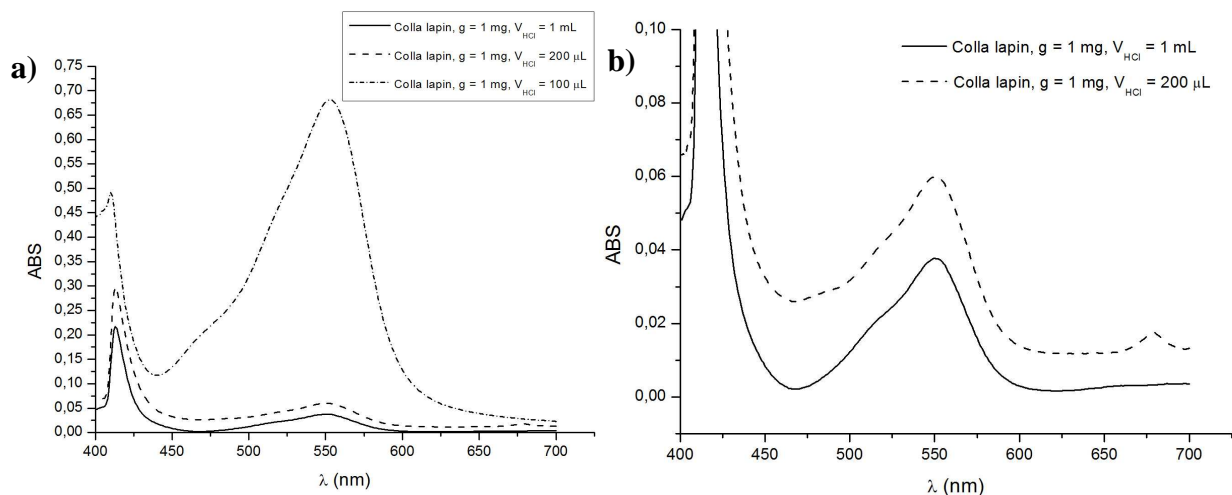


Figura 33. (a) Spettri UV-Vis delle soluzioni di cromoforo cambiando il volume di HCl 6 M usato nell'idrolisi: 1 mL (—), 200 µL (---), 100 µL (- · -). (b) Confronto tra gli spettri UV-Vis tra la prova effettuata con 1 mL e 200 µL.



Figura 34. Soluzione del cromoforo ottenuta cambiando il volume di HCl 6 M utilizzato: (a) 1 mL; (b) 200 µL; (c) 100 µL

I risultati ottenuti indicano che il volume di acido cloridrico da utilizzare per 1 mg di campione è 100 µL, in quanto permette un'analisi semi-quantitativa e qualitativa. Infatti il segnale ottenuto è intenso e la tinta della soluzione è saturata. L'uso di questo volume nella soluzione di idrolisi richiede un adattamento dei volumi dei reagenti da utilizzare nella procedura di determinazione dell'idrossiprolina [17]. La procedura ed i volumi utilizzati nelle prove successive sui provini pittorici e sui campioni prelevati dalle opere sono quindi riassunti in *tabella 16*.

Tabella 16, Procedura applicata per la determinazione dell'idrossiprolina

PROCEDIMENTO	
<i>IDROLISI</i>	1 mg colla lapin 100 µL [HCl] = 6 M [NaOH] = 3.3 M
<i>HYP</i>	200 µL soluzione con Hyp
<i>OSSIDAZIONE</i>	200 µL CuSO ₄ 0.01 M 200 µL NaOH 2.5 M 200 µL H ₂ O ₂ 2% mescolamento delicato per 3 min

	con piattaforma rotante
	riscaldamento per 3 min a 80°C
	raffreddamento in acqua di rubinetto
SVILUPPO DEL CROMOFORO	600 µL H ₂ SO ₄ 0.75 M
	400 µL p-DMAB 5 % in propanolo al 99,5 %
	riscaldamento a 80°C per 10 min
	raffreddamento in acqua di rubinetto

III PARTE

APPLICAZIONI SU PROVINI SINTETICI

4.5 Analisi dei campioni dei provini pittorici

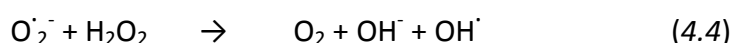
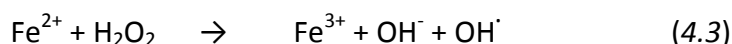
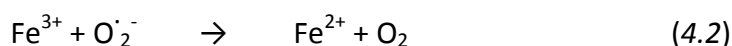
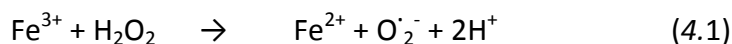
La procedura per la determinazione del collagene ottimizzata e presentata in modo completo nella *tabella 16* è stata testata sui provini pittorici preparati in laboratorio seguendo le ricette di Cennino Cennini e Luigi Tito. Lo scopo è valutare se la presenza di pigmenti o di altri leganti possono interferire nell'analisi. I pigmenti impiegati sono stati descritti nella parte sperimentale nella *sezione 3.5.1*.

Le prime prove sono state effettuate utilizzando 100 mg di campione per ottenere un segnale più intenso che permetta di valutare la presenza di eventuali interferenze dovute alla complessa stratigrafia delle stesure pittoriche e successivamente con 1 mg. Per tutti i campioni è stata seguita la procedura messa a punto nelle prove precedenti (*Tab. 16*). Data l'instabilità del prodotto di reazione, la soluzione è stata analizzata allo spettrofotometro immediatamente al termine dello sviluppo del cromoforo.

4.5.1 Campioni eseguiti in laboratorio imitando la ricetta della colla animale di Cennino Cennini

Le stesure pittoriche sono state eseguite mescolando la colla lapin con i pigmenti (ossido di zinco, ossido di ferro e verde di cromo). L'unico trattamento applicato al campione al termine dell'idrolisi è la neutralizzazione, la soluzione quindi non viene centrifugata. In *figura 35* sono presentati gli

spettri registrati per le soluzioni del cromoforo con i diversi pigmenti. Come si osserva dagli spettri in *figura 35a* in tutti e tre i casi il segnale del cromoforo è molto intenso e permette la caratterizzazione del collagene, poiché lo spettro ha la forma e gli elementi che permettono la sua identificazione. Inoltre la tinta porpora della soluzione, al termine dello sviluppo del cromoforo, permette di limitare l'analisi ad un semplice approccio visivo (*Fig. 36*). Il confronto degli spettri mostrati nella *figura 35a* indica che colla lapin mescolata con l'ossido di ferro presenta un'assorbanza più bassa rispetto agli altri pigmenti analizzati. L'abbassamento del segnale potrebbe essere dovuto allo svolgimento della *reazione di Haber-Weiss*, in cui l'acqua ossigenata reagisce con il radicale superossido; la reazione 4.4 è la reazione netta del processo. Quest'ultimo essendo termodinamicamente sfavorito deve svolgersi in presenza di catalizzatori come gli ioni ferro [51]. Lo ione superossido viene prodotto dalla reazione tra l'acqua ossigenata ed il Fe³⁺ (*reazione 4.1*). Nella reazione (4.2) il radicale superossido è ridotto ad ossigeno in presenza di Fe³⁺, con la conseguente formazione di Fe²⁺. Il Fe²⁺ reagisce quindi con il perossido di idrogeno, contribuendo alla sua decomposizione in radicale ed ione idrossilico. La presenza in eccesso dell'acqua ossigenata permette lo svolgimento sia della *reazione 4.1*, che della *reazione 4.3*.



Il suddetto ciclo di reazioni consuma quindi l'acqua ossigenata, sfavorendo l'ossidazione dell'idrossiprolina a pirrolo. Inoltre, la tinta della soluzione, al termine dello sviluppo del cromoforo, ha una lieve sfumatura arancione, anche dopo la centrifugazione e l'eliminazione del materiale presente in sospensione, probabilmente legata alla presenza di ioni Fe³⁺ in soluzione.

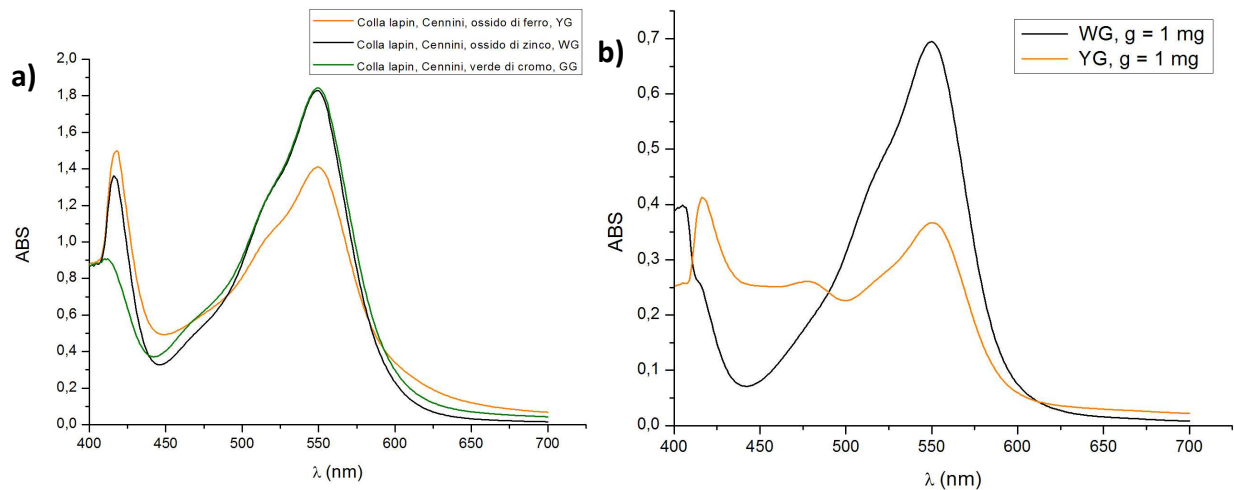


Figura 35. (a) Spettri UV-Vis dopo lo sviluppo del cromoforo partendo: da 100 mg di campione e (b) 1 mg di campione

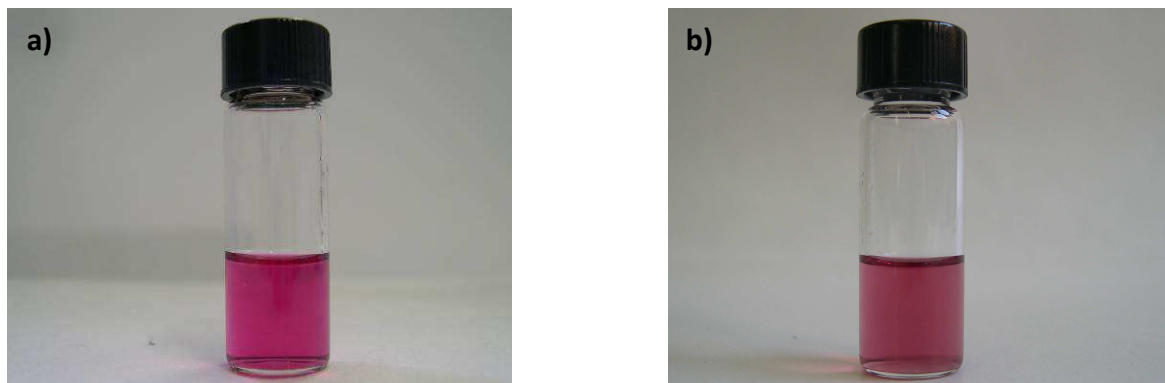


Figura 36. Soluzioni del cromoforo ottenuto idrolizzando 100mg dei campioni: (a) WG (bianco di zinco + colla lapin) e (b) YG (ossido di ferro + colla lapin).

Riducendo il campione da 100 mg ad 1 mg non si osservano rilevanti differenze qualitative negli spettri (Fig. 35b), i valori di assorbanza diminuiscono, ma la forma dello spettro permette comunque l'identificazione del collagene. In presenza di ossido di ferro la tinta delle soluzione tende, anche in questo caso, all'arancione (Fig. 37). Mentre in presenza di ossido di zinco non si osservano interferenze: il segnale è intenso ed il picco a circa 550 nm si sovrappone perfettamente. Inoltre la tinta della soluzione è porpora.

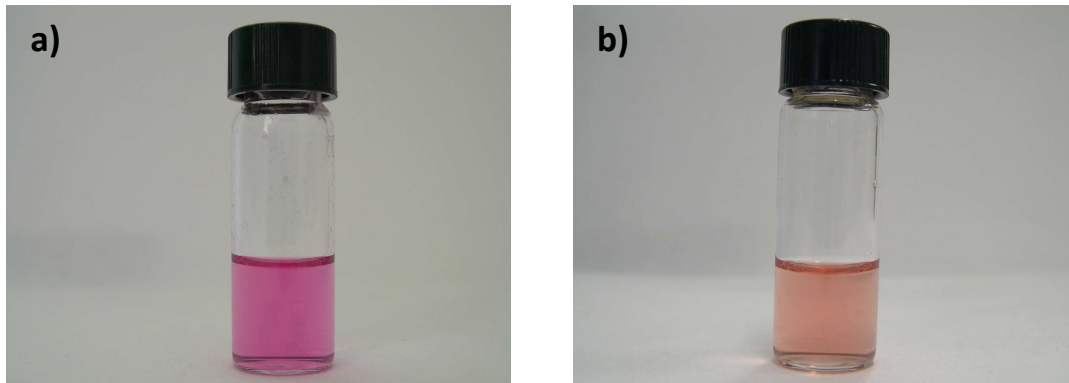


Figura 37. Soluzioni del cromoforo ottenuto idrolizzando 1 mg dei campioni: (a) WG (bianco di zinco + colla lapin) e (b) YG (ossido di ferro + colla lapin)

4.5.2 *Campioni realizzati in laboratorio seguendo la ricetta colla animale e farina di Luigi Tito*

Gli artisti molto spesso usavano una combinazione di leganti unendo così le proprietà chimico-fisiche di ciascuno. Per questo è necessario valutare se la mescolanza di leganti di diversa natura comporta interferenze oppure inibisce la determinazione del collagene. Luigi Tito propone una tempera mista di colla lapin e farina [43]. Il campione (1 mg) preparato in accordo con tale ricetta è stato trattato seguendo la procedura di idrolisi e di determinazione dell'idrossiprolina applicate fino ad ora per gli altri campioni (*vedi tabella 16*). Al termine dello sviluppo del cromoforo la soluzione è porpora (*vedi figura 38a*) e lo spettro (*fig.38b*) presenta tutti gli elementi caratteristici (λ_{max} , forma dello spettro, spalla a 520 nm) che permettono l'identificazione del collagene. Da questi risultati si conclude che la presenza di mescolanze di colle animale e di farina non interferisce nella determinazione del collagene.

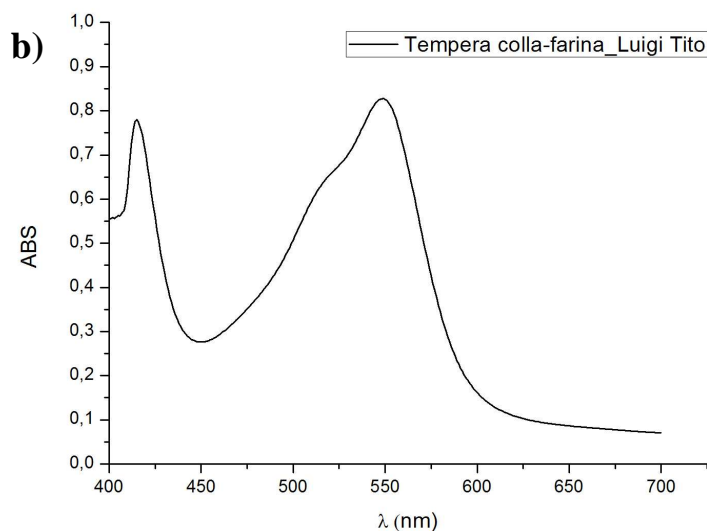


Figura 38. (a) Soluzione dopo lo sviluppo del cromoforo; (b) Spettro UV-Vis del campione *tempera colla-farina di Luigi Tito*

4.5.3 Campioni eseguiti in laboratorio conforme la ricetta tempera al rosso d'uovo di Cennino Cennini

La stesura pittorica con la tempera al rosso d'uovo è stata realizzata seguendo la ricetta di Cennino Cennini [2]. La realizzazione di questo campione ha lo scopo di valutare se altri leganti proteici possono portare allo sviluppo del cromoforo.

Il campione (100 mg) è stato trattato seguendo la procedura applicata agli altri campioni analizzati. Al termine dell'idrolisi e dopo la neutralizzazione è presente un precipitato marrone attribuibile alle umine, un composto che deriva dalla condensazione delle aldeidi con i gruppi amminici del triptofano (*Trp*) [12, 52]. Le aldeidi derivano dal trattamento con acido ad alte temperature dei carboidrati, i quali in queste condizioni producono la furfuraldeide¹⁰. Il collagene non contiene il triptofano il che giustifica perchè durante l'idrolisi del collagene non vengono prodotti le umine. La soluzione al termine dell'idrolisi è stata centrifugata e l'analisi effettuata solo sul surnatante, riducendo così possibili interferenze. Il campione dopo l'idrolisi e l'eliminazione dell'eccesso di acido viene trattato seguendo la procedura applicata anche per gli altri campioni (*Tab. 16*). Si osserva che la soluzione al termine dello sviluppo del cromoforo è arancione e lo spettro presenta un picco a circa 500 nm (linea continua *fig. 39*). Il picco a 420 nm, dovuto alla DMAB, ha valori di

¹⁰ *Furfuraldeide*, è un aldeide aromatica che deriva da alcuni prodotti agricoli come mais e grano.

assorbanza più alti rispetto alle prove precedenti, perché essa non ha reagito con l'idrossiprolina e quindi è presente in eccesso nella soluzione. Il risultato negativo è dovuto all'assenza dell'idrossiprolina nel tuorlo, confermando che la procedura di determinazione del collagene è selettiva nei confronti di questa proteina e che altri amminoacidi, nelle condizioni sperimentali applicate, non interferiscono nella caratterizzazione del collagene.

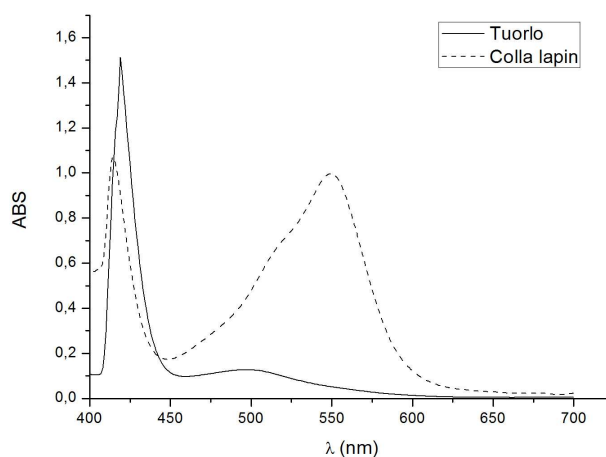


Figura 39. Spettro UV-Vis del campione del tuorlo (linea continua). e della colla animale (---).

IV PARTE

Analisi campioni reali

4.6 Analisi dei campioni provenienti dalle opere di Ippolito Caffi

Il metodo studiato e proposto in questo lavoro di tesi per la caratterizzazione delle colle animali viene infine applicata a campioni prelevati da opere d'arte di Ippolito Caffi (1809-1866). La procedura applicata per le analisi è quella descritta nella sezione precedente.

4.6.1 Analisi del dipinto Molo di Venezia proveniente da Villa Giacomelli (UD)

1 mg di campione è stato dapprima idrolizzato per 4 h in acido cloridrico 6 M a 120°C in forno e neutralizzato con un opportuno volume di idrossido di sodio 3,3 M. Al termine di questa fase nella

soluzione è presente un precipitato, ma non è stato effettuato alcun trattamento aggiuntivo ed il campione è stato tratto seguendo la procedura riassunta in *tabella 16*. Al termine dello sviluppo del cromoforo la soluzione è gialla. Gli elementi che normalmente permettono la determinazione della colla animale sono la tinta della soluzione e l'andamento dello spettro. In questo caso l'unico elemento che permette di non escludere la presenza della colla animale è la spalla a 550 nm. Il risultato ottenuto può essere legato alla mancata separazione del surnatante dal precipitato, alla presenza di Fe^{3+} , che come rilevato dai campioni sintetici può reagire con H_2O_2 oppure ad una bassa concentrazione dell'idrossiprolina per due ragioni: l'eventuale presenza di altri leganti (es. polisaccaridici) oppure per l'assorbimento del legante da parte del supporto. Quest'ultima ipotesi spiegherebbe la fragilità dello strato pittorico e la sua scarsa adesione alla tela. Basandosi anche sull'analisi visuale dell'opera d'arte la seconda ipotesi è ritenuta la più probabile. L'analisi è stata quindi ripetuta raddoppiando il tempo dell'idrolisi (da 4 h a 8 h) e centrifugando la soluzione dopo la neutralizzazione. La quantità di campione è stata mantenuta costante ad 1 mg. La soluzione al termine dello sviluppo del cromoforo è porpora, anche se il colore è poco saturo (*figura 40a*). L'analisi spettroscopica (*Fig. 40b e 40c, linea tratteggiata*) evidenzia lo spettro caratteristico del prodotto di reazione che identifica il collagene. Ciò conferma la presenza di colla animale nel campione pittorico esaminato.

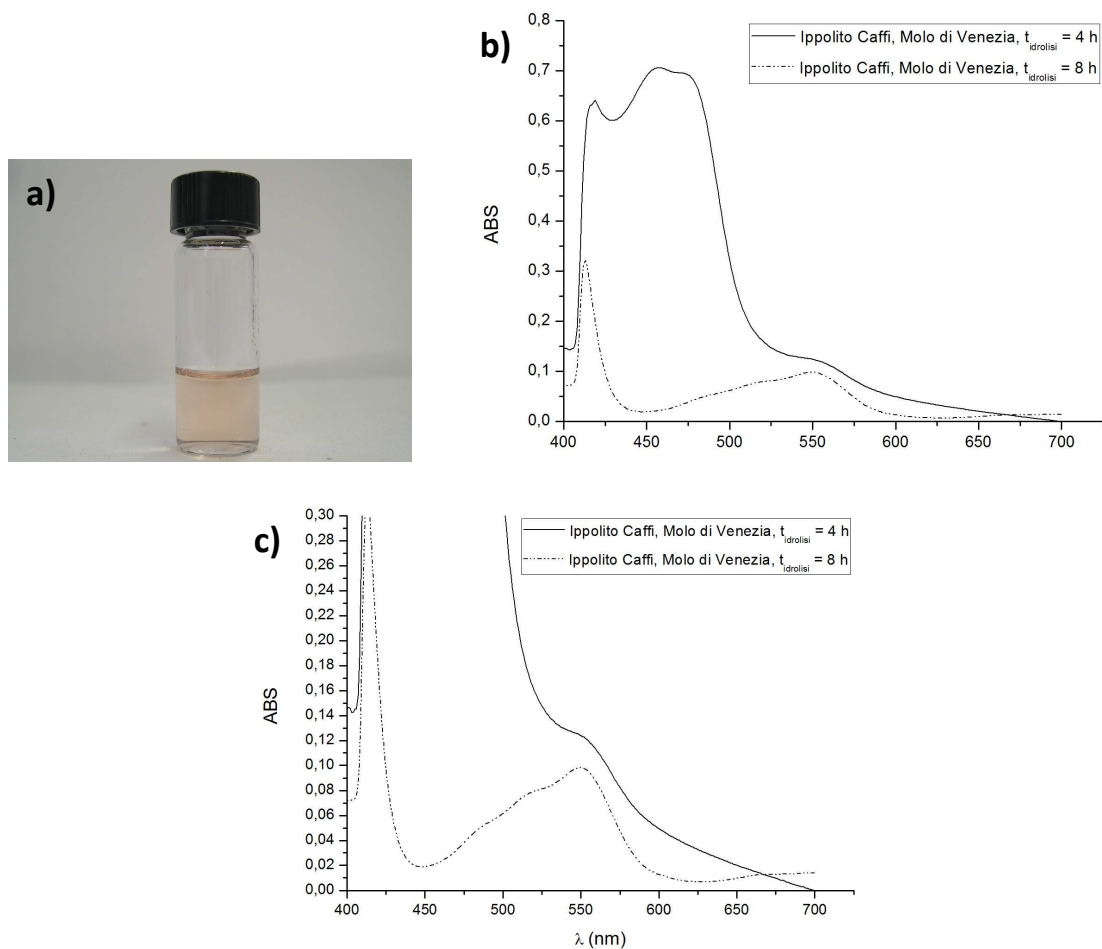


Figura 40. (a) Soluzione al termine dello sviluppo del cromoforo; (b) Spettri UV-Vis del campione prelevato dall'opera *Molo di Venezia*: dopo 4 h (linea continua) e 8 h di idrolisi (linea tratteggiata); (c) zoom sui picchi a 550 nm.

4.6.2 Analisi sul dipinto Foro Romano proveniente da Villa Giacomelli (UD)

Il campione (0.8 mg) è stato analizzato seguendo la stessa procedura applicata per *Molo di Venezia*, quindi l'idrolisi è durata 8 h e la soluzione, dopo l'eliminazione dell'eccesso di acido, è stata centrifugata. La tinta al termine dello sviluppo del cromoforo è rosa (*figura 41a*). Lo spettro (*figura 41b*) presenta un massimo di assorbanza a λ_{\max} 550 nm che identifica la presenza del collagene.

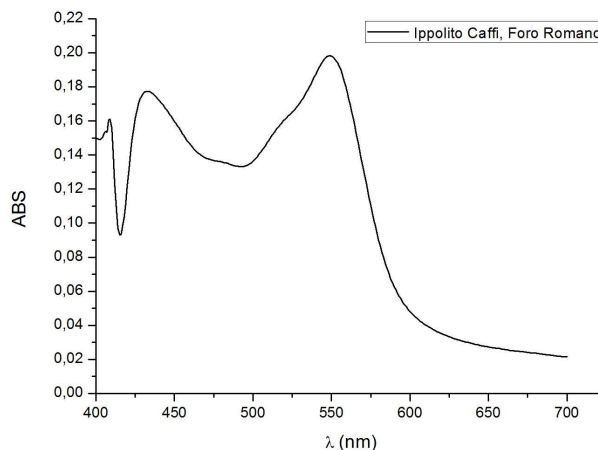


Figura 41. Soluzione al termine dello sviluppo del cromoforo (a sinistra) e spettro UV-Vis (a destra) del campione prelevato dall'opera *Foro Romano*.

Entrambe le analisi indicano l'uso di colla animale come legante per realizzare sia il dipinto Molo di Venezia, che Foro romano. Va notato che il basso valore di assorbanza a 550 nm riscontrato nel campione prelevato dal Molo di Venezia richiederebbe l'esecuzione di una nuovo prelievo di campione in altra parte del quadro per confermare definitivamente il risultato.

4.6.3 *Analisi del dipinto Veduta del Pantheon proveniente dalla Galleria Internazionale d'Arte Moderna di Ca'Pesaro (VE)*

L'applicazione a quest'opera della procedura applicata agli altri dipinti, da risultati inequivocabilmente negativi. Infatti, dopo l'esecuzione della procedura analitica, la soluzione rimane gialla e lo spettro non presenta nessun segnale. Va notato che l'aspetto dell'opera è quello caratteristico di un dipinto realizzato con legante oleoso. Infatti la superficie risulta lucida ed i colori sono saturi. I risultati analitici confermano l'assenza di leganti a base di colla animale.

5. CONCLUSIONI

Le colle di natura proteica (collagene, uovo, caseina ecc) sono usate nel campo dei beni culturali come leganti pittorici o come adesivi. La loro caratterizzazione è importante non solo per riconoscere la tecnica artistica, ma anche per la conservazione dell'opera. A questo proposito, in questo lavoro di tesi è stato proposto un metodo semplice, soprattutto dal punto di vista della strumentazione e dell'interpretazione dei dati, per l'identificazione del collagene, sfruttando una reazione colorimetrica specifica tra l'idrossiprolina presente nel collagene ed il reagente di Ehrlich. Questo risulta possibile perché il collagene è l'unica proteina animale a contenere l'idrossiprolina, garantendo così la specificità della reazione, il cui prodotto finale è un cromoforo caratterizzato dalla tinta porpora (fucsia); inoltre la sua saturazione fornisce un'indicazione semi-quantitativa del collagene. Oltre alla tinta, che permette un'analisi qualitativa di tipo visivo, la determinazione della proteina può essere condotta per via spettrofotometrica. Infatti, lo spettro nel UV-Vis presenta una forma tipica caratterizzata da un picco di assorbimento che varia tra 548 e 555 nm, e da una spalla a circa 520 nm. Si fa notare che la reazione con il reagente di Ehrlich avviene con l'idrossiprolina ossidata; l'ossidazione può avvenire tramite l'uso di acqua ossigenata, come proposto in questo lavoro, oppure con l'uso della cloroammina-T, la quale fornisce risultati più accurati, ma con un maggior rischio per la salute dell'operatore.

La stratigrafia di un dipinto è in genere molto complessa in quanto costituita da numerosi strati pittorici caratterizzati da miscele di sostanze organiche, tra cui i leganti pittorici, e sostanze inorganiche, come i pigmenti; entrambi possono interferire nella determinazione del collagene. Per capire l'entità dell'interferenza sono state condotte analisi su provini eseguiti in laboratorio seguendo le ricette di Cennino Cennini e Luigi Tito e successivamente su campioni reali prelevati da opere d'arte. Dai risultati ottenuti si può concludere che la presenza di altre sostanze influenzano il risultato, ma non impediscono la determinazione del collagene. Ad esempio gli ossidi di ferro provocano un abbassamento del segnale di assorbimento della luce, dovuta alla prevedibile reazione diretta tra ioni ferro e perossido di idrogeno, producendo una soluzione di colore tendente all'arancione. La presenza di altri leganti (es. colla di farina) provoca un abbassamento del segnale, ma la tinta sviluppata dalla soluzione rimane quella del collagene.

L'influenza di tali fattori è maggiormente evidente lavorando con basse quantità di campione (1 mg – 0.8 mg), come accade per i campioni nel campo dei beni culturali. Per questi motivi è necessario adottare procedure che prendano degli accorgimenti che permettano di ridurre le interferenze ed aumentare il segnale; come ad esempio aumentare il tempo di idrolisi; centrifugare la soluzione dopo la neutralizzazione per evitare interferenze da parte del precipitato che si può formare durante l'idrolisi.

L'applicazione del reattivo di Ehrlich ad altri leganti proteici, come l'uovo, non porta alla formazione del prodotto caratteristico, sia per quanto riguarda il colore che lo spettro di assorbimento nel visibile. Tale risultato conferma che gli altri amminoacidi, nelle condizioni sperimentali applicate, non interferiscono nella determinazione del collagene, confermando la buona specificità del reattivo di Ehrlich per questo scopo. Oltre ai leganti proteici diversi dal collagene, sono stati analizzati anche leganti oleosi. In questo caso non si ottiene nessun segnale spettroscopico né colorimetrico, in quanto la soluzione rimane gialla.

Lo studio dei campioni prelevati da opere di Ippolito Caffi ha permesso di valutare l'applicabilità del metodo su campioni di interesse storico-artistico. Infatti mantenendo gli accorgimenti precedentemente descritti, è possibile individuare il collagene anche quando ha subito un processo di invecchiamento. I risultati ottenuti indicano che le opere di Ippolito Caffi conservate a Villa Giacomelli (UD) sono state realizzate utilizzando come legante il collagene. Al contrario, l'opera *Veduta del Pantheon*, proveniente dalla collezione della *Galleria Internazionale di Arte Moderna a Venezia*, non rivela la presenza di colla animale. Va notato che l'osservazione macroscopica di tale dipinto suggerisce l'uso di una tecnica ad olio più che a tempera.

Si può quindi concludere che la procedura messa a punto nel presente lavoro di tesi permette una relativamente semplice individuazione della presenza del collagene anche analizzando piccole quantità di campione, dell'ordine del milligrammo. Il metodo può sfruttare sia un semplice approccio colorimetrico, che un'analisi di tipo strumentale mediante la spettrofotometria UV-Vis.

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Matteini M., Moles A.**, *La chimica nel restauro – I materiali dell'arte pittorica*, Nardini Editore, Firenze, 2003
2. Di **Cennino Cennini**, *Trattato della pittura messo in luce per la prima volta con annotazioni dal cavaliere Giuseppe Tambroni*, Co' Torchj di Paolo Salviucci, Roma, 1821
3. **L. Campanella, A. Casoli, M. P. Colombini, R. M. Bettolo, M. Matteini, L. M. Migneco, A. Montenero, L. Nodari, C. Piccoli, M. Plossi Zappalà, G. Portalone, U. Russo, M. P- Sammartino**, *Chimica per l'arte*, Ed. Zanichelli, Bologna, 2007
4. **S. Dallogenville, M. Koperska, N. Garnier, G. Reille-Taillefert, C. Rolando, C. Tokarski**, *Anal. Chem.*, **83**, (2011), 9431-3437
5. **D. Bomford, A. Roy**, *National Gallery Technical Bulletin*, **10**, (1986), 42-57
6. **A. Karpowicz**, *Stud. Conserv.*, **26**, (1981), 153-160
7. **N. Siliprandi, G. Tettamanti**, *Biochimica medica – Strutturale, metabolica e funzionale*, Ed. Piccin, 1998
8. **A. L. Lehninger**, *Biochemistry*, Worth Publishers Inc., New York, 1975
9. **K. Gelse, E. Poschl, T. Aigner**, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, (2003), 1531-1546
10. **S. Zevgiti, C. Sakarellos, M. Sakarellos-Daitsiotis, E. Ioakimoglou, E. Panou-Pomonis**, *J. Pept. Sci.*, **13**, (2007), 121-127
11. **K. Ramadasan, A. N. Radhakrishnan**, Biochemistry of the hydroxyprolines, *Advances in Enzymology and Related Area of Molecular Biology*, Vol. 37, 1973
12. **J. S. Mills, R. White**, *The organic chemistry of museum objects*, Butterworths, Oxford, 1994
13. **K. I. Kivirikko, R. Myllyla**, *Meth. Enzymol.*, **82**, (1982), 245-304
14. **A. Ito, H. Uoji, Y. Mori**, *Anal. Biochem.*, **151**, (1985), 510
15. **O. Dahl, K.-A. Persson**, *Acta Chem Scand*, **17**, (1963), 2499-2503

16. **J. A. Belloni, M. S. Di Nezio, M. F. Pistonesi, M. E. Centurión**, *Talanta*, **89**, (2012), 526-530
17. **T. J. Collings, F. J. Young**, *Stud. Conserv.*, **21**, (1976), 79-84
18. **O. A. Adegoke, C. E. Nwoke**, *J. Iran. Chem. Soc.*, **5**, (2008), 763-769
19. **A. D. Mitchell, I. E. Taylor**, *Analyst*, **95**, (1970), 1003-1011
20. **M.P. Colombini, R. Fuoco, A. Giacomelli, B. Muscatello**, *Stud. Conserv.*, **43**, (1998), 33-41
21. **R. L. Hill**, Hydrolysis of protein, *Advances in Protein Chemistry*, **20**, (1965), 37-107
22. **G. R. Tristram, R H. Hill**, The amino acid composition of some purified proteins, *Adv. Protein Chem.*, **18**, (1963), 227-318
23. **R. C. Warner**, *J. Biol. Chem.*, **142**, (1942), 741-756
24. **K. Lang**, *Z. Physiol. Chem.*, **219**, (1933), 148
25. **E. Waldschmidt-Leitz, S. Akabori**, *Z. Physiol. Chem.*, **224**, (1934), 187
26. **R. E. Neuman, M. A. Logan**, *J. Biol. Chem.*, **186**, (1950), 299-306
27. **H. Stegemann**, *Z. Physiol. Chem.*, **311**, (1958), 595
28. **O. Dahl, K.-A. Persson**, *Acta Chem Scand*, **17**, (1963), 2499-2503
29. **B. W. Grunbaum, D. Glick**, *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, (1956), 260-267
30. **D. S. Miyada, A. L. Tappel**, *Anal. Chem.*, **28**, (1956), 909-910
31. **J. Blomfield, J. F. Farrar**, *Anal. Chem.*, **36**, (1964), 950-952
32. **F. Hutter**, E. J. Singer, *Anal. Chem.*, **32**, (1960), 556-558
33. **N. Yu. Ignat'eva, N. A. Danilov, S. V. Averkiev, M. V. Obrezkova, V. V. Lunin, E. N. Sobol**, *J. Anal. Chem.*, **62**, (2007), 51-57
34. **A. N. Radhakrishnan, A. Meister**, *J. Biol. Chem.*, **226**, (1957), 559-571
35. **J. S. Esteve-Romero, Ll. Monferrer Pons, M. C. Garcia-Alvarez-Coque, G. Ramis-Ramos**, *Anal. Lett.*, **27**, (1994), 1557-1567
36. **G. Dorfles, S. Buganza, J. Stoppa**, *Arti visive – dal quattrocento all'impressionismo, protagonisti e movimenti*, Ed. Atlas, Bergamo, 2005
37. Catalogo della mostra *Caffi. Luci del Mediterraneo*, Belluno, Palazzo Crepadona, Roma, Museo di Roma – Palazzo Braschi, Skira editore, Milano, 2005

38. **G. Perusini**, Le tecniche pittoriche e la formazione artistica a metà Ottocento nelle Accademie di Venezia e Vienna, pg. 11-39, tratto da *Relazioni 16 – Le tecniche pittoriche dell'Ottocento in Friuli e a Trieste, La formazione artistica tra Venezia e Vienna*, a cura di r. Fabiani e G. Perusini, Forum Ed., Udine, 2010
39. **C. Spetsieri Beschi**, *Il pittore bellunese: Ippolito Caffi in Grecia (1843-1844)*, Istituto bellunese di ricerche sociali e culturali, Belluno, 2005
40. <http://www.archiviodellacomunicazione.it/Sicap/opac.aspx?WEB=MuseiVE>
41. **J. F. Woessner, Jr.**, *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, (1961), 440-447
42. **L. Yung-Kai, K. Che-Yung**, *Food Chem.*, **119**, (2010), 1271-1277
43. **F. Bottari**, *Sviluppo di un biosensore elettrochimico per l'identificazione delle tempere a base d'uovo*, tesi di laurea magistrale in Scienze Chimiche per la Conservazione e il Restauro, Università Ca'Foscari, A.A. 2010/2011
44. **J. Romero-Pastor, N. Navas, S. Kuckova, A. Rodríguez-Navarro, C. Cardell**, *J. Mass. Spectrom.*, **47**, 2012, 322
45. Catalogo della mostra tenuta a Venezia, *Ippolito Caffi, 1809-1866: raccolta di 154 dipinti di proprietà del Museo d'arte moderna Ca'Pesaro, Venezia*, a cura di Guido Perrocco, Marsilio Ed., Venezia, 1979
46. **O. A. Adegoke, O. E. Umoh**, *Acta Pharm.*, **59**, (2009), 407-419
47. **O. A. Adegoke, M. O. Quadri**, *Arabian Journal of Chemistry*, (2012), in press
48. **I. Bergnam, R. Loxley**, *Anal. Chem.*, **35**, (1963), 1961-1965
49. **M. P. Colombini, F. Modugno, A. Giacomelli**, *J. Chromatogr. A*, **846**, (1999), 101
50. **I. Bergman, R. Loxely**, *Clin. Chim. Acta*, **27**, (1970), 347-349
51. **Kehrer J. P.**, *Toxicology*, **149**, (2000), 43-50
52. **A. Gortner, M. J. Blish**, *J. Amer. Chem. Soc.*, **37**, (1915), 1630-1636

7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Paolo Ugo, per avermi permesso ancora una volta di far parte del Laboratorio di Sensori Elettrochimici. Un particolare grazie va alla prof.ssa Ligia M. Moretto per avermi seguita con pazienza e dedizione, insegnandomi un metodo di lavoro e supportandomi nei momenti difficili di questo lavoro.

Inoltre risulta doveroso ringraziare la prof.ssa Teresa Perusini, per avermi fornito i campioni analizzati in questo lavoro di tesi, dandomi la possibilità di studiare un grande artista come Ippolito Caffi.

Infine ringrazio Sabrina Fabris, per avermi eseguito le centrifughe fornendo un contributo importante per la riuscita di questa tesi.

Importanti sono anche le persone a me care, che hanno contribuito non solo alla realizzazione della tesi, ma anche al sostegno quotidiano.

Mamma Maristella, papà Flaviano, Anna e Matilde a cui dedico questo lavoro, perché è anche merito loro se sono qui oggi. Grazie per avermi sempre dato fiducia e sostegno. Marco, il cui amore è la mia forza. Paolo, Laura, Anna e Francesco che considero come una seconda famiglia. Marzia e Veronica per aver reso questi anni speciali. Tutto il laboratorio LSE, Angela, Chiara, Fabio, Michael, Morena, Linda, Ligia, per avermi sopportata e supportata durante il periodo di tesi, in particolar modo nell'ultimo mese.

Grazie di cuore a tutti!