

Attività ADAMO T2.3 – Tecniche di microscopia avanzata e nanoingegneria (G. De Bellis) [RM1, G. De Bellis]

Caratterizzazione manufatti di rilevanza storica.

I. Caratterizzazione del processo di sterilizzazione mediante radiazione X su manufatti in pergamena

Di derivazione dalla pelle animale, quindi composta nella quasi totalità di collagene, la pergamena è stata utilizzata come principale supporto scrittoria dal Tardo Antico al Medioevo producendo manufatti dal grande valore storico-artistico. Essendo cruciale la comprensione dei processi di deterioramento, così come la caratterizzazione dello stato di conservazione, al fine di preservare questi manufatti, lo studio si prefigge la caratterizzazione del danno indotto da raggi X (**ENEA Frascati , Laboratorio di Acceleratori di Particelle per Applicazioni Medicali - FSN TECFIS APAM, Dr. Monia Vadrucci**) al fine di valutare la loro applicabilità come trattamento di disinfezione per supporti scrittori membranacei interessati da bio-deterioramento. A questo scopo si è valutata una serie di campioni di pergamena moderna¹ a diverse dosi di irraggiamento al fine di caratterizzare eventuali effetti della radiazione sulla stabilità strutturale della molecola di collagene (0, 50, 200, 350², 500, 700, 1000, 2000, 3000 Gy).

1.1 Caratterizzazione AFM della pergamena

Le analisi sono state condotte (**Dipartimento di Ingegneria Astronautica Elettrica ed Energetica dell'Università Sapienza di Roma, Prof. Giovanni De Bellis**) con un Microscopio a Forza Atomica (AFM) *Bruker, Dimension Icon*, assistito da un controller *Nanoscope V*, e con un *Bruker Multimode AFM*, equipaggiato con un controller *Nanoscope III* utilizzando per entrambi la modalità operativa cosiddetta “tapping”. Gli strumenti sono stati equipaggiati con punte *Bruker, RTESP 300* con frequenza di risonanza di circa 300 kHz. Le acquisizioni sono state fatte su aree che vanno da 1 µm a 10 µm con una velocità di scansione di circa 0,5/1 Hz sul lato cosiddetto “carne” del foglio membranaceo. La possibilità di effettuare analisi su campioni senza la necessità di un particolare trattamento (come avviene ad esempio nella microscopia elettronica) rendono la tecnica particolarmente utile nel campo della diagnostica per i beni culturali.

¹ La pergamena è stata prodotta a mano da pelle di pecora e secondo procedure che riprendono quelle tradizionali presso National Research and Development Institute for Textiles and Leather, Bucharest, (Prof.ssa Lucretia Miu).

² È stato dimostrato che il trattamento di inibizione del bio-deterioramento dei supporti pergamenei è efficace a dosi di radiazione X assorbita a 350 Gy.

La caratterizzazione del danno indotto dai fasci della sorgente ENEA-REX è stato comunque eseguito nel range 0 Gy – 3000 Gy per effettuare uno studio completo degli effetti osservati nonostante la sterilizzazione completa (M. Vadrucci, F. Borgognoni, C. Cicero, N. Perini, L. Migliore, F. Mercuri, N. Orazi, A. Rubecchini, Parchments processing and analysis: Ionizing radiation treatment by the REX source and multidisciplinary approach characterization, *Applied Radiation and Isotopes* 149 (2019), 159–164).

Nello specifico della caratterizzazione della pergamena, attraverso l'utilizzo di questa tecnica è possibile condurre una valutazione sull'integrità del networking fibrillare e sulle variazioni indotte sulla sua struttura ordinata, tipica della molecola di collagene, in funzione della dose di irraggiamento.

Le immagini topografiche registrate tramite AFM mostrano le condizioni di conservazione della struttura fibrillare del collagene dopo essere stata trattata con i raggi X. In particolare risulta visibile come la tipica periodicità anulare lungo la fibrilla, il cosiddetto periodo D , viene mantenuta fino a dosi di irraggiamento di 350 Gy (Fig. 1c e 1d). Alla dose di 500 Gy cominciano ad essere visibili fibrille danneggiate che presentano il tipico "srotolamento" della struttura ordinata, danneggiamento preliminare alla gelatinizzazione della molecola (come indicato dalle frecce in Fig. 1e e f). Crescendo nelle dosi di irraggiamento la struttura fibrillare perde la sua periodicità regolare (tendendo a valori D non omogenei), le fibrille appaiono frammentate e cominciano ad apparire aree gelatinizzate dalla tipica geometria amorfa. Dal confronto presentato tra le immagini della morfologia del campione non trattato (Fig. 1a e b) rispetto ai campioni ad alte dosi di irraggiamento (Fig. 2), è possibile vedere come le topografie ottenute tramite AFM mettano in evidenza la parziale perdita della periodicità nella struttura fibrillare del collagene a seguito del trattamento. Mentre nel campione non trattato o nei campioni irraggiati a basse dosi sono visibili e ben definite le fibrille allineate in un fascio, a crescenti dosi di irraggiamento cominciano ad apparire fibrille danneggiate, irregolari e frammentate fino al danneggiamento totale nella struttura fibrillare alle massime dosi di irraggiamento dove, seppure ancora in parte visibile, questa risulta disomogenea e parzialmente gelatinizzata con la perdita graduale della sua tipica periodicità.

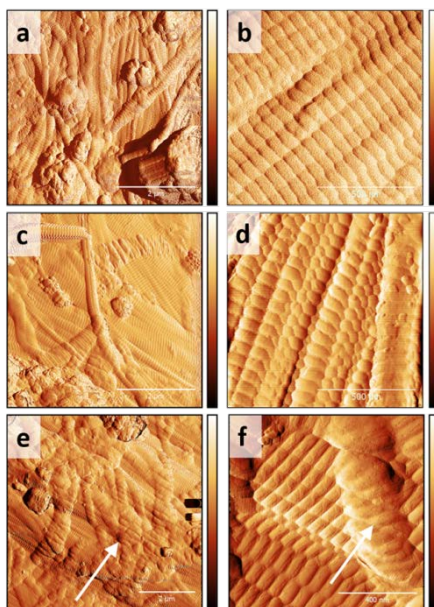


Fig. 1: confronto fra campioni di pergamena trattati con differenti dosi di raggi X: non trattato (a e b), 350 Gy (c e d), 500 Gy (e e f). La regolare periodicità delle fibrille è mantenuta e solamente nel campione trattato con la dose di 500 Gy è possibile notare alcune fibrille con un iniziale effetto di "srotolamento".

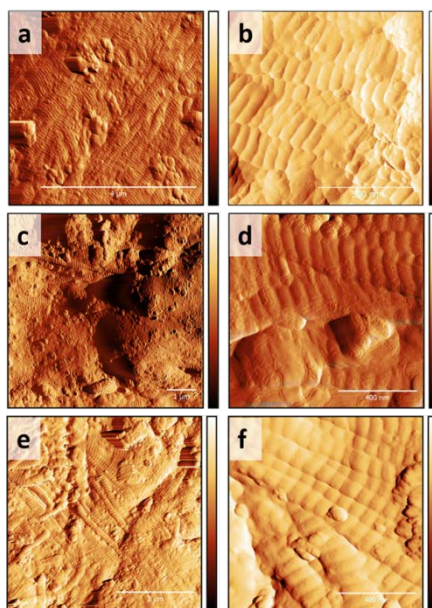


Fig. 2: confronto fra campioni di pergamena trattati con differenti dosi di raggi X: 700 Gy (a e b), 2000 Gy (c e d), 3000 Gy (e e f). La regolare periodicità delle fibrille risulta fortemente alterata ed ampie zone di strutture amorfe e gelatinizzate sono riconoscibili sulla superficie dei campioni trattati con alte dosi di irraggiamento.

Una informazione aggiuntiva fornita dalla tecnica restituisce un'ulteriore conferma del deterioramento indotto sulla molecola dalla radiazione X. È infatti facilmente riscontrabile ad alte dosi di irraggiamento un generale “appiattimento” superficiale riconoscibile nel confronto fra le immagini 3D del campione non trattato e di quello irraggiato alla dose massima (Fig.3).

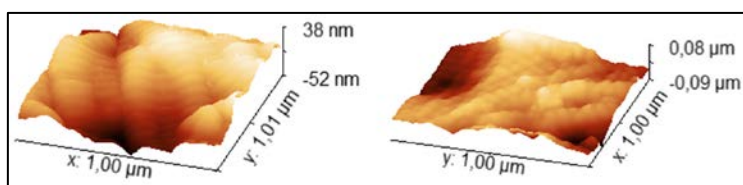


Fig. 3: topografia 3D del campione di pergamena non trattato (sinistra) e del campione irraggiato con una dose di 3000 Gy (destra).

Una ulteriore caratterizzazione del deterioramento della molecola del collagene è in corso, al fine di determinare quantitativamente la variazione del cosiddetto *D-spacing* in funzione della dose di irraggiamento. Nel collagene di Tipo I, maggiormente presente nella pergamena, mediante i legami covalenti tra le regioni del telopeptide di una molecola centrale e la regione elicoidale di quelle adiacenti viene formata una serie di molecole, disposte, l'una rispetto all'altra, per un quarto della loro lunghezza con un periodo tipico di 67 nm chiamato "D". Dalla valutazione dell'integrità delle fibrille del collagene così come dalle variazioni del loro *D-spacing*, è stato possibile ottenere una caratterizzazione preliminare del deterioramento provocato dalla radiazione X impiegata nel trattamento e dei suoi effetti sulla struttura fibrillare della molecola di collagene.

Ulteriori informazioni a conferma delle evidenze dedotte dalle immagini topografiche, possono essere tratte dallo studio della texture del campione lungo le fibrille. Come è possibile vedere nei profili riportati in Fig.

4, a basse dosi di irraggiamento (Fig. 4 a, b e c) si ritrova il tipico profilo fibrillare caratterizzato da un D-spacing ben definito e riproducibile (≈ 65 nm) con valori prossimi a quello del collagene non trattato.

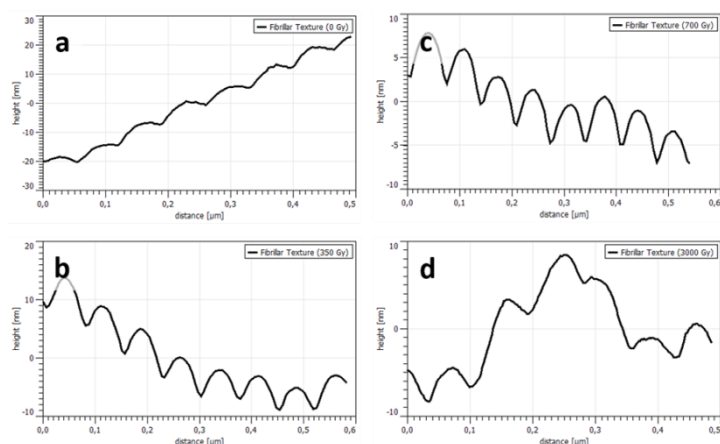


Fig. 4: confronto fra i profili estratti per fibrille di diversi campioni di pergamena irraggiata: a) non trattato, b) 350 Gy, c) 700 Gy, d) 3000 Gy. È possibile riconoscere come la periodicità ripetitiva e ben definita della struttura fibrillare ed il loro caratteristico D-spacing perde la sua tipica periodicità e omogeneità nelle texture estratte per le fibrille di campioni ad alte dosi di irraggiamento.

Il mantenimento di queste caratteristiche fino a determinate dosi di irraggiamento denota la mancanza di effetti della radiazione sulla molecola confermando la possibilità di utilizzare in sicurezza il trattamento con raggi X fino almeno alle dosi investigate e qui riportate.

Nel caso della pergamena trattata con alte dosi di raggi X invece (Fig. 4d), la disomogeneità della superficie indotta dal trattamento rende difficoltoso perfino individuare e quindi estrarre il profilo della texture della singola fibrilla. Quando questo è possibile, appare evidente come il D-spacing sia fortemente disomogeneo rispetto ai valori registrati nel collagene non deteriorato ovvero rispetto a quelli riportati per il campione irraggiato a 350 Gy. Il profilo della fibrilla ha perso la sua regolare periodicità rivelando la denaturazione indotta nella molecola dall'esposizione alla radiazione.

1.II Caratterizzazione SEM della pergamena

L'analisi microscopica è stata eseguita utilizzando un Microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (*FE-SEM*), modello *Zeiss Auriga*, disponibile presso il laboratorio di Nanoscienze e Nanotecnologie della Sapienza (*SNN-Lab*) su campioni di pergamena rivestiti con un coating di Cr di 30 nm. Le immagini presentate sono state acquisite con una tensione di accelerazione di 3 keV, utilizzando ingrandimenti da 1 kX a 50 kX, sul campione non trattato e sui campioni della stessa pergamena trattati con diversi irraggiamenti (100 Gy, 200 Gy, 350 Gy, 700 Gy, 1000 Gy e 3000 Gy). Lo scopo principale della caratterizzazione è stato la valutazione delle differenze nella morfologia superficiale, nella struttura ordinata della rete fibrillare e nella struttura periodica della singola fibrilla, eventualmente indotte dal trattamento di irraggiamento.

Le immagini SEM ottenute sul campione non trattato (lato carne) a basso ingrandimento (Fig. 5a) mostrano la tipica rete fibrillare ordinata caratteristica di una pergamena in buono stato di conservazione. Le fibrille,

raggruppate in fasci, non mostrano alcuna discontinuità o aree gelatinizzate ed è chiaramente visibile, a grandi ingrandimenti, la tipica struttura periodica della fibrilla (Fig. 5b).

Una struttura fibrillare ordinata e ben conservata è chiaramente riconoscibile nel campione irraggiato a 350 Gy (Fig. 5c e d) e ancora visibile nel campione trattato a 700 Gy. In quest'ultimo, a basso ingrandimento la superficie mostra un networking fibrillare del tutto simile a quello del campione non trattato (Fig. 5e). Ad alto ingrandimento è ancora apprezzabile una buona struttura fibrillare anche se il fascio risulta di dimensioni ridotte e generalmente è possibile riscontrare una aumentata disomogeneità nella periodicità tipica delle singole fibrille (Fig. 5f).

Le immagini SEM ottenute a basso ingrandimento sul campione irraggiato con una dose di 3000 Gy (lato carne) mostrano una struttura superficiale simile alle precedenti non rivelando evidenti effetti del trattamento (Fig. 5g). Ad alto ingrandimento invece, risulta chiaramente visibile come la struttura fibrillare ordinata tipica di questi campioni sia fortemente danneggiata (Fig. 5h). Le fibrille mostrano dimensioni alterate, frammentazione, biforcazioni, aree di srotolamento parziale e gelatinizzazione, caratteristiche disomogeneità che rivelano gli effetti del deterioramento indotto dalla radiazione.

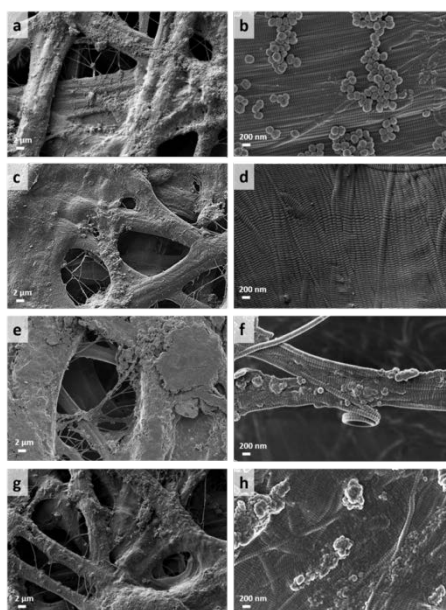


Fig. 5: micrografie SEM di campioni di pergamena trattati con differenti dosi di raggi X: non trattato (a e b), 500 Gy (c e d), 700 Gy (e e f), 3000 Gy (g e h). La regolare periodicità delle fibrille chiaramente visibile nel campione non trattato e nel campione trattato con basse dosi di irraggiamento (350 Gy) risulta invece fortemente alterata ad alte dosi. In particolare nelle immagini del campione trattato con dose massima sono riconoscibili ampie zone di strutture amorfe e gelatinizzate ed un generale deterioramento della struttura periodica e ordinata delle fibrille.

➤ *Disseminazione:*

- convegno *Technart 2019* (Bruges, 7-10 Maggio 2019), organizzato da *University of Antwerp*, con una presentazione poster dal titolo “Assessing the irradiation-driven restoration of biodeteriorated parchments through AFM and SEM”

- convegno *Nanoinnovation 2019* (Roma, 11-14 Giugno 2019), organizzato da *Sapienza Università di Roma*, con una presentazione poster dal titolo “Nanoscale evaluation of the effect of X-rays irradiation on parchment artefacts through AFM and SEM”.

➤ *Sviluppi*

I risultati si inseriscono nel contesto più ampio di un lavoro già avviato³ in precedenza e saranno oggetto di una prossima pubblicazione, attualmente in lavorazione, basata sul confronto dei risultati di microscopia con quelli ottenuti tramite tecniche di caratterizzazione delle temperatura di denaturazione del collagene (*Light Transmission Analysis*, in collaborazione con **l'Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Dipartimento di Ingegneria Industriale, Prof. F. Mercuri**) e tecniche più tradizionalmente impiegate nella caratterizzazione del livello di idrolisi/gelatinizzazione del collagene (*spettroscopia FTIR-ATR*, in collaborazione con il **Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Prof. C. Mazzuca**).

³ M. Vadrucchi, F. Borgognoni, C. Cicero, N. Perini, L. Migliore, F. Mercuri, N. Orazi, A. Rubechini, Parchment processing and analysis: Ionizing radiation treatment by the REX source and multidisciplinary approach characterization, *Applied Radiation and Isotopes* 149 (2019), 159–164.

II. Caratterizzazione del processo di sterilizzazione mediante radiazione X su cuoi storici (provenienza Palazzo Chigi, Ariccia)

Relativamente alla caratterizzazioni di campioni provenienti dai siti facenti parte il circuito relativo al progetto ADAMO, sono state avviate le analisi di alcuni campioni di cuoio da parati provenienti dalle stanze di **Palazzo Chigi di Ariccia**.

Il cuoio (come per la pergamena, paragrafo I) è un derivato dalla pelle animale e quindi maggiormente composto da collagene di Tipo I. Esso (differentemente dalla pergamena) si ottiene tramite un processo di “concia” della pelle animale tale da renderla imputrescibile e che funge da “stabilizzatore” dei processi di deterioramento della molecola di collagene.

Nello specifico i cuoi provenienti da palazzo Chigi sono stati utilizzati nel XVII secolo come parati da rivestimento per le mura delle stanze del palazzo e per questo erano riccamente decorati con impressioni ad oro e argento e dipinti.

È stato condotto uno studio per caratterizzare il danno indotto da raggi X (**ENEA Frascati , Laboratorio di Acceleratori di Particelle per Applicazioni Medicali - FSN TECFIS APAM, Dr. Monia Vadrucci**) sulla stabilità strutturale della molecola di collagene al fine di determinare la loro eventuale applicabilità come trattamento di disinfezione nei casi di manufatti affetti da bio-deterioramento.

Caratterizzazione microscopica del cuoio

L'analisi microscopica è stata eseguita (**Dipartimento di Ingegneria Astronautica Elettrica ed Energetica dell'Università Sapienza di Roma, Prof. Giovanni De Bellis**) utilizzando un Microscopio elettronico a scansione a effetto campo (*FE-SEM*) *Zeiss Auriga* sui campioni di cuoio rivestiti con un coating di Cr di 30 nm.

Le immagini presentate sono state acquisite con una tensione di accelerazione di 3 keV, utilizzando ingrandimenti da 1 kX a 5 kX, sul campione non trattato e sullo stesso cuoio dopo trattamento con diverse dosi di irraggiamento (750 Gy, 1000 Gy e 5000 Gy). Lo scopo principale della caratterizzazione è stato la valutazione delle differenze nella morfologia superficiale o nella struttura ordinata della rete fibrillare, eventualmente indotte dal trattamento di irraggiamento.

Dal momento che il lato pelo dei campioni è abbondantemente dipinto, dorato e impresso, per questi campioni si è scelto di studiarne il solo lato carne che lascia esposte le fibre di collagene.

Le micrografie SEM del campione non irraggiato (Figura 6a e b) mostrano una rete di fibre intatte del collagene. Nonostante si tratti di un cuoio storico il campione oggetto di analisi si presenta in discrete condizioni di conservazione. Sulla superficie dello stesso possono essere riconosciuti fasci di fibre lunghi e ordinati che rivelano, dopo tutto, una buona condizione di conservazione del manufatto. Confrontando le immagini ottenute dal campione non trattato con quelle registrate sul campione di pelle irraggiato con una

dose di 750 Gy (Fig. 6c) e con una dose di 1000 Gy (Fig. 6e e f) è possibile notare che, la tipica struttura ordinata della morfologia superficiale viene mantenuta anche nei campioni irraggiati. Sono visibili infatti solamente delle lievi differenze nel campione trattato con una dose di 1000 Gy dove si riconoscono alcune fibre con una struttura disordinata effetto di un parziale srotolamento della molecola, fenomeno relativo ad un iniziale processo di gelatinizzazione ma che facilmente riconducibile alla disomogeneità di partenza dello stesso cuoio (dovuta sia al fatto che si tratta di un campione storico originale per manifattura, sia allo stato di conservazione).

Il campione irraggiato alla dose massima di 5000 Gy mostra invece una morfologia superficiale completamente diversa rispetto a quella del campione non irraggiato. L'immagine registrata a basso ingrandimento (Fig. 6g) mostra la totale assenza della tipica rete fibrillare e la presenza di aree di gelatinizzazione con il tipico aspetto di fibre combinate/amalgamate. A ingrandimento maggiore (Figura 7h), l'effetto dell'irraggiamento è chiaramente visibile nell'aspetto dei fasci rimanenti in cui la struttura fibrillare ordinata è fortemente danneggiata, la dimensione del fascio risulta ridotta e le fibre rimanenti appaiono sfilacciate e frammentate.

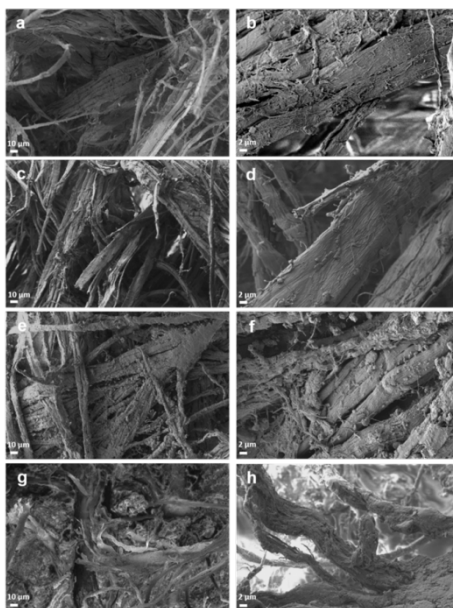


Fig. 6: micrografie SEM del campione non irraggiato (a e ingrandimento b), del cuoio irraggiato con una dose di 750 Gy (c e d), con una dose di 1000 Gy (e ed f) e con la dose massima di 5000 Gy (g e h). Differenze appena apprezzabili possono essere osservate nella morfologia superficiale del campione irraggiato con dosi fino a 1000 Gy rispetto a quello non irraggiato. Una importante variazione è invece visibile nelle condizioni di conservazione delle fibre del campione irraggiato con 5000 Gy, dove la superficie mostra ampie aree di materiale gelatinizzato (particolarmente visibili in g) e i fasci di fibre appaiono ridotti nelle loro dimensioni, sfilacciati e frammentati (h).