

Rapporto di attività progetto ADAMO

Diagnostica remota mediante fluorescenza indotta da laser su porzioni dei muri absidali di San Nicola in Carcere

Francesco Colao¹, Roberta Fantoni¹, Martina Romani²

¹ ENEA, FSN-TECFIS-DIM, CR Frascati

² INFN, LNF Frascati

Sommario

Introduzione	2
Diagnostica mediante fluorescenza LIF con eccitazione UV	2
Identificazione dei materiali mediante spettri LIF.....	3
Identificazione dei materiali mediante spettri di riflettanza.....	3
Apparato sperimentale.....	4
Misure effettuate	4
Coro absidale	6
Immagine di riflettanza.....	6
Immagine di fluorescenza.....	7
Analisi delle immagini acquisite con TG-LIF	8
Analisi mediante elaborazione k-means.....	12
Parete absidale e semicupola	15
Immagine di riflettanza.....	16
Analisi delle immagini di riflettanza	17
Analisi della fluorescenza	19
Analisi delle immagini acquisite con TG-LIF	23
Conclusioni	26
Risultati delle analisi sul biodegrado	26
Risultati delle analisi sulla semicupola	26
Referenze.....	27

Introduzione

La basilica di San Nicola in carcere è un luogo di culto cattolico del centro storico di Roma, situato nel territorio del rione Sant'Angelo. Dedicata a Nicola di Mira, è una delle basiliche minori di Roma (fonte wikipedia).

Nel catino absidale è presente l'affresco "Allegoria" del pittore Vincenzo Pasqualoni che vi dipinse i ritratti di Pio IX, Vespignani, Tenerani e Minardi, attivo a Roma sotto il pontificato di Pio IX.

La parte inferiore dell'abside sono presenti affreschi parietali.

L'intervento ENEA con il prototipo LIFART si è concentrato su alcune superfici affrescate situate nell'abside della basilica, rispettivamente il coro, le pareti e la semicupola. Le porzioni sottoposte a diagnosi sono state considerate rappresentative al fine di dimostrare le capacità diagnostiche della tecnica a fluorescenza.

1. Coro - caratterizzazione del deterioramento di natura biologica e non;
2. Parteti - documentativo: interventi di conservazione precedenti e dello stato di conservazione attuale
3. Semicupola - determinazione della tavolozza e dei materiali usati nella realizzazione.



Figura 1 – Porzioni dell'abside con evidenziazione delle aree sottoposte a misura diagnostica

Diagnostica mediante fluorescenza LIF con eccitazione UV

La tecnologia diagnostica utilizzata è basata sulla misura delle caratteristiche spettrali e temporali della autofluorescenza indotta da laser che consente la determinazione sia dei materiali usati che la detezione precoce di deterioramento per cause biologiche e non biologiche.

Identificazione dei materiali mediante spettri LIF

L'identificazione dei materiali mediante l'analisi degli spettri LIF è fatta prevalentemente mediante confronto con spettri di fluorescenza acquisiti su campioni di riferimento. È accettato dalla comunità scientifica che la LIF abbia un buon potenziale diagnostico e di discriminazione per i trattamenti superficiali di conservazione (consolidanti acrilici / vinilici), identificazione di sostanze protein-like (attacco biologico), e solo parzialmente per l'identificazione di alcuni pigmenti (p.es. ZnO). Gli spettri di fluorescenza appaiono come emissioni spettroscopiche che hanno in genere notevole intensità (quantum yield > 1-5%), ma sono caratterizzati da emissioni a larga banda e con notevoli sovrapposizioni spettrali. La misura della semplice emissione fluorescente risulta dunque essere una tecnica con elevata sensibilità e bassa specificità, così che frequentemente non consente la univoca identificazione dei materiali utilizzati. Per aumentare la specificità dell'analisi LIF è comune abbinare all'analisi di risoluzione spettrale anche l'analisi del decadimento temporale. In questo modo è spesso possibile incrementare in modo significativo la specificità della tecnica.

Effetti sugli spettri LIF dell'attacco biologico

In prima approssimazione il biodegrado appare come effetto additivo, con la presenza di bande UV nella regione 330-360nm dovute alle emissioni di sostanze protein-like (Colao 2005).

Effetti sugli spettri LIF del trattamento con biocida

Un possibile meccanismo di azione degli agenti biocida è la formazione di composti metallo-organici tra le sostanze a base proteica ed il biocida medesimo. Poiché è noto il quenching di fluorescenza dei composti metallo-organici, si conclude che gli effetti del biocida sugli spettri LIF si manifestano principalmente come soppressione della banda emissione a 330nm – 360 nm (Waller 2019).

Effetti sugli spettri LIF delle efflorescenze

Le efflorescenze corrispondono a migrazioni verso la superficie di sali dall'interno della muratura e dei substrati preparatori. Ciò avviene con la perdita di H₂O da composti idrati e la formazione di sali, p.es nitrato di potassio (anche noto come salnitro) o carbonati di calcio.

Gli effetti della comparsa di efflorescenze sugli spettri LIF si manifestano principalmente come incremento della banda con emissione a 400nm – 600 nm

Identificazione dei materiali mediante spettri di riflettanza

Ai fini della identificazione dei pigmenti una seconda tecnica utilizzata si basa sulla misura della riflettanza. Tale tecnica trova fondamento nel fatto che molti pigmenti storici (p.es. le terre) hanno una caratteristica forma a S con una zona di transizione avente larghezza di qualche decina di nm. Ovviamente l'identificazione dei pigmenti è tanto più efficace quanto più si estende l'intervallo di osservazione spettrale includendo bande e transizioni sia nel visibile che nel NIR. Queste richieste trovano ampia soddisfazione nelle performances del sistema imaging dell'ENEA che ha una copertura spettrale che si estende fino a circa 900nm e risoluzione migliore di 5nm.

A titolo di esempio si ricorda che nella regione blu, le caratteristiche spettrali caratterizzanti sono ampie e variano solo lentamente con la lunghezza d'onda. L'azzurrite e il blu oltremare sono i pigmenti blu storici più utilizzati e hanno entrambi valori di riflettanza a circa 460 nm sono discriminati dal confronto della riflettanza nell'infrarosso. Lo smaltino è caratterizzato dalla una banda di assorbimento tra il blu e le regioni dell'infrarosso e dalla alta riflettanza nell'infrarosso. Tipicamente il suo massimo di riflessione a 415 nm,

distinguono lo smaltino da altri pigmenti di colore simile che hanno non trascurabili riflettanze anche nell'infrarosso (p.es. blu oltremare).

Nella regione verde si identificano la malachite e il verde cromo che hanno riflettanza massima a circa 500 nm.

Apparato sperimentale

Per la basilica di San Nicola in Carcere è stato utilizzato un sistema per la misura della fluorescenza indotta da laser capace di effettuare analisi imaging remote. Il sistema LIF (Laser Induced Fluorescence Spectroscopy) a scansione utilizzato presso La Basilica di San Nicola in Carcere, (vedi Figura 2), è uno strumento portatile sviluppato e brevettato presso i laboratori ENEA di Frascati. La principale capacità del sensore consiste nel raccogliere immagini iperspettrali di fluorescenza scansionando aree di grandi dimensioni, affreschi, volte affrescate, etc. Nello specifico, un fascio laser in forma di lama di luce, scansiona la superficie di interesse inducendo l'emissione fluorescente dello strato pittorico che è caratteristica dei materiali che lo costituiscono. L'emissione è raccolta da un rivelatore di tipo imaging ed analizzata spettralmente, consentendo la caratterizzazione dei materiali analizzati. Cambiando il set up del dispositivo, il sistema può acquisire immagini di fluorescenza risolte temporalmente (tecnica di time gated) od alternativamente di riflettanza.

Lo strumento utilizzato implementa la tecnica LIF eseguendo scansioni veloci, in modo non invasivo, remoto (distanze fino a 25 m), ed è caratterizzato da una elevata sensibilità e selettività per molte classi di materiali.

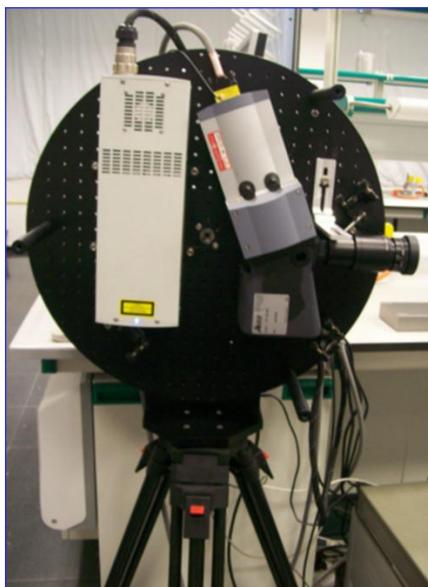


Figura 2. Sistema LIF scanning a scansione di linea (C.R. ENEA Frascati)

Misure effettuate

Per la basilica di San Nicola in Carcere è stato utilizzato il sistema LIFART, capace di effettuare analisi imaging remote basate sia sulla tecnica di misura della fluorescenza indotta da laser, che di riflettanza. Sono state sottoposte ad indagine diverse porzioni dell'abside; su ciascuna porzione, il sensore è stato operato nelle modalità:

- RILF riflettanza con illuminante standard;

- LIF fluorescenza indotta da laser con eccitazione UV a 266 nm;
- TGLIF time gated con risoluzione temporale di 5 ns.

Il sensore è stato posto a distanze tra 5 m e 12 m dalle superfici da analizzare ed ha operato in modo assolutamente non distruttivo; la risoluzione spettrale è di 3nm nell'intervallo tra 250 nm e 900 nm; la risoluzione spaziale varia da 0.002 m a 0.015 m a seconda delle impostazioni effettuate.

La Tabella I, riassume le condizioni sperimentali per ciascuna acquisizione eseguita.

Tabella I – Misure eseguite presso il sito di SiNicola in carcere

Nome file	Area	Dist.	Passi vert.	Passi orizz.	Linee verti.	Strip	Risol. Verti.	Risol. Orizz.	Gain MCP	ICCD temp	Mode	Delay	#	Trigger	Exposure
		[m]	[k#]	[#]	[#]	[#]	[mm]	[mm]		[C]		[ns]			[ms]
SCAN1	CORO	6	100	40	300	3	8	2	220	-20	LIF	-	3.8	FL/QS int	1000
SCAN1VIS	CORO	6	1000	40	75	3	32	2	220	-20	RIFL	-	22	OFF	100
SCAN2VIS	PARETE	8	60	38	75	3	26	3	220	-20	RIFL	-	11	OFF	100
SCAN2A	PARETE	8	60	38	300	3	6	3	220	-20	LIF	-	3.8	FL/QS int	1000
SCAN3VIS	SEMICUP.	11	40	0	100	1	18	4	220	-20	RIFL	-	22	OFF	100
SCAN4	SEMICUP.	11	40	0	600	1	3	4	220	-20	LIF	-	3.8	FL/QS int	1000
SCAN4-D170G10	SEMICUP.	11	40	0	300	1	6	4	220	-20	TG	10	3.8	QS ext	2000
SCAN4-D180G10	SEMICUP.	11	40	0	300	1	6	4	220	-30	TG	20	3.8	QS ext	2000
SCAN4-D190G10	SEMICUP.	11	400	0	300	1	6	4	220	-30	TG	30	3.8	QS ext	2000
SCAN5-D160nsG10ns	PARETE	8	60	38	100	3	19	3	220	-30	TG	10	3.8	QS ext	2000
SCAN5A-D160nsG10ns	PARETE	8	60	38	100	3	19	3	220	-30	TG	10	3.8	QS ext	2000
SCAN5-D170nsG10ns	PARETE	8	60	38	100	3	19	3	220	-30	TG	20	3.8	QS ext	2000
SCAN6-D142nsG10nsS10	CORO	6	40000	0	50	1	19	2	220	-30	TG	20	3.8	QS ext	4000

Coro absidale

Nel coro absidale sono presenti molteplici problematiche, le più evidenti riguardano la presenza di ampie zone soggette a deterioramento per attacco biologico (muffe nerastre), efflorescenze saline (colore tendente al lilla/arancio), incoerenza della pittura con distacchi e depigmentazione.

In questo settore sono state effettuate scansioni con l'apparato LIFART lungo tre strisce verticali affiancate evidenziate in figura 3 con aree rettangolari delimitate dal bordo rosso in modalità RILF e LIF; una ulteriore scansione in modalità LIF e TG-LIF (ma non in RIFL) è delimitata dal bordo giallo; si nota che la metà inferiore di quest'ultima area è trattata con biocida durante il restauro (ultimo trattamento 16/04/2019).

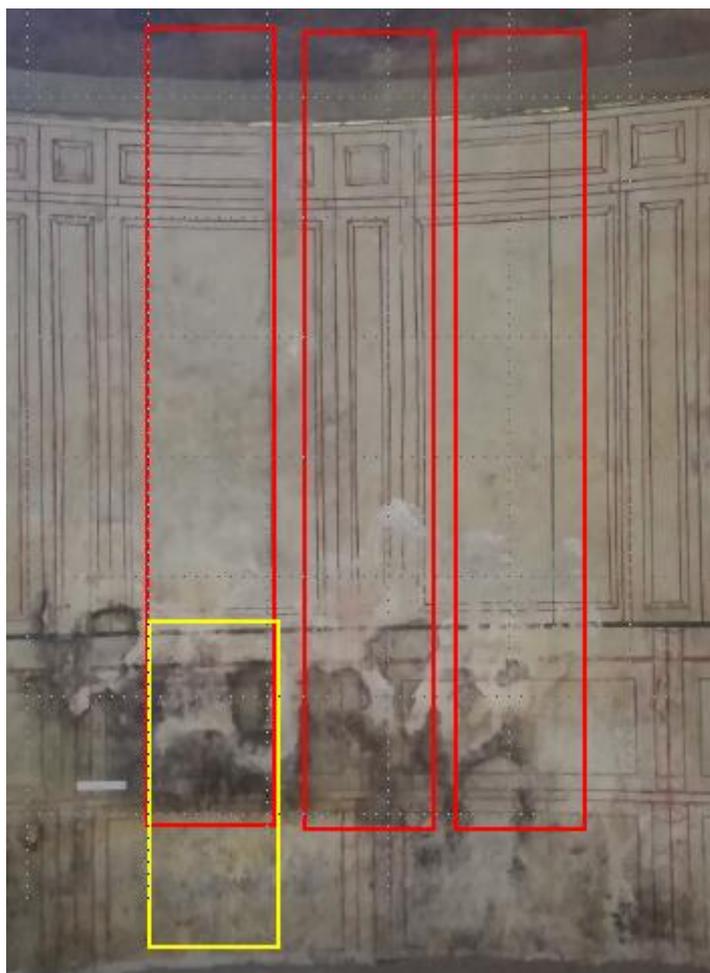


Figura 3 - Particolare delle porzioni scansionate nel coro

Immagine di riflettanza

La riflettanza sul coro dell'abside è stata acquisita con integrazione di 300ms e illuminante alogena 500W ad una distanza di circa 5m. Le immagini su tre porzioni non contigue dell'affresco sono riportate nella Figura 4; queste sono ottenute utilizzando le intensità di emissioni a 600, 500 e 400nm per i canali RGB. La risoluzione spaziale in queste immagini è notevolmente degradata: in considerazione della notevole uniformità del soggetto è tuttavia possibile discriminare varie condizioni del deterioramento della parete. In particolare si notano delle striature verticali, che corrispondono alla delineazione su parte di un probabile coro ligneo fatta con pigmento rosso. È anche evidente la distinzione tra parte superiore, meno soggetta a deterioramento e parte inferiore su cui è documentata sia efflorescenza salina, che attacco biologico.



Figura 4 – Immagine di riflettanza sul coro

Immagine di fluorescenza

Sulla medesima area sopra descritta è stata fatta la scansione in acquisita La fluorescenza anche in fluorescenza con integrazione di 1000ms ed eccitazione a 266nm con densità di energia pari a circa 5uJ/cm². Le immagini sulle porzioni di parete sono riportate nella figura sottostante in falsi colori ottenuti utilizzando le intensità di emissione a 560, 420e 330nm rispettivamente per i canali RBG.

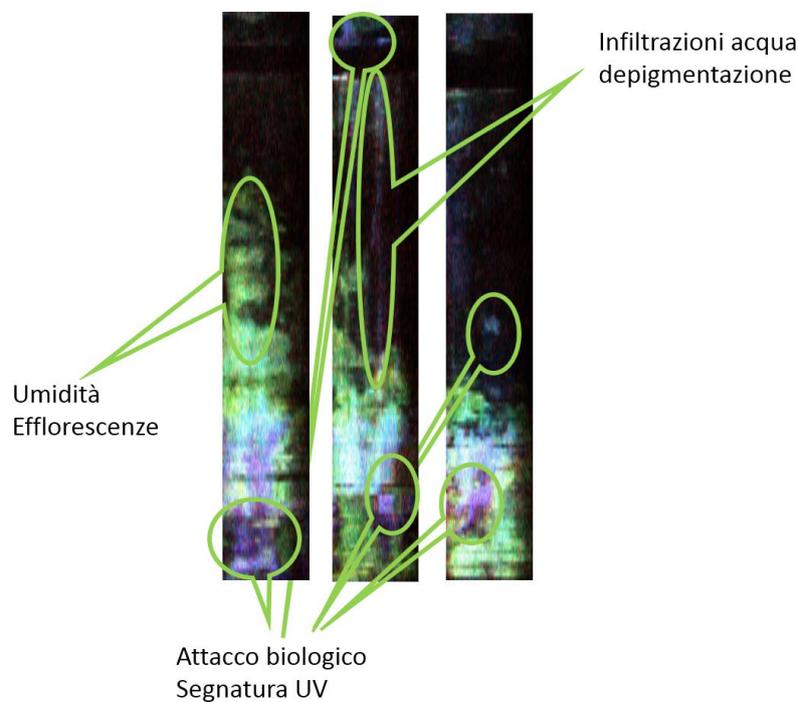


Figura 5 – Immagine di fluorescenza sul coro (SCAN1)

La particolare scelta fatta per i canali RGB mostra zone con colorazioni che vanno dal violaceo al bianco al verdastro. Le risultanze spettrali ottenute sono state confrontate con campioni di riferimento e ciò ha consentito di individuare alcune tipologie differenti di deterioramento

- biodegrado
- umidità
- efflorescenza
- depigmentazione

Umidità, depigmentazione ed efflorescenze appaiono come effetto sottrattivo degli strati superficiali, facendo apparire più evidenti la banda tra 400 e 550nm attribuiti al substrato (plaster/calcite), vedi figura 5.

Analisi delle immagini acquisite con TG-LIF

Nella parte inferiore del coro è stato effettuato un trattamento con agente biocida preventol applicato dalla ditta Euresarte in data 15/03/2019 e successivamente in data 15/04/2019, questa area è stata scansionata in modalità LIF e TG-LIF con scopo documentativo; il dettaglio della area scansionata e le relative immagini sono mostrate in Figura 6.

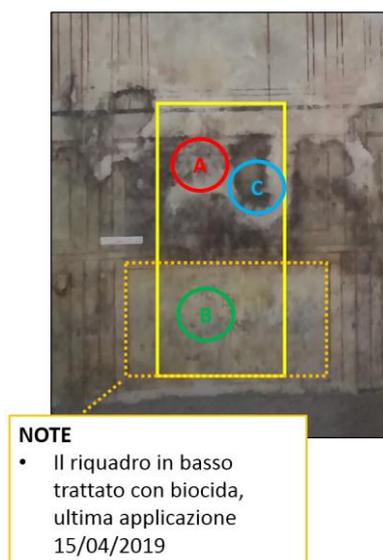


Figura 6 – Area scansionata con tecnica TG-LIF sulla parte in basso a sinistra del coro e definizione delle aree con grande e piccolo attacco biologico A), B) e C).

Al fine di caratterizzare sia l'attacco biologico che l'effetto del trattamento con biocida state individuate alcune aree caratteristiche della scansione in oggetto, come riportato in Tabella II.

Tabella II

Area	Caratteristica
A	Attacco biologico senza patina superficiale
B	Trattamento con biocida
C	Attacco biologico con patina superficiale

L'analisi dei dati è stata effettuata sia con la rappresentazione in falsi colori usando le bande di emissione prominenti, che con l'analisi alle componenti principali (PCA).

La varianza spiegata dalle componenti della PCA è mostrata in Figura 5A; si osserva che le prime quattro componenti spiegano oltre il 90% della varianza e questo suggerisce che, da un punto di vista statistico, il contenuto spettrale degli spettri LIF abbia il contributo preminente di non più di quattro componenti indipendenti.

L'analisi MCR (Multi Curve Resolution analysis) consente di recuperare i contributi reali appartenenti alle componenti spettrali della miscela attraverso una risoluzione matematica dei dati. L'obiettivo della tecnica MCR consiste nel trovare e applicare vincoli appropriati per ridurre ed eliminare ambiguità, al fine di ottenere soluzioni uniche. L'analisi MCR è chiaramente più vantaggiosa dell'PCA, in quanto le soluzioni ottenute dall'MCR hanno un significato fisico diretto e descrivono la vera natura dei contributi dei componenti, senza la necessità di ulteriori sforzi di interpretazione (Romani 2014).

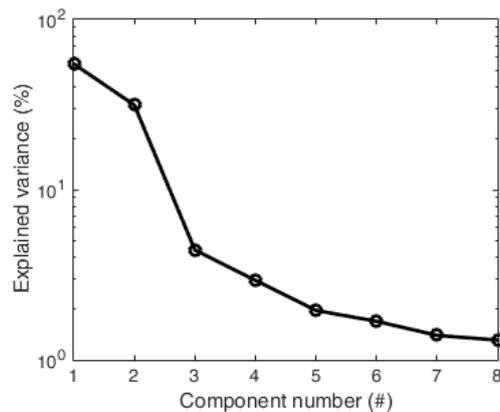


Figura 7 – Varianza spiegata dalle componenti PCA

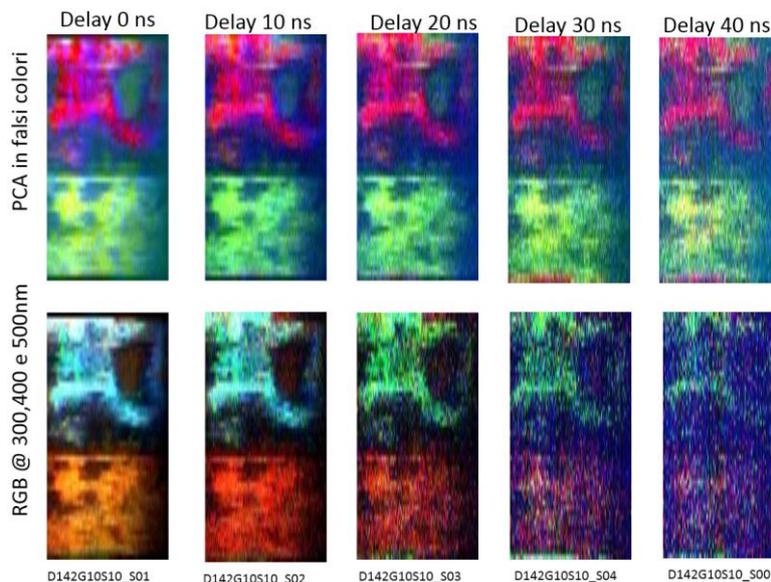


Figura 8 – Immagine di fluorescenza delayed sulla parte in basso a sinistra del coro (SCAN6); rappresentazione delle prime tre componenti PCA (in alto) e RGB sui canali 400 nm, 500 nm e 600nm (in basso) per ciascun gate temporale tra 0 ns e 40 ns

Le immagini in alto della Figura 8, riportano la rappresentazione in falsi colori delle prime tre componenti principali per ciascuna delle finestre di osservazione tra 0 e 40 ns, nella parte bassa sono invece rappresentate immagini RGB in falsi colori ottenuti dalle intensità delle bande di fluorescenza a 300, 400 e 500nm.

La Figura 9 mostra gli spettri rappresentativi ottenuti dalla media spaziale di 4 x 5 pixel nelle aree A) e B), e la stima della costante di decadimento. Consistentemente con quanto ottenuto dalla decomposizione PCA, si osserva l'esistenza di alcune bande prominenti in particolare a 330nm 360nm e a 420nm e 470nm. Questo risultato è consistente con l'analisi PCA, le cui prime componenti spiegano rispettivamente il 55%, 31%, il 4% il 3% e < 1% della varianza totale spiegata.

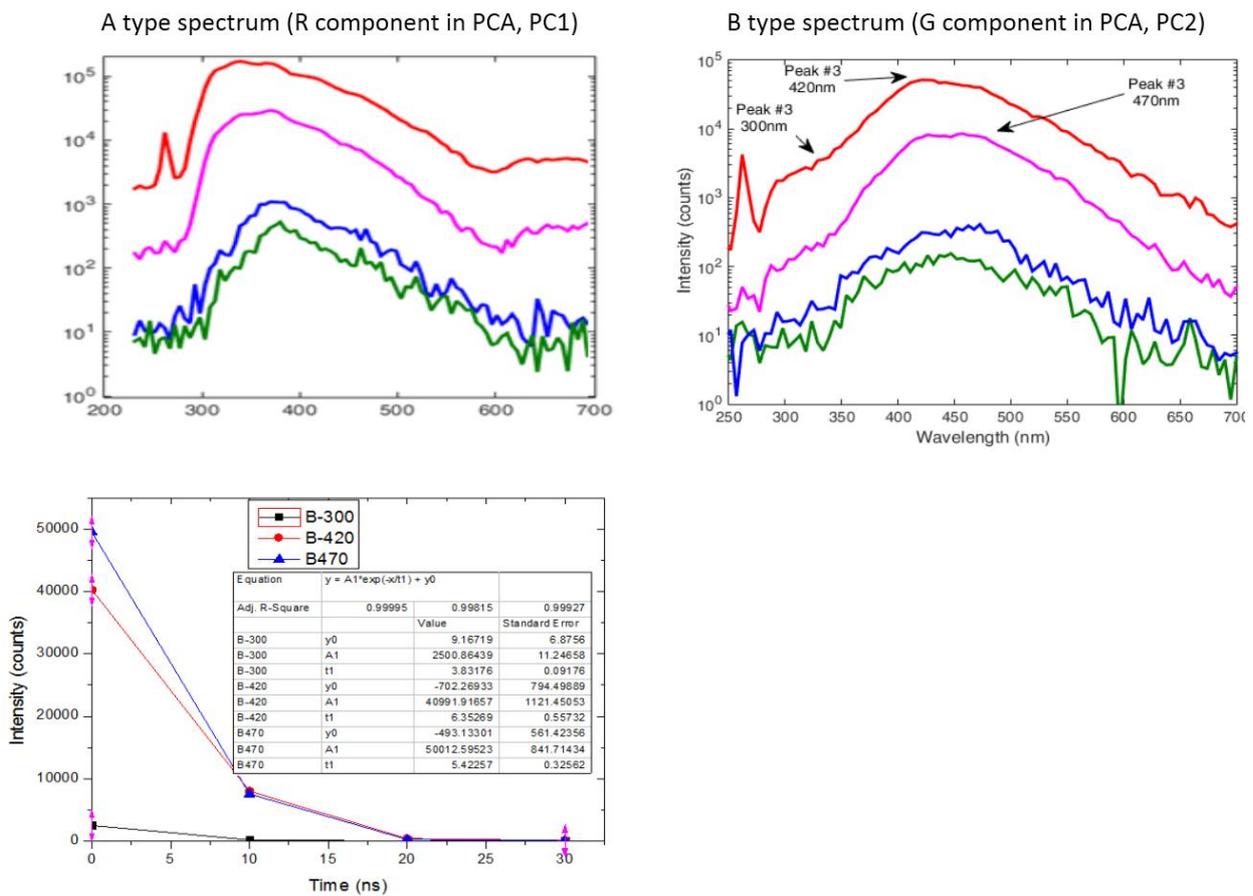


Figura 9 – Spettri della scansione TG-LIF nelle aree A) e B).

L'assegnazione delle bande è stata fatta mediante il confronto con dati noti di letteratura, combinando la posizione spettrale dei picchi prominenti e le costanti di decadimento spettrale. In particolare si riporta in Figura 10 lo spettro e il decadimento temporale del un campione di calcite (substrato) usato per il confronto. Per l'assegnazione delle bande di emissione fluorescente delle sostanze proteiche si è fatto ricorso a spettri misurati su riferimenti di laboratorio e sugli spettri LIF sperimentali mostrati in Figura 11.

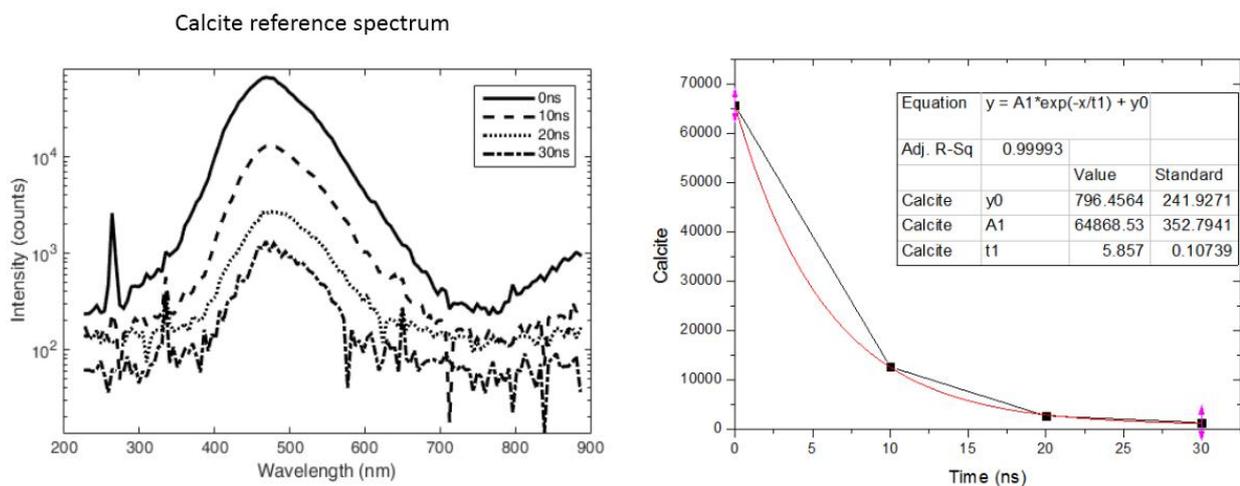


Figura 10 – Riferimento di laboratorio di calcite con tecnica TG-LIF (a destra) e analisi dei tempi di decadimento.

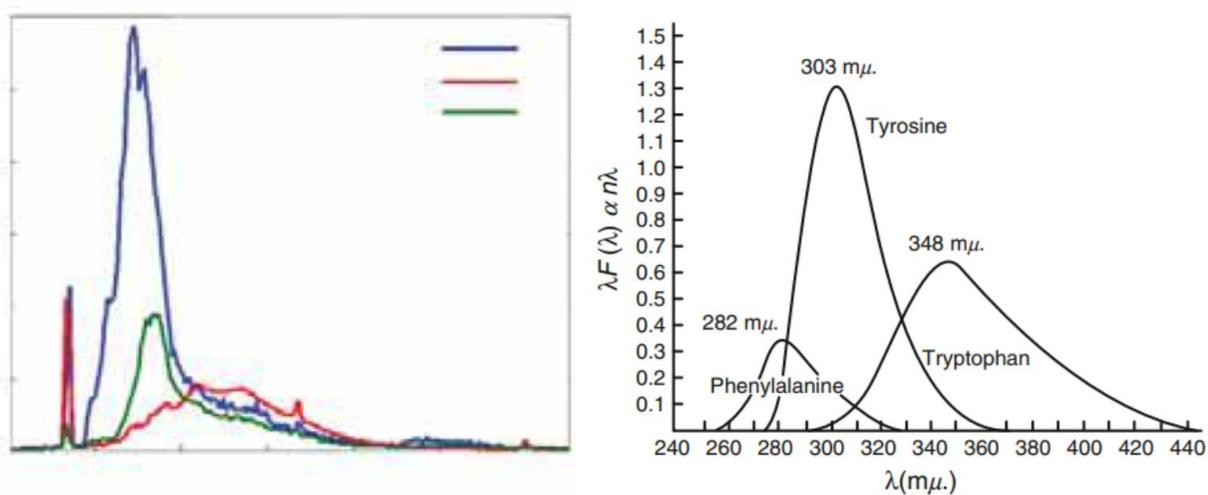


Figura 11 – Spettri LIF di riferimento per sostanze di biodegradabile (Colao 2012) a sinistra e spettri di fluorescenza di alcuni aminoacidi a destra.

Tabella III – Confronto dati di fluorescenza TG-LIF con campioni di riferimento

SCAN6			Riferimento		Note
Area	Banda (nm)	Decay (ns)	Banda (nm)	Decay (ns)	
A	330 – 360 nm	3	320 nm	N/A	Proteic substances (No reference data for TR measurements)
B	300 nm	3.8 ns			Not assigned
	420 nm	6.4 ns			Not assigned
	470 nm	5.4 ns	Calcite	470	5.9 ns Substrate

Analisi mediante elaborazione k-means

Le scansioni con il sistema LIF imaging, producono un set di dati di immagini molto grandi, che preclude l'ispezione visiva di ogni singolo spettro, pertanto l'elaborazione automatizzata è l'unico approccio praticabile all'analisi dei dati. Il partizionamento o segmentazione delle immagini acquisite in aree a elevata somiglianza spettrale, è un'operazione di analisi dell'immagine che fornisce caratteristiche spaziali rilevanti e spesso precede altre operazioni di quantificazione basate sulla misura della fluorescenza (Dima 2011). Come sottolineato poco sopra tuttavia, la segmentazione comporta sfide significative per l'elaborazione e l'analisi automatizzate delle immagini. Tra i diversi approcci disponibili è stato scelto il sistema di clustering k-means; questo algoritmo appartiene alla classe degli algoritmi unsupervised, e funziona come un "scatole nera" partizionando o segmentando l'immagine iperspettrale acquisita in aree che sono omogenee dal punto di vista del contenuto spettrale.

La decomposizione della media k di clustering con $k = 4$ ai dati di fluorescenza LIF è mostrata nella Figura 12. L'analisi mostra due bande prominenti a 337nm e 420nm, la prima è attribuita a sostanze simili a proteine mentre la seconda al substrato di calcite; bande di intensità inferiore compaiono intorno a 368 nm e anche a 637 nm.

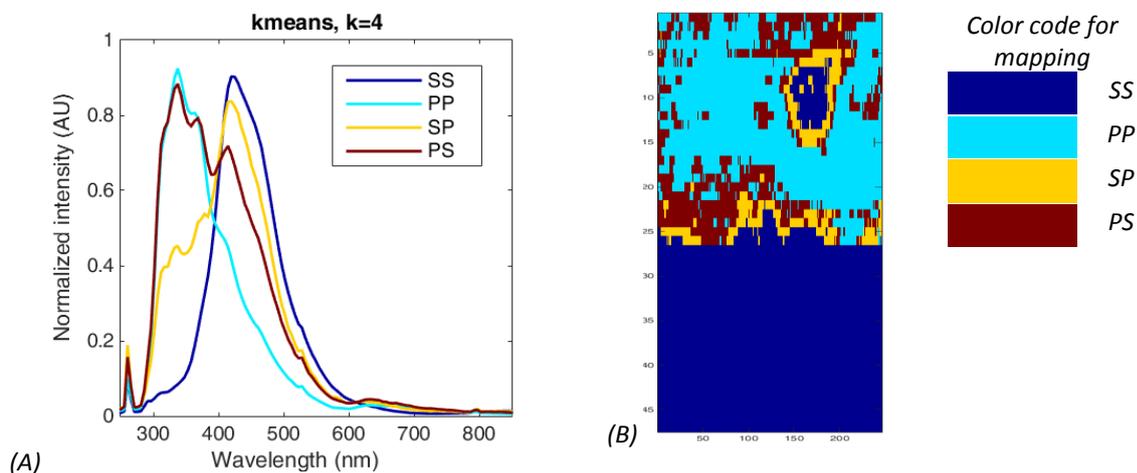


Figure 12 - K-means analysis with $k = 4$: (A) centroid spectra, (B) LIF image remapped according to pixel classification.

L'analisi è stata effettuata con $k = 4$ cluster; la scelta $k = 4$, è basata sul fatto che all'aumentare del fattore di clustering non c'è un decremento significativo della varianza delle distanze dei centroidi, ovvero si è in corrispondenza del ginocchio delle deviazioni quadratiche. I cluster ottenuti mostrano un'evidente anticorrelazione tra le bande 337 e 420nm, infatti la tendenza decrescente della prima banda è monotonicamente contrastata dalla tendenza crescente della seconda banda, come riportato nella Tabella IV.

Tabella IV – Bande nei centroidi k-means e $k=4$

	I337	I420	Band ratio	Classification
SS	0.06	0.9	0.07	Substrate
SP	0.45	0.84	0.54	Intermediate layer type #1
PS	0.88	0.7	1.26	Intermediate layer type #2
PP	0.92	0.44	2.09	Protein-like

Una migliore comprensione della tendenza osservata può essere ottenuta osservando la Figura 12B; mostra la rimappatura dell'area scansionata LIF con i colori indicizzati dall'appartenenza al cluster. Una spiegazione semplice e intuitiva si ottiene osservando che la parte blu inferiore (classificata come SS) corrisponde all'area trattata con biocida (preventol): il biocida ha un effetto estinguente significativo sulla banda proteica da 337 nm. Una situazione simile si osserva nella parte centrale superiore della Figura 12B, dove gli effetti dell'efflorescenza contrastano efficacemente lo sviluppo di agenti biotici. Le aree di confine (classificate come SP) sono visualizzate in giallo; appaiono coerentemente ai margini di entrambe le aree classificate come SS. Allo stesso modo le aree marroni, classificate come PS, appaiono in una posizione intermedia rispetto all'area soggetta al maggior attacco biologico e classificate come PP.

Decomposizione gerarchica: area SS

Iterando la decomposizione della media k in modo gerarchico verso l'area SS, si ottengono le sottoclassi mostrate nella Figura 13. È interessante notare come l'azione dell'efflorescenza per contrastare lo sviluppo del biota sia attenuata in alto a destra; in effetti, ciò corrisponde all'area non trattata con il biocida (cluster SS-P).

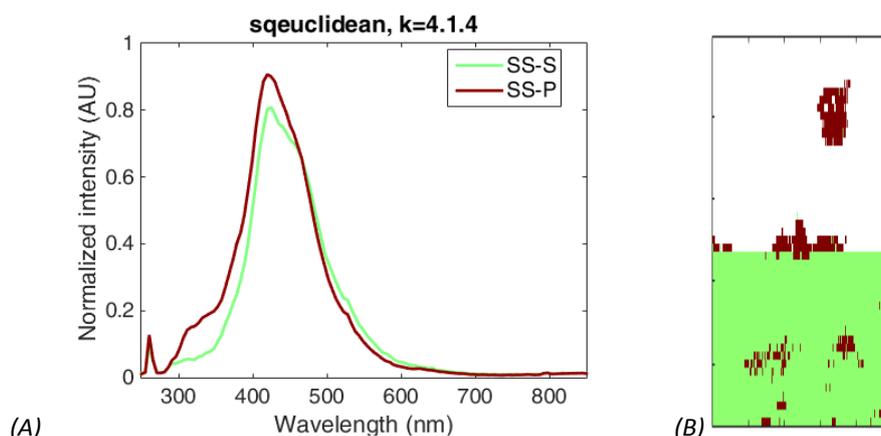


Figure 13 - Hierarchical analysis of the SS area with k -means and $k = 2$: (A) centroid spectra, (B) LIF image remapped according to pixel classification.

In modo simile, altre aree appartenenti allo stesso sottotipo SS-P appaiono sporadicamente sia all'interno dell'area trattata che ai margini di essa.

È interessante notare che sebbene l'informazione "vera" sia negli spettri, il k -means sulle immagini dà la collocazione spaziale e aiutando la decodifica dell'informazione. Per esempio la risalita della banda delle protein-like nell'area trattata (colore marrone in area verde), dice poco sullo spettro singolo (è infatti la spalla della banda a 330nm sulla curva marrone della figura 13A), ma acquista un senso preciso quando si osserva che ciò accade al centro dell'area trattata e in prossimità di aree a marcata rugosità superficiali associabili alla efflorescenza. Ciò è più consistente con l'ipotesi di una ripresa dell'attività biologica piuttosto che un semplice residuo lasciato dalla incompleta azione del biocida.

Questo risultato è inoltre consistente con l'osservazione fatta dai restauratori che sul sito di San Nicola hanno ritenuto l'attacco biologico molto aggressivo; i risultati sperimentali sono coerenti con la proliferazione biotica poco dopo l'applicazione del biocida, inoltre a San Nicola è stato anche osservato un deterioramento e una formazione visibili del bio-film in circa 2 mesi dopo il trattamento superficiale. Le misurazioni del LIF condotte in questo studio sono state eseguite circa un mese dopo l'applicazione del preventol: non ci sono ancora effetti visibili ad occhio nudo, ma l'azione del biota è ben apprezzata dalla sensibilità della tecnica LIF.

Tabella V - Bands in the k-means and k = 2 sub centroids of the classified area SS

	I337	I420	ratio	Classification
SS-P	0.16	0.9	0.18	Biotic action partially blocked
SS-S	0.05	0.8	0.06	Biotic action completely blocked

Decomposizione gerarchica: area PP

La decomposizione della media k con k = 4 al cluster PP è mostrata nella Figura 14. Il rapporto di intensità di banda a 337 nm e 420 nm ha un valore medio di 2,05 +/- 0,3, che è sicuramente ben compatibile con il valore 2,09 ottenuto per l'intera area PP (vedi tabella V). Si noti la giustapposizione di due aree appartenenti ai cluster PP-L e PP-R rispettivamente situate principalmente a sinistra, la prima e a destra la seconda. In termini spettrali, i centroidi differiscono principalmente nell'intensità di emissione di una banda a 360 nm, che è anche correlata all'emissione di sostanze simili alle proteine (tirosina?). Sebbene i dati disponibili non siano sufficienti per un'indagine differenziale e non siano supportati da alcun campionamento puntuale, dovrebbe essere possibile attribuire la differenza spettrale a diverse specie di attacco di biota.

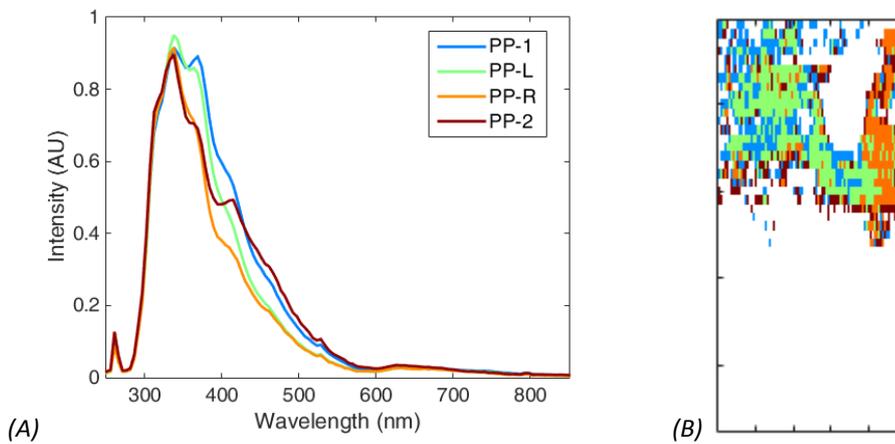


Figure 14 - Hierarchical analysis of the PP area with k-means, k = 4: (A) centroid spectra, (B) LIF image remapped according to pixel classification.

Table VI - Bands in the k-means and k = 4 sub centroids of the classified area PP

	I337	I363	I420	I461	I627	ratio337/420	Classification
PP-1	0.91	0.89	0.53	0.27	0.035	1.72	Higher 363nm band intensity
PP-L	0.95	0.86	0.44	0.19	0.035	2.16	Higher 363nm band intensity
PP-R	0.91	0.71	0.36	0.19	0.035	2.53	Lower 363nm band intensity
PP-2	0.89	0.71	0.49	0.31	0.035	1.82	Lower 363nm band intensity
						mean 2.05 +/- 0.3	

Decomposizione gerarchica: aree PS e SP

La decomposizione gerarchica delle aree PS e SP per mezzo di k è mostrata nella figura 15. L'analisi dei risultati ottenuti mostra una definizione più fine delle aree di confine tra l'area trattata con preventol e l'area non trattata, senza fornire ulteriori informazioni in merito a ciò che è stato discusso finora.

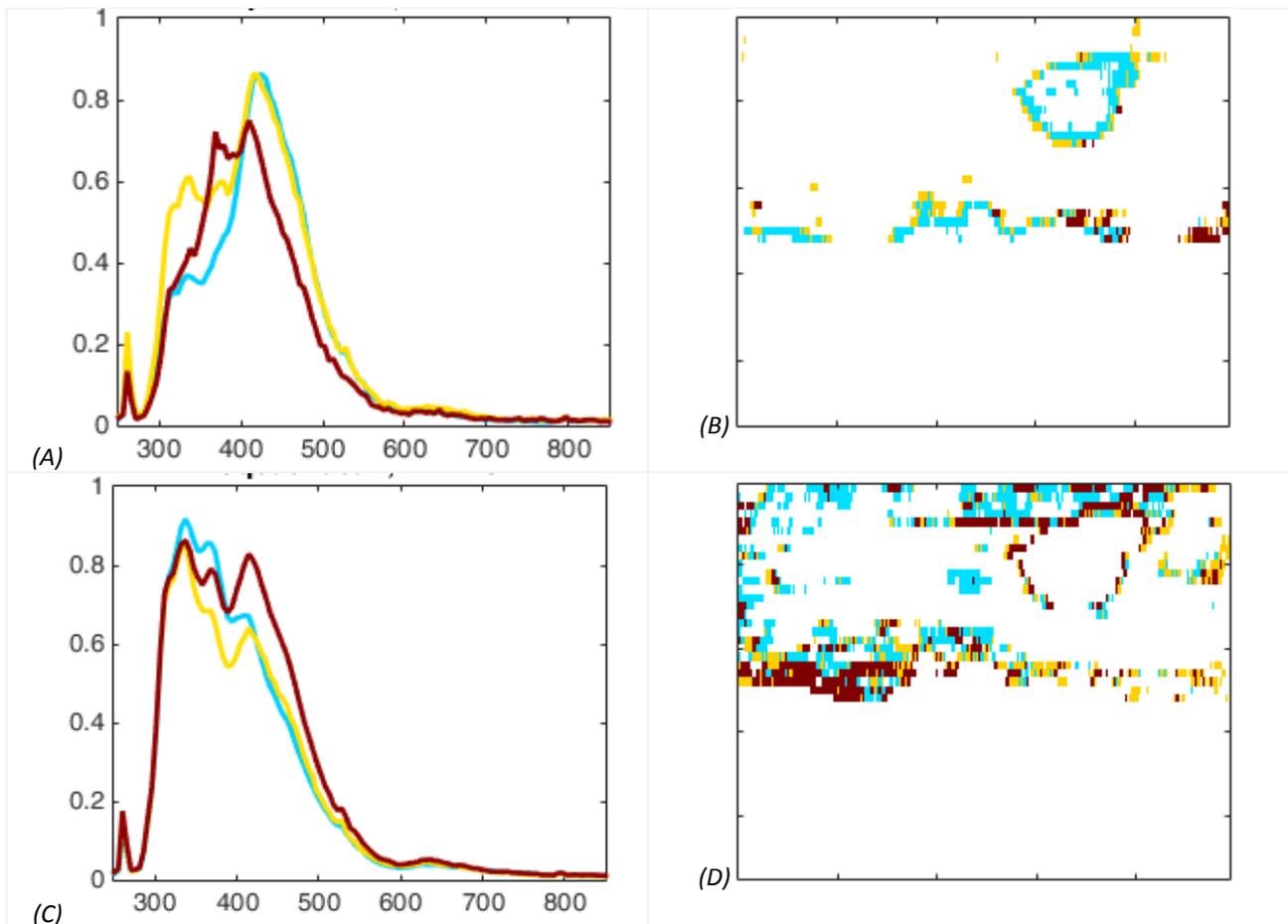


Figura 15 - Analisi gerarchica delle aree SP e PS con k -medie e $k = 3$: (A) spettri centroidi SP, (B) immagine LIF rimappata secondo la classificazione dei pixel nell'area SP, (C) spettri centroidi PS, (D) Immagine LIF rimappata in base alla classificazione dei pixel nell'area PS.

Parete absidale e semicupola

Gli obiettivi della diagnostica effettuata nella parete absidale e nella sovrastante semicupola sono relativi alla identificazione dei materiali utilizzati sia in fase di realizzazione dell'opera che di interventi successivi volti al restauro (ritocchi, ridipintura di parti rovinate/sfaldate/depigmentate) ed alla conservazione delle superfici affrescate (trattamenti di consolidamento).

In questo settore sono state effettuate scansioni con l'apparato LIFART evidenziate in figura 16 con aree rettangolari delimitate dal bordo rosso in modalità RILF e LIF; nella parete absidale sono state eseguite scansioni lungo tre strisce verticali affiancate Figura 16A, mentre nella semicupola è stata eseguita una sola scansione verticale Figura 16B.

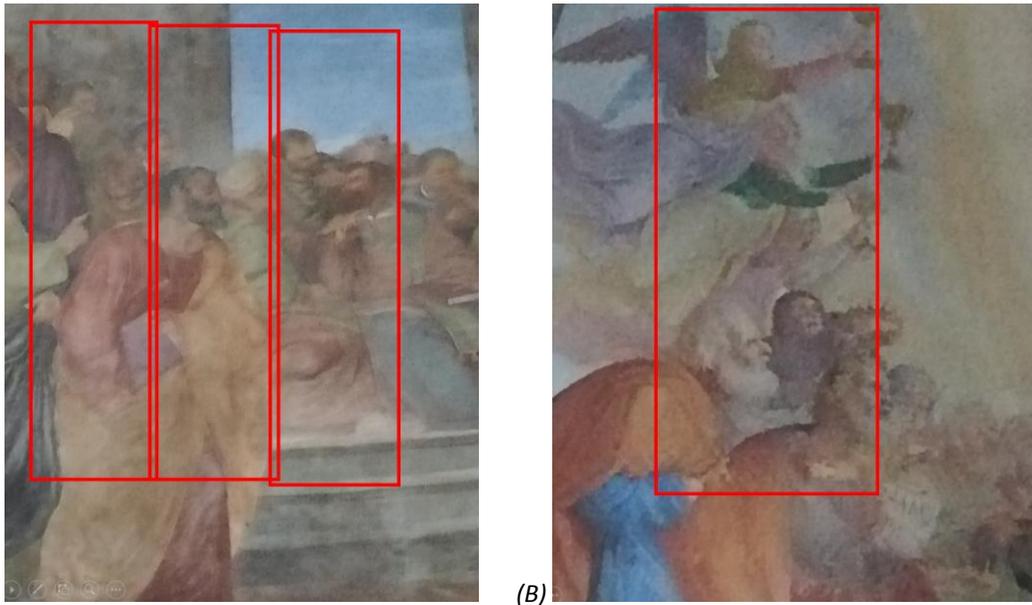


Figura 16 - Particolare delle porzioni scansionate nella parete absidale (A) e nella semicupola (B)

Alcune porzioni delle aree scansionate con l'apparato LIFART sono state anche oggetto di misure puntuali la posizione e denominazione per alcuni punti di campionamento in comune è riportata in figura 17. In particolare, le indagini sono state rivolte allo studio di alcune aree con pigmentazione prevalente tendente al blu, rosa, viola, giallo, verde e dorati.

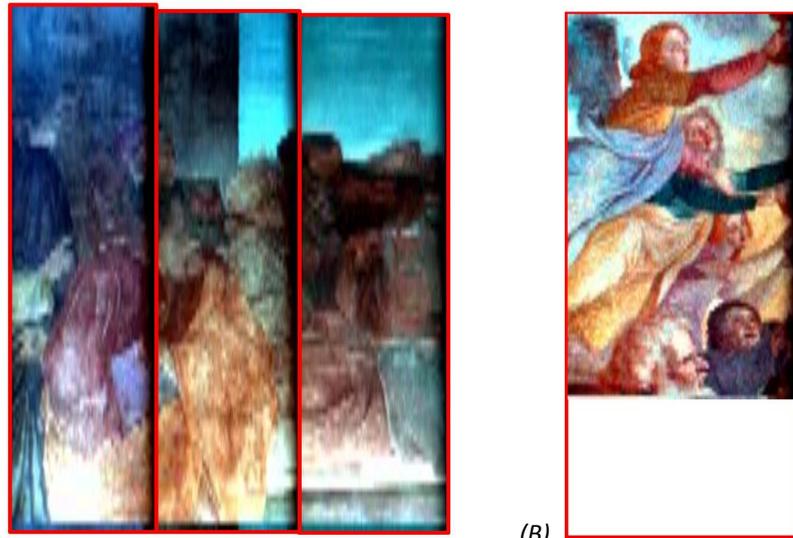


Figura 17 – Particolari con la nomenclatura dei campionamenti puntuali

Immagine di riflettanza

La riflettanza è stata acquisita con integrazione di 300ms e illuminante alogena 500W ad una distanza di circa 8 metri per la parete absidale e di circa 15m per le aree sulla semicupola. Le immagini ottenute sulle porzioni dell'affresco scansionate sono evidenziate nelle Figure 18A e 18B; queste sono ottenute utilizzando le intensità di emissioni a 600, 500 e 400nm per i canali RGB. La risoluzione spaziale in queste immagini è

volutamente degradata, fino al limite in cui resta agevole la discriminazione delle differenti campiture di colore.



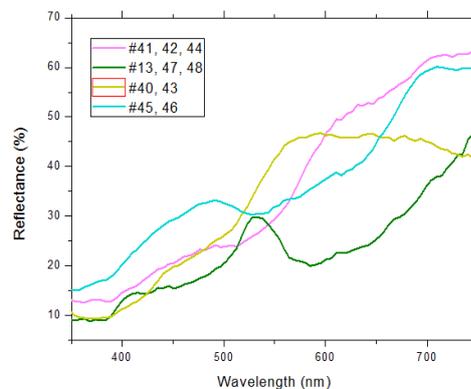
(A) (B)
 Figura 18 – Immagine di riflettanza nella parete absidale (A) e nella semicupola (B)

Analisi delle immagini di riflettanza

In Figura 19 si riporta lo spettro di riflettanza preso in corrispondenza di alcuni punti di misura che campionano differenti campiture di colore, rispettivamente rosa, verde, giallo e celeste. Si osserva che gli spettri di riflettanza hanno bande o transizioni prominenti nella regione spettrale che corrisponde al colore selezionato.

Sulla base degli spettri di riflettanza sono stati tentativamente assegnati alcuni pigmenti; in particolare le transizioni osservate per i pigmenti rosso e gialli, rispettivamente a 550 e 580nm indicano la prevalenza di pigmenti a base di terre (terra rossa e terra gialla).

Relativamente al verde non si nota somiglianza spettrale col blu e con il giallo, rendendo improbabile l'ipotesi che sia ottenuto mediante miscela; la tipica banda a 520nm porta invece ad attribuire questo pigmento al verde di cromo.



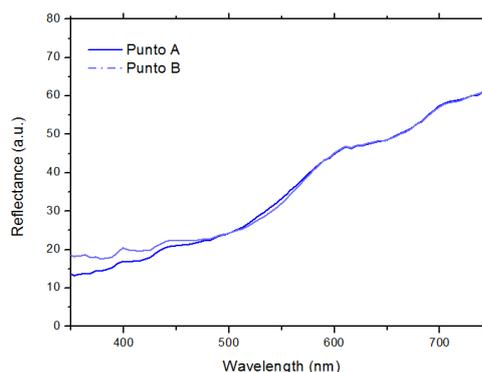


Figura 19– A sinistra punti di campionamento, a destra spettri sui punti di campionamento relativi a diverse campiture di colore.

Per quello che riguarda i pigmenti azzurri/celesti, si osserva che gli spettri di riflettanza misurati non presentano bande caratteristiche e restano dunque di più difficile assegnazione; ciò è dovuto al fatto che sono colori piuttosto chiari e dunque miscelati con pigmenti bianchi che tendono ad alterare le caratteristiche spettrali che invece si ritrovano nei pigmenti puri. Per chiarire meglio questo aspetto, sono stati analizzati gli spettri di riflettanza in corrispondenza di punti con differenti sfumature come riportato in Figura 20. Nelle aree (C) e (D) si osserva uno spostamento con emissione sulla banda a 520nm ad indicare un possibile mix con il pigmento attribuito al verde di cromo. I dati acquisiti finora non consentono tuttavia una identificazione univoca del pigmento celeste.

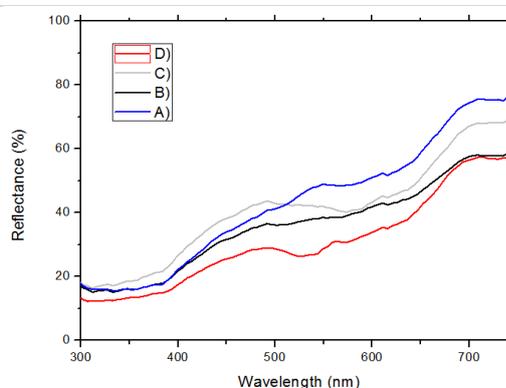


Figura 20A – A sinistra punti di campionamento di alcune nuance tendenti al blu; a destra i corrispondenti spettri di riflettanza.

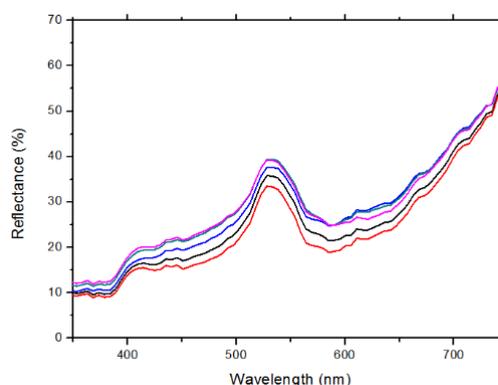


Figura 20B – A sinistra punti di campionamento di alcune nuance tendenti al verde; a destra i corrispondenti spettri di riflettanza.

Le assegnazioni fatte sulla base degli spettri di riflettanza sono riportate in Tabella VII.

Tabella VII – Identificazione dei pigmenti basata sugli spettri di riflettanza

Punto	Colore	Commento
45, 46	Blu / celeste	N/A
41, 42, 44	Rosa	Terra rossa
40, 43	Giallo	Ocra gialla
13, 47, 48	Verde	Verde di cromo

Analisi della fluorescenza

Sulle aree di Figura 16A e 16B sono state quindi eseguite scansioni in fluorescenza con integrazione di 1000ms ed eccitazione a 266nm con densità di energia pari a circa 2uJ/cm². Nella Figura 21 si riportano le immagini in falsi colori ottenute utilizzando le intensità di emissione a 560, 420e 330nm rispettivamente per i canali RBG¹.

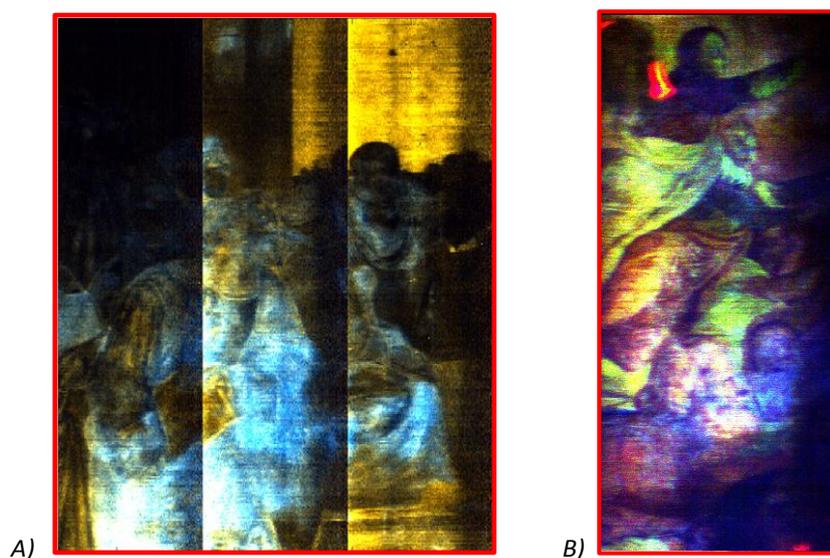


Figura 21– Immagine di fluorescenza rappresentata come bande RBG sulla parete dell'abside a sinistra (A) e sulla semicupola (B) a destra.

Relativamente alla rappresentazione fatta con bande, la particolare scelta fatta per i canali RGB mostra zone con colorazioni che vanno dal blu al giallo al verdastro²; la prevalenza del falso colore è assegnabile a diversi trattamenti superficiali come discusso nel seguito.

¹ Nota sulla risoluzione spaziale: Gli spettri di fluorescenza sono di norma mediati su regioni spaziali con dimensioni dell'ordine del centimetro, i dettagli di disegno possono avere dimensioni inferiori questo può rendere difficoltoso differenziare all'interno della stessa campitura

Il dato di fluorescenza ottenuto, è stato analizzato con decomposizione PCA, riportata in Figura 22. Sebbene la decomposizione PCA fornisca spettri cui non è possibile attribuire un significato diretto in termini di associazione spettro materiale, resta tuttavia di interesse esaminare le bande prominenti da utilizzare come indicazione per la ricerca di emissioni. In particolare, si notano bande in somma/differenza attorno a 290nm, una banda prominente a 450nm e bande contrapposte tra 420/470nm; è infine evidente una emissione a 370nm. Le prime tre componenti PCA spiegano rispettivamente il 55%, 31%, il 4% della varianza totale. Si riportano in Tabella VIII le bande prominenti delle componenti della PCA insieme al tentativo di assegnazione iniziale.

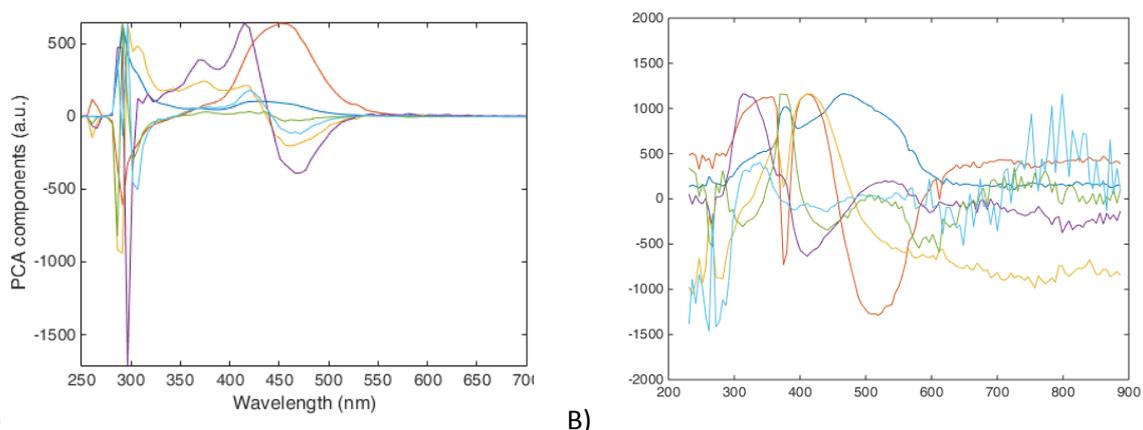


Figura 22 –PCA loadings della scansione A) sulla parete absidale a sinistra e B) sulla semicupola a destra.

Tabella VIII – Significato di alcune caratteristiche (features) dei loading della PCA

Banda	Componente PCA	Descrizione di features prominenti
Multibanda	PC1-A e PC1-B	Mix of features con contributo prevalente dal sub strato (calcite/gesso)
290 nm	PC2-A	Trattamento superficiale (parete absidale)
380	PC2_B	ZnO
350-400 nm	PC3-A	Trattamento superficiale (semicupola)
Multibanda	Altre componenti	Contrapposizione di elementi spettrali

Dall'analisi delle bande evidenziata dalla PCA, otteniamo alcune informazioni di interesse per la diagnosi:

- Zone di reintegrazione pittorica a base di bianco ZnO
- Ampie zone sottoposte a intervento conservativo di consolidamento

Se prendiamo in considerazione l'emissione a 380nm, osserviamo che questa è distintamente emessa nella scansione della semicupola all'altezza della spalla sinistra del personaggio più in alto, dove si nota un'area bene evidenziata dall'immagine in fluorescenza. L'emissione spettrale in corrispondenza di questa area è riportata in Figura 23: questo si caratterizza per una intensa banda a 380nm che è specifica caratteristica per

pigmenti basati su ZnO (un'ulteriore conferma di questa assegnazione viene dalla stima del tempo di decadimento, analizzata in maggiore dettaglio nel paragrafo successivo).

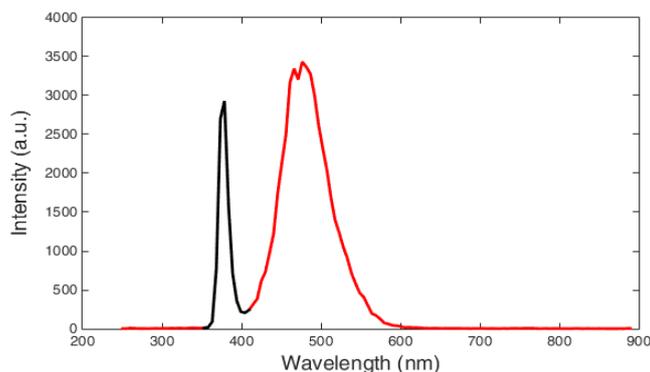


Figura 23 – Particolare dell'emissione a 380nm attribuita alla fluorescenza del pigmento bianco ZnO

La distribuzione di ZnO legata a reintegrazioni pittoriche è documentabile mediante analisi di somiglianza spettrale. La Figura 24A riporta la distribuzione spaziale sull'area sottoposta ad indagine della somiglianza spettrale con lo spettro dello ZnO effettuata con l'algoritmo SAM; poiché l'emissione spettrale a 380nm è una banda particolarmente stretta è anche possibile correlare la intensità di banda con la reintegrazione pittorica, come riportato in Figura 24B. Infine per facilitare il confronto e l'individuazione spaziale dei ritocchi si riporta in Figura 24C l'immagine di riflettanza.

È interessante notare come ci siano diversi particolari che sono stati ridipinti; sebbene il più evidente per estensione sia situato in prossimità delle ali del personaggio più in alto, si osservano ritocchi in molte altre aree, come ad esempio nella parte bassa della scansione.

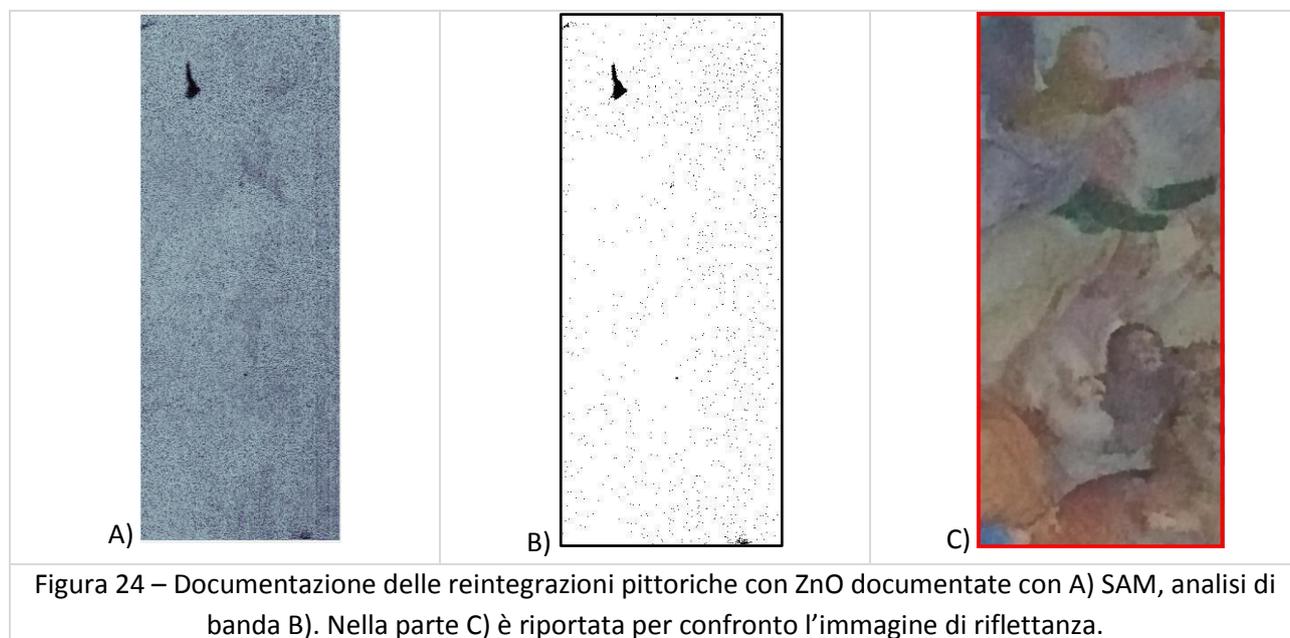


Figura 24 – Documentazione delle reintegrazioni pittoriche con ZnO documentate con A) SAM, analisi di banda B). Nella parte C) è riportata per confronto l'immagine di riflettanza.

Anche la distribuzione di consolidante è documentabile mediante l'analisi di somiglianza spettrale. La Figura 25 riporta lo spettro di riferimento del consolidante (presumibilmente paraloid), mentre la Figura 26A riporta la distribuzione spaziale effettuata con l'algoritmo SAM; anche in questo caso è stata effettuata l'analisi della

intensità di banda come riportato in Figura 26B. Infine per facilitare il confronto e l'individuazione spaziale dei ritocchi si riporta in Figura 24C l'immagine di riflettanza.

È interessante notare come ci siano diversi particolari che sono stati ridipinti; sebbene il più evidente per estensione sia situato in prossimità delle ali del personaggio più in alto, si osservano ritocchi in molte altre aree, come ad esempio nella parte bassa della scansione.

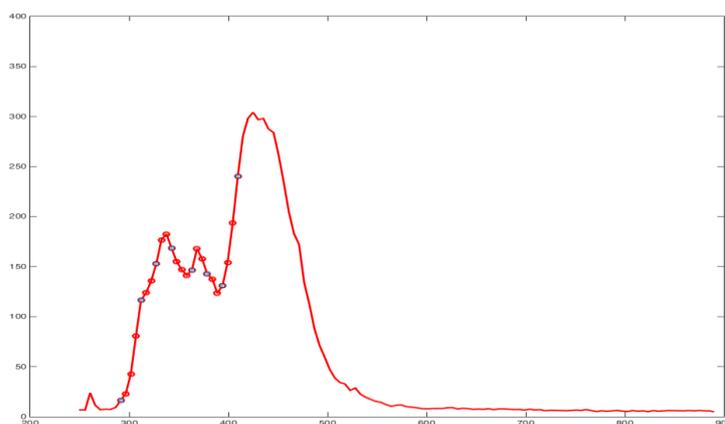


Figura 25 – Particolare dell'emissione a 380nm attribuita alla fluorescenza del pigmento bianco ZnO

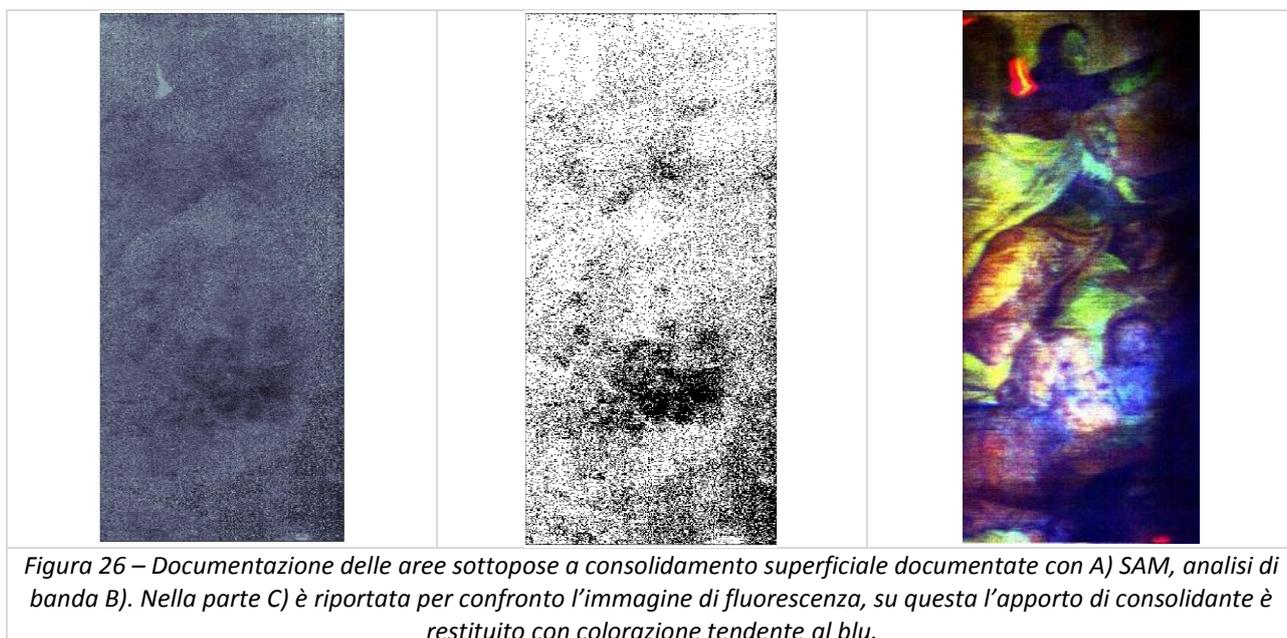


Figura 26 – Documentazione delle aree sottoposte a consolidamento superficiale documentate con A) SAM, analisi di banda B). Nella parte C) è riportata per confronto l'immagine di fluorescenza, su questa l'apporto di consolidante è restituito con colorazione tendente al blu.

In analogia a quanto fatto con gli spettri di riflettanza, anche in questo caso si sono campionati gli spettri di fluorescenza in corrispondenza dei punti di misura precedentemente analizzati, rispettivamente rosa, verde, giallo e celeste; gli spettri LIF di diversi pigmenti sono riportati in Figura 27, mentre in Figura 28 si riportano gli spettri di fluorescenza presi in corrispondenza di alcuni punti di misura che campionano differenti nuance di campiture tendenti al blu/celeste.

La emissione tra 300 e 400 nm che si ritrova prevalentemente sui pigmenti gialli, è attribuita tuttavia a trattamenti superficiali e non al pigmento medesimo; in conclusione dobbiamo osservare che nessuno dei pigmenti analizzati ha bande distinte in fluorescenza.

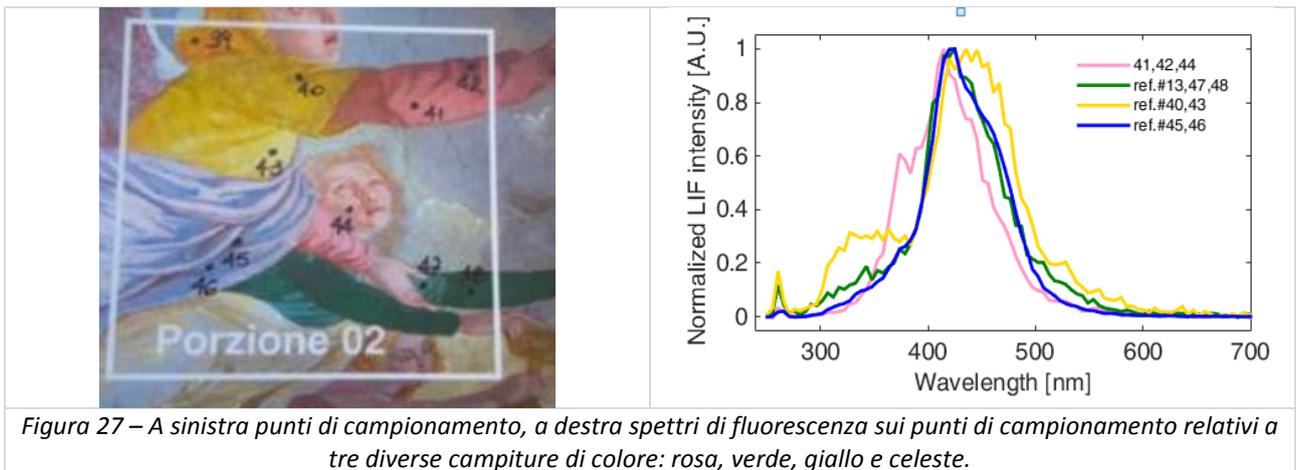


Figura 27 – A sinistra punti di campionamento, a destra spettri di fluorescenza sui punti di campionamento relativi a tre diverse campiture di colore: rosa, verde, giallo e celeste.

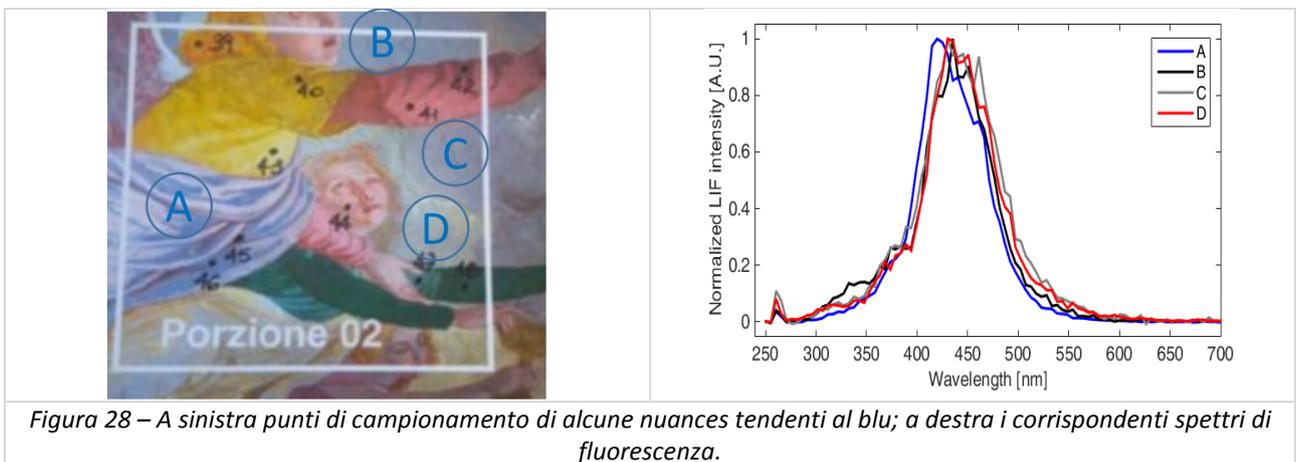


Figura 28 – A sinistra punti di campionamento di alcune nuance tendenti al blu; a destra i corrispondenti spettri di fluorescenza.

Analisi delle immagini acquisite con TG-LIF

Le capacità diagnostiche della fluorescenza sono infine state complementate dalle misure dei decadimenti temporali, che servono a supporto della interpretazione e delle assegnazioni spettrali. Si riporta in Figura 29 le intensità LIF in falsi colori per acquisizioni con gate temporale di 10ns e acquisite a 0, 10 e 20 ns di ritardo.

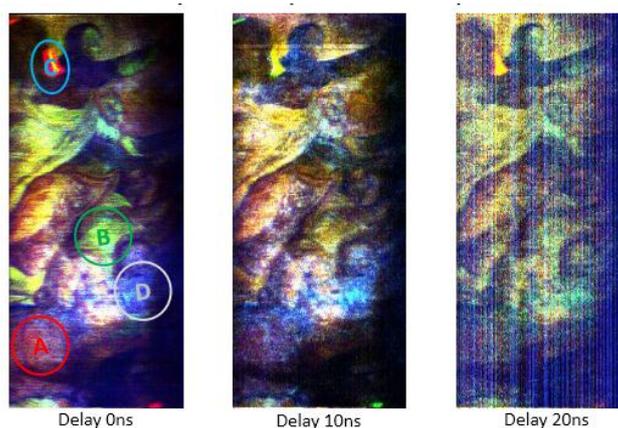


Figura 29 – Immagine di fluorescenza delayed per gate temporale tra 0 ns e 20 ns rappresentate in flasi colori

La Figura 30 mostra l'andamento temporale di alcuni spettri rappresentativi (media spaziale su 4 x 5 pixel), mentre in Tabella III si riportano le costanti di decadimento ottenute; consistentemente con quanto ottenuto dalla decomposizione PCA, si osserva l'esistenza di alcune bande prominenti in particolare a 340nm e a 380nm e 450nm per le quali si è calcolato il decadimento temporale.

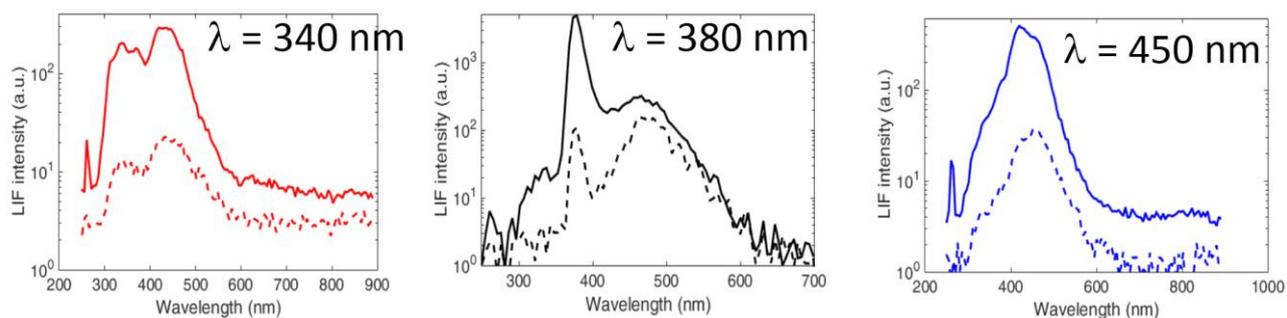


Figura 30 – Spettri della scansione TG-LIF.

La conferma per l'assegnazione delle bande è stata fatta mediante il confronto con dati noti di letteratura, combinando la posizione spettrale dei picchi prominenti e le costanti di decadimento spettrale. In particolare, si riporta in Figura 31 lo spettro e il decadimento temporale del un campione di calcite (substrato) usato per il confronto.

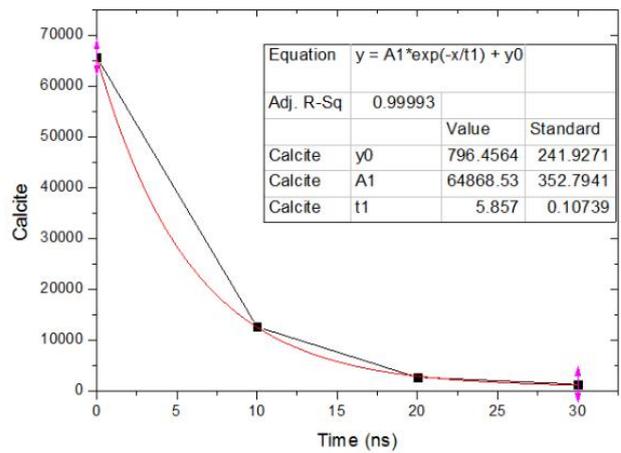
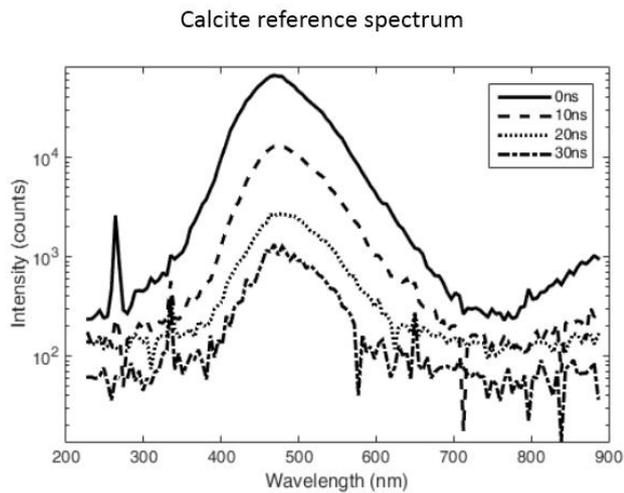


Figura 31 – Riferimento di laboratorio di calcite con tecnica TG-LIF

Tabella IX – Confronto dati di fluorescenza TG-LIF con campioni di riferimento

SCAN		Riferimento		Note	
Banda (nm)	Decay (ns)	Banda (nm)	Decay (ns)		
340 nm	5.6 ns			Consolidante paraloid	
380 nm	7.6 ns			ZnO	
450 nm	5.4 ns	Calcite	470 nm	5.9 ns	Substrate

Conclusioni

Lo studio presentato in questo rapporto, evidenzia la effettiva capacità del laboratorio ENEA di allestire un apparato strumentale per la misura della fluorescenza UV indotta da laser risolta sia nello spettro che nel tempo; l'implementazione eseguita è anche efficace per la misura per la misura degli spettri di riflettanza con illuminante alogeno. Quest'ultima tecnica si rivela particolarmente utile come strumento diagnostico complementare alla LIF per la identificazione dei pigmenti.

Le risultanze di maggior rilievo sono riassunte come segue:

Risultati delle analisi sul biodegrado

1. Identificazione di aree sottoposte a biodeterioramento, mostra con colorazione tendente al lilla/viola sia aree dove il danno è evidente, che aree a colorazione più sfumata dove non c'è un evidente danno visibile ad occhio nudo.
2. Documentazione della depigmentazione dall'angolo in basso a sx verso dx e alto; il pattern individuato segue una linea di crescita che va dal lato sinistro, prevalentemente verso la parte bassa, verso il lato destro lungo direzioni che presumibilmente corrispondono ai percorsi di risalita di umidità. In termini spettrali questo aspetto è evidenziato da un maggior peso della banda tra 400 nm e 450 nm.
3. Nella parte alta si rileva la predominanza di colore scuro, ad indicare un minore grado di deterioramento. È interessante notare aree a maggiore contributo spettrale a 450 nm 500nm senza peraltro avere un riscontro all'osservazione visuale diretta, queste appaiono attestarsi dalla linea di separazione tra coro e parte dell'abside. Si attribuisce tale osservazione alla presenza di umidità lungo una linea di probabile giunzione tra corpi di costruzione non perfettamente omogenei.
4. A scendere dalla parte superiore compaiono striature di linee lungo la direzione verticale; queste sono attribuite a depigmentazioni causate da ricadute di acqua in forma di goccia, la cui natura può essere in parte dovuta a condensazione interna.

Analisi k-means

1. L'analisi evidenzia e consente di distinguere le aree trattate con biocida da quelle non trattate. La discriminazione viene effettuata sulla base dell'estinzione della banda di sostanze simili alle proteine (triptofani e tirosina)
2. In aree di forte efflorescenza si documenta che l'azione del biocida è meno efficace
3. È documentata l'elevata aggressività dell'azione biotica che ricompare dopo solo un mese dal trattamento;
4. L'osservazione visiva diretta non rivela il riavvio dell'attività del biota che è invece ben documentato dall'analisi della fluorescenza

Risultati delle analisi sulla semicupola

1. Si sono documentate aree sottoposte a interventi di reintegrazione pittorica; la metodologia implementata si è dimostrata essere di elevatissima sensibilità e selettività per alcuni pigmenti (p.es. ZnO), e di minore selettività per pigmenti a base di terre. Nel caso delle terre l'uso della riflettanza ha fornito informazioni complementari di notevole valore diagnostico.

2. La tecnica LIF è stata in grado di documentare aree sottoposte a interventi conservativi, con identificazione di consolidanti acrilici usati sulla parete dell'abside e paraloid nella parte della semicupola.

Referenze

F. Colao, R. Fantoni, L. Fiorani, A. Palucci, I. Gomoiu, "Compact scanning lidar fluorosensor for investigations of biodegradation on ancient painted surfaces", *J. Optoelectr. Adv. Mater.* 7, 3197–3208 (2005).

A. Waller, D. Nivens, K. Elkins, Fluorescence and Infrared Spectroscopy Study of Humic Acid Complexation with Metal Ions. (2019).

M. Romani, F. Colao, R. Fantoni, M. Guiso, M.L. Santarelli, Hyperspectral fluorescence for organic pigment characterization in contemporary artwork. *J. Appl. Laser Spectrosc.*, 1, 29-36, (2014).

F. Colao, L. Caneve, L. Fiorani, A. Palucci, R. Fantoni, M.P. Ortiz, M.A. Gomez, M.A. Vazquez, (2012), Report On Lif Measurements In Seville, Part 2: Santa Ana Church, Rapporto Tecnico ENEA, RT/2012/ENEA, (2012).

AA. Dima, Elliott, J.T., Filliben, J.J., Halter, M., Peskin, A., Bernal, J., Kocielek, M., Brady, M.C., Tang, H.C. and Plant, A.L., 2011. Comparison of segmentation algorithms for fluorescence microscopy images of cells. *Cytometry Part A*, 79(7), pp.545-559. (2011).