

PIROLISI ANALITICA E SPETTROMETRIA DI MASSA PER LA CARATTERIZZAZIONE DI LEGNI ARCHEOLOGICI BAGNATI

Maria Perla Colombini, Jeannette J. Łucejko, Francesca Modugno, Erika Ribechini

Università di Pisa - Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Pisa

Venerdì 7 Dicembre
2007
4° Intervento

Introduzione

La conoscenza dei processi di deterioramento del legno proveniente da contesti archeologici, e dei suoi componenti quali lignina, cellulosa ed emicellulosa, è una problematica da cui non si può prescindere quando ci si rivolge alla conservazione e alla musealizzazione di tali reperti. Infatti i reperti archeologici in legno, soprattutto quelli rinvenuti in contesti umidi e pertanto definiti “legni bagnati”, durante il periodo di giacitura possono aver subito processi degradativi sia di tipo chimico-fisico che biologico, che hanno impoverito di cellulosa ed emicellulosa la matrice lignea. Il risultato è una struttura fragile imbibita di acqua, e costituita di lignina¹. Le conoscenze attuali sui processi degradativi della lignina nel legno archeologico sono estremamente scarse² e risulta quindi di interesse acquisire una più completa conoscenza sulle trasformazioni chimiche che si verificano nei legni archeologici in modo da poter sviluppare adeguate e mirate metodologie di consolidamento e conservazione. Questo lavoro presenta uno studio della composizione chimica del legno archeologico bagnato, con particolare attenzione alla lignina, per mezzo di due tecniche pirolitiche entrambe basate su spettrometria di massa, la spettrometria di massa a esposizione diretta (DE-MS) e la pirolisi-gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (Py-GC/MS).

La DE-MS è una tecnica rapida di fingerprint che permette di ottenere in pochi minuti e senza nessun pretrattamento del campione uno spettro di massa complessivo di materiali organici ad alto peso molecolare quali legno e lignina. L'analisi statistica multivariata delle componenti principali (PCA) è stata impiegata nella elaborazione dei dati degli spettri di massa. Questo tipo di analisi ha consentito di confrontare gli spettri di massa dei vari campioni analizzati e di identificare i segnali più significativi per la loro interpretazione³.

La Py-GC/MS permette di ottenere informazioni sulla struttura chimica della lignina grazie alla separazione ed identificazione dei frammenti prodotti nel degrado termico, ed è stata già applicata con successo per investigare alterazioni chimiche nel legno degradato. In particolare, nel caso della lignina, i prodotti di pirolisi riflettono le unità monomeriche presenti⁴.

L'approccio analitico-strumentale proposto è stato primariamente testato su materiali di riferimento e successivamente su campioni di legni archeologici di diversa epoca e provenienza. La maggior parte dei legni archeologici studiati è stata raccolta nel corso degli scavi condotti nel sito delle “Navi Antiche di San Rossore” (Pisa, Italia).

I risultati hanno dimostrato che le due procedure analitiche utilizzate possono risultare di grande utilità non solo per distinguere le specie legnose (*hardwood/softwood*) ma anche per ottenere informazioni indicative sullo stato di degrado dei legni archeologici. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la perdita di cellulosa ed emicellulosa da parte del legno archeologico, la formazione di gruppi carbossilici e la rottura di legami intermonomerici nella struttura della lignina. Ulteriori indagini comparative, che prevedono l'analisi di un numero più elevato di campioni archeologici e di riferimento, sono tuttora in corso, volte ad approfondire la conoscenza della potenzialità di queste tecniche analitiche nel valutare la degradazione del legno ed a studiare le trasformazioni della lignina in contesti archeologici.

Materiali e metodi

Campioni. I campioni di legno archeologico bagnato (F pino, G faggio, D olmo) provenienti dagli scavi del sito delle Navi Antiche di San Rossore (Pisa) sono stati messi a disposizione dalla Soprintendenza ai Beni Archeologici della Toscana. I manufatti lignei rinvenuti nel sito sono stati datati tra il IV secolo a.C. e II secolo d.C. I campioni di riferimento di legno stagionato delle stesse specie (*Pinus pinaster*, *Fagus sylvatica*, *Ulmus minor*) sono stati messi a disposizione

dall'Istituto IVALSA (CNR, Firenze).

Il legno usato per l'analisi DE-MS è stato seccato in forno a 50°C per 48 ore e macinato in un mulino a palle. Per l'analisi Py-GC/MS la lignina è stata estratta dal legno dal Professor Marco Orlandi dell'Università di Milano Bicocca con una metodologia recentemente ottimizzata⁵ e basata su quella sviluppata da Holmbom and Stenius⁶.

DE-MS e PCA. La strumentazione (Thermo Electron Corporation, USA) è costituita da una Direct Probe Controller (DPC) con una sonda DEP per l'iniezione diretta del campione (filamento in renio, incremento programmato di corrente da 0 a 1000 mA in 2 s, poi 1000 mA per 60 s) e da uno spettrometro di massa a trappola ionica Polaris Q (ionizzazione ad impatto elettronico 70 eV). La temperatura della sorgente è stata impostata a 230°C e la scansione mediante spettrometro di massa è stata eseguita nell'intervallo 50-1000 m/z. I campioni sono stati analizzati in duplicato mediante la deposizione della polvere direttamente sul filamento.

L'analisi statistica multivariata degli spettri di massa nell'intervallo 50-500 m/z è stata eseguita mediante analisi delle componenti principali (PCA, algoritmo Nipals) sulla matrice di covarianza, dopo centratura dei dati e normalizzazione per riga. La regione 50-500 m/z è stata selezionata perché contiene i frammenti di pirolisi derivati dalla lignina (monomeri e dimeri). Il software utilizzato per l'analisi è XLSTAT 6.0 (Addinsoft, Francia).

Py-GC/MS. La pirolisi analitica è stata eseguita mediante un pirolizzatore Pyroprobe 5000 Series (Modello 5150) con sonda a filamento di platino interfacciato con un sistema GC/MS Agilent Technologies (USA) costituito da un gas cromatografo (6890N, interfaccia 300°C) e da uno spettrometro di massa a quadrupolo (Agilent 5973; EI, 70 eV). La pirolisi è stata eseguita in un tubicino di quarzo alla temperatura di 500°C, per 20s. Il campione di lignina (0-60 µg) viene inserito nel tubicino di quarzo insieme con 5 µl di soluzione di 1,1,1,3,3,3 – esametildisilano (HMDS 99,9 Sigma-Aldrich) dopodiché il tubicino è stato inserito nella sonda di pirolisi. Ogni campione è stato analizzato tre volte. Il confronto quantitativo dei profili pirolitici è stato basato sulle aree percentuali dei picchi rispetto all'integrale totale dei componenti identificati. Il rapporto S/G tra la quantità di siringili e di guaiacili nei prodotti di pirolisi è stato calcolato dalle somme delle aree dei picchi corrispondenti ai fenoli di tipo guaiacilico e siringilico. La separazione cromatografica è stata eseguita su colonna capillare in silice fusa (fase stazionaria 5% difenil-95%-dimetil-polisilossano, 30 m × 0.25 mm i.d., Hewlett Packard, USA) con precolonna in silice disattivata (2 m × 0.32 mm i.d., J and W Scientific Agilent Technologies, USA). Condizioni cromatografiche: temperatura iniziale 31°C, isoterma 8 min, 10°C/min fino a 240°C, isoterma 3 min, 20°C/min fino a 300°C, isoterma 30 min. Gas di trasporto: He (purezza 99.995 %), flusso costante 1.0 ml/min.

Risultati e discussione

DE-MS. Tutti i campioni lignei analizzati hanno mostrato un singolo picco in corrente ionica totale (TIC), variabile larghezza e in alcuni casi presenza di spalle. Gli spettri DE-MS presentano notevole complessità, come ci si può aspettare dall'analisi in spettrometria di massa diretta della complessa miscela di prodotti che si formano durante la pirolisi del legno.

Nella Figura 1 si confrontano gli spettri di massa del legno di faggio rispettivamente nativo (1a) e archeologico G26 (1b). Entrambi gli spettri sono caratterizzati dalla presenza di picchi caratteristici della lignina di tipo guaiacil-siringile. I frammenti derivanti dai monomeri guaiacilici sono: m/z 124, corrispondente al picco molecolare del guaiacolo (2-metossi fenolo); m/z 137 ([guaiacolo+CH₂]⁺), che può derivare da diversi composti formati durante la pirolisi delle unità guaiaciliche, incluso etilguaiacolo, propilguaiacolo e alcool coniferilico; m/z 151 (guaiacolo + CH₂CH₂⁺). I frammenti siringil-derivati includono m/z 167 (siringolo + CH₂⁺) e m/z 181 (siringolo + CH₂CH₂⁺), mentre il picco m/z 210 corrisponde allo ione molecolare dell'alcool sinapilico⁷.

Il rapporto tra l'abbondanza relativa del picco m/z 167, più abbondante nei monomeri siringilici, e del picco con m/z 137, derivante dai monomeri guaiacilici, può essere considerato un semplice indice del rapporto S/G per i campioni di lignina. I campioni di legno *softwood* non contengono il picco a m/z 167, mentre i campioni di legno di tipo *hardwood* presentano variabilità in questo rapporto.

Nello spettro di massa del legno di riferimento sono presenti i picchi derivanti dalla componente polisaccaridica, come i frammenti aventi m/z 69 e 97, mentre l'intensità di questi frammenti è particolarmente ridotta nel caso del legno archeologico.

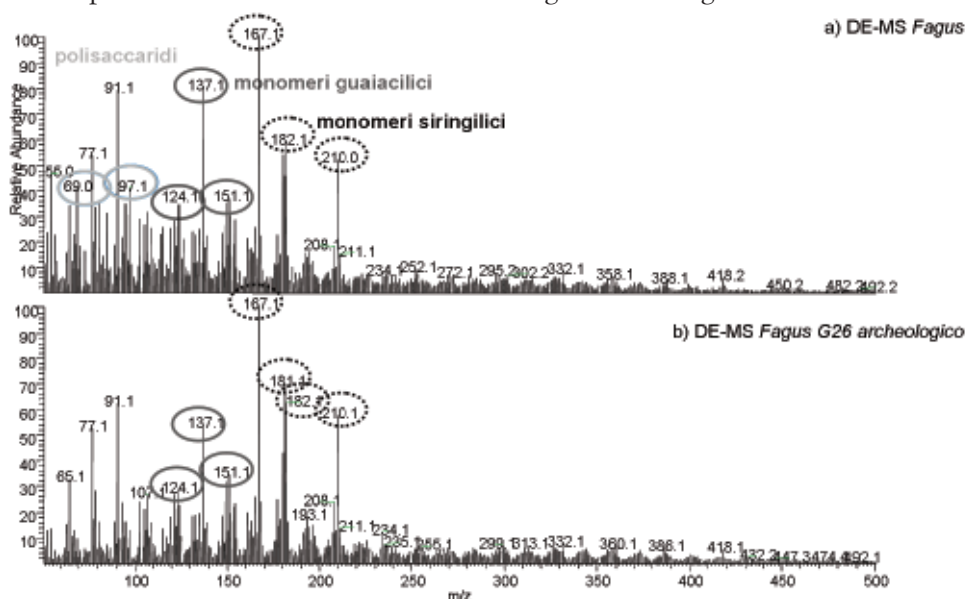


Figura 1. Spettri di massa ottenuti mediante DE-MS di a) legno di faggio di riferimento e b) legno di faggio archeologico dal sito di San Rossore.

Gli spettri di massa ottenuti mediante DE-MS sono spettri complessivi, ovvero derivanti dalla somma degli spettri di massa di tutti i composti desorbiti o pirolizzati, e risultano quindi di difficile interpretazione. Per confrontare quantitativamente gli spettri di massa provenienti da più campioni e sfruttare al massimo l'informazione contenuta in questi *fingerprints* è stata utilizzata l'analisi statistica multivariata con il metodo delle componenti principali (PCA). Le prime due componenti principali (PC1, PC2) ricavate dall'analisi degli spettri acquisiti rappresentano il 78,5% della varianza totale, ed il relativo *score plot* è mostrato in Figura 2.

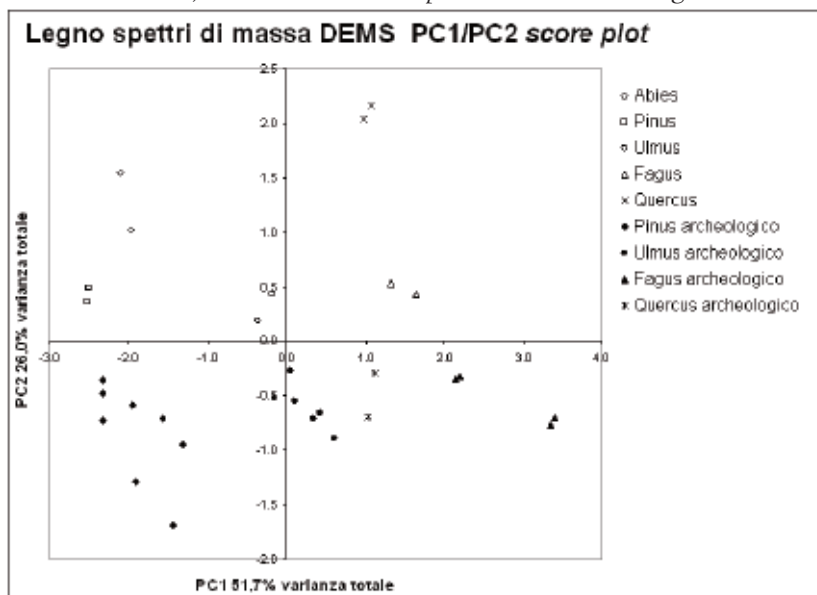


Figura 2. Score plot relativo alle prime due componenti principali degli spettri DE-MS di campioni di legno archeologico e di riferimento.

È stato messo in evidenza che mediante PCA è possibile differenziare il legno di tipo *softwood* dal legno di tipo *hardwood* in base ai valori della prima componente principale, mentre la seconda componente principale differenzia il legno stagionato dal legno archeologico. In particolare, la PC1 è positivamente correlata al contenuto di frammenti siringilici nello spettro di massa, e negativamente correlata al contenuto di frammenti guaiacilici. La PC2 è positivamente correlata alla intensità dei frammenti polisaccaridici, perciò indica il livello di degrado del legno sulla base del contenuto di cellulosa ed emicellulosa.

Py-GC/MS. Una complessa miscela di prodotti fenolici, diagnostica per le differenti unità costitutive, viene prodotta durante la pirolisi di lignina ed analizzata tramite GC/MS. La lignina di tipo *softwood* è caratterizzata dalla presenza di soli composti di tipo guaiacilico, mentre la presenza tra i prodotti di pirolisi dei composti sia di tipo guaiacilico che siringilico indica che la lignina appartiene alle angiosperme (*hardwood*). In particolare, il più abbondante prodotto di pirolisi della lignina di tipo *softwood* è l'alcool coniferilico, mentre nella lignina di tipo *hardwood* è presente anche il corrispondente prodotto a struttura siringilica, l'alcool sinapilico. Tali alcool a struttura cinnamlica sono presenti in due forme nelle condizioni di pirolisi-sililizzazione adottate, la forma bis-derivatizzata, dove sia il gruppo idrossile alcolico che quello fenolico risultano silanizzati, e la forma mono-derivatizzata, dove solo la funzionalità alcolica è stata derivatizzata.

Il confronto dei pirogrammi della lignina archeologica con quella estratta dal legno di riferimento mette in evidenza il buono stato di conservazione della lignina archeologica. La lignina archeologica proveniente dai tre campioni analizzati rispettivamente di pino, faggio e olmo produce prodotti di pirolisi analoghi a quelli osservati nella lignina estratta dal legno stagionato analizzata nelle stesse condizioni. La differenza tra lignina archeologica proveniente dal legno bagnato e quella proveniente da legno di riferimento si osserva nella quantità relativa dei prodotti (Figura 3 e Figura 4). La principale differenza osservata è la diversa resa di derivatizzazione delle funzionalità fenoliche degli alcool cinnamlici: nel pirogramma della lignina stagionata il rapporto tra la forma mono-TMS e bis-TMS dell'alcool coniferilico è intorno a 0,8, mentre nella lignina di provenienza archeologica il rapporto tra le due forme è nettamente differente: 0,24.

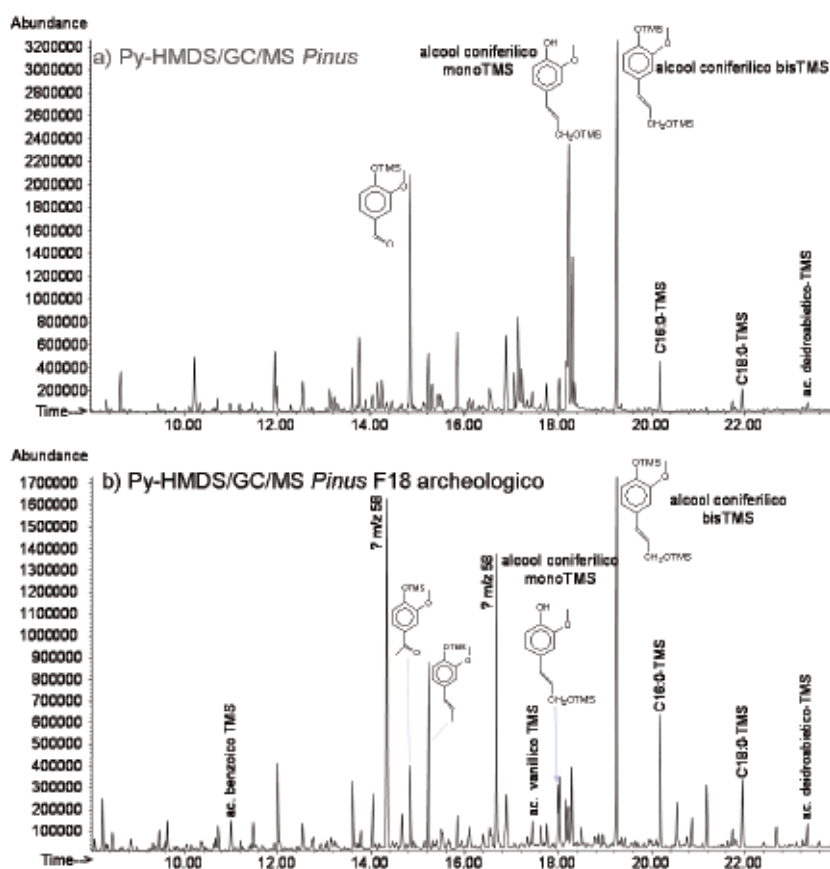


Figura 3. Pirogramma ottenuto mediante Py(HMDS)-GC/MS della lignina estratta da a) legno di pino di riferimento (*Pinus pinaster*) e b) legno di pino archeologico dal sito di San Rossore. archaeological pine wood.

È evidente che nella pirolisi-GC/MS della lignina archeologica in presenza di esametildisilazano si ha un aumento della resa di derivatizzazione dei gruppi fenolici rispetto alla lignina estratta dal legno di riferimento corrispondente. La stessa tendenza si osserva nel caso della pirolisi della lignina estratta dal legno di faggio e di olmo archeologico rispetto alla corrispondente lignina di riferimento. Nel caso della lignina di tipo *hardwood* si osserva lo stesso comportamento anche per l'alcool sinapilico (struttura siringilica).

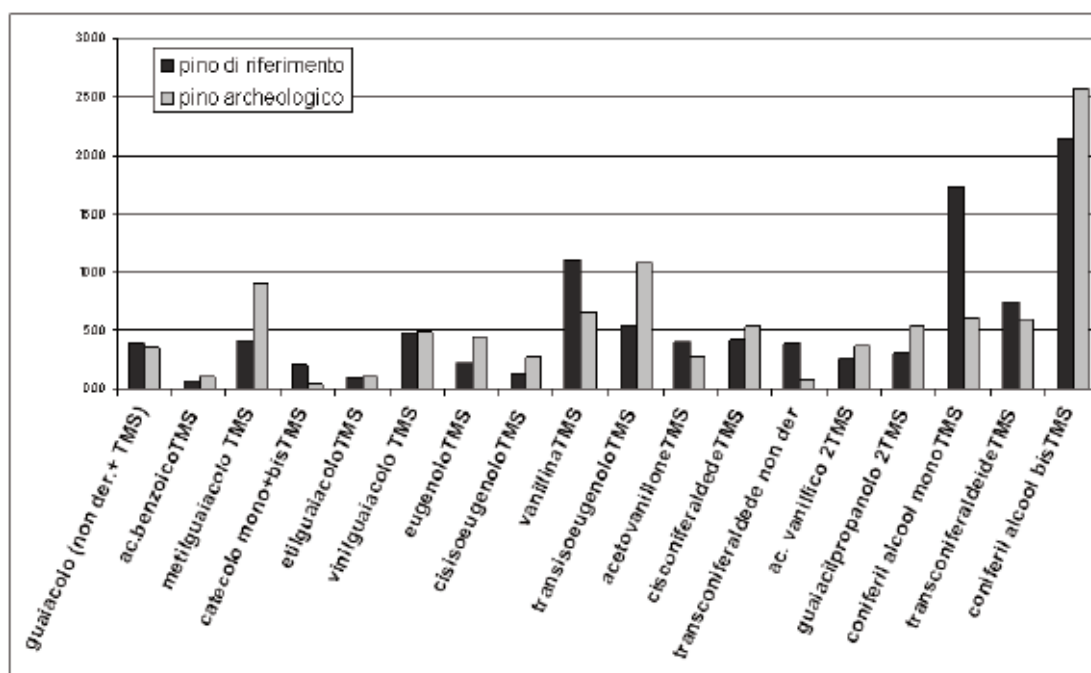


Figura 4. Profilo percentuale, basato sulle aree cromatografiche, dei prodotti di pirolisi identificati mediante analisi Py(HMDS)-GC/MS di lignina estratta da pino di riferimento e da pino archeologico F18.

Tale andamento si spiega con la relativa stabilità del legame etero fenolico rispetto al legame etero alchilico, che fa sì che i gruppi fenolici liberi delle unità fenilpropanoidi della lignina si derivatizzino con la resa alta durante la silanizzazione termicamente assistita, mentre i gruppi fenolici coinvolti in legami di tipo β -aril-etero o β -5 non reagiscono efficientemente con l'agente derivatizzante⁸. Questo mostra che la principale differenza tra la lignina archeologica e quella nativa è che la lignina archeologica contiene una maggiore concentrazione di gruppi fenolici liberi. Il degrado nell'ambiente acquatico conduce alla rottura di legami eteri fenolici, con aumento di fenoli liberi, e aumento della polarità e del carattere acido della macromolecola ligninica. La Py-GC/MS ha permesso inoltre di evidenziare la presenza di un incremento di funzionalità carbossiliche nella lignina archeologica, in particolare in posizione α rispetto all'anello aromatico, in tutti i campioni analizzati. La presenza di una aumentata concentrazione di funzionalità carbossiliche e fenoliche libere nella struttura della lignina va presa in considerazione in funzione delle possibili interazioni tra il legno bagnato e il materiale consolidante da utilizzare nel restauro.

Conclusioni

I risultati ottenuti mostrano che l'analisi DE-MS e la valutazione mediante PCA dei dati rappresenta un metodo di fingerprint veloce per lo screening, la valutazione e la comparazione di campioni di legno archeologico, che permette di avere indicazione del rapporto S/G e della perdita di polisaccaridi come effetto di degrado nell'ambiente acquatico. Ulteriori studi sono in corso, che prenderanno in considerazione un maggiore numero di campioni archeologici.

I risultati ottenuti tramite Py-GC/MS con HMDS come agente derivatizzante *in situ* mostrano che questa tecnica è utile per delucidare le modificazioni chimiche avvenute nella struttura della lignina in oggetti archeologici. In particolare, la lignina proveniente dai campioni di legno bagnato dal sito di San Rossore ha mostrato di aver subito rottura di legami etero-fenolici con formazione dei gruppi fenolici liberi e con ossidazione e formazione dei gruppi carbossilici.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la Dott.ssa G. Giachi (Soprintendenza Archeologica della Toscana, Firenze), la Prof. I.D. Donato (Università di Palermo) e il Prof. M. Orlandi (Università di Milano Bicocca) per avere messo a disposizione i campioni e per la preziosa collaborazione. Il supporto economico alla ricerca è stato fornito dalla Soprintendenza Archeologica Toscana e dai fondi MIUR, PRIN Cofin05.

Bibliografia

- BLANCHETTE 2000: A.R. Blanchette, *A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments*, in *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 2000, pp. 189-204
- COLOMBINI et al. 2007: M.P. Colombini, M. Orlandi, F. Modugno, E.L. Tolppa, M. Sardelli, L. Zoia, C. Crestini, *Archaeological wood characterisation by PY/GC/MS, GC/MS, NMR and GPC techniques*, in *Microchemical Journal* 85, 2007, pp. 164-173
- DANIEL, NILSSON, SINGH 1987: F.G. Daniel, T. Nilsson, A.P.Singh, *Degradation of lignocellulosics by unique tunnel-forming bacteria*, in *Canadian Journal of Microbiology* 33, 1987, pp. 943-948
- HOFFMANN & JONES 1990: P. Hoffmann, M.A. Jones, *Structure and degradation processes for waterlogged archaeological wood*, in Rawell R. M., Barbour R. J. (Eds.), *Archaeological Wood, Chemistry, Properties and Preservation, Advances*, Chemical Series 225, American Chemical Society, Washington, 1990, pp. 35-65
- HOLMBOM & STENIUS 2000: B. Holmbom, P. Stenius, *Analytical methods (Series editors), Papermaking Science and Technology*, Book 3, in P. Stenius(ed.), *Forest Products Chemistry*, Tappi Press, Atlanta, 2000, pp. 105-169
- KURODA 2000: K. Kuroda, *Pyrolysis-trimethylsilylation analysis of lignin: preferential formation of cinnamyl alcohol derivatives*, in *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 56, 2000, pp. 79-87
- MODUGNO, RIBECHINI, COLOMBINI 2006: F. Modugno, E. Ribechini, M.P. Colombini, *Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by mean of direct exposure electron ionization mass spectrometry (DE-MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS)*, in *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2006, pp. 1787-1800
- MODUGNO et al. 2008: F. Modugno, E. Ribechini, M. Calderisi, G. Giachi, M. P. Colombini, *Analysis of lignin from archaeological waterlogged wood by direct exposure mass spectrometry (DE-MS) and PCA evaluation of mass spectral data*, submitted to *Microchemical Journal* 88, 2008, pp. 186-193
- SAIZ-JIMENEZ et al. 1987: C. Saiz-Jimenez, J.J. Boon, J.I. Hedges, J.K.C. Hessels, J.W. De Leeuw, *Chemical characterisation of recent and buried wood by analytical pyrolysis. Comparison of pyrolysis data with ¹³C NMR and wet chemical data*, in *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 11, 1987, pp. 437-450
- SAIZ-JIMENEZ & DE LEEUW 1984: C. Saiz-Jimenez, J.W. de Leeuw, *Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of isolated, synthetic and degraded lignins*, in *Organic Geochemistry* 6, 1984, pp. 417-422
- VAN BERGEN et al. 2000: P.F. van Bergen, I. Poole, T.M.A. Ogilvie, C. Caple, R.P. Evershed, *Evidence for demethylation of syringyl moieties in archaeological wood using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry*, in *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 2000, pp. 71-79

Note

- 1 HOFFMANN & JONES 1990; BLANCHETTE 2000
- 2 GEOFFREY et al. 1987
- 3 SAIZ-JIMENEZ et al. 1987; MODUGNO et al. 2006
- 4 SAIZ-JIMENEZ & DE LEEUW 1984; VAN BERGEN et al. 2000
- 5 COLOMBINI et al. 2007
- 6 HOLMBOM & STENIUS 2000
- 7 MODUGNO et al. 2008
- 8 KURODA 2000