



Università degli studi di Padova

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

**Messa a punto di tecniche Raman, SERS e IR per la
caratterizzazione di residui organici su reperti archeologici**

Relatore:

Prof. A. Zoleo

Controrelatore:

Prof. A. Moretto

Candidato:

Dario De Nicola

Anno Accademico 2022-2023

Sommario

Abstract.....	5
Introduzione.....	6
Introduzione teorica alla spettroscopia IR e alle tecniche Raman e SERS.....	8
Spettroscopia nell'infrarosso (IR).....	8
Problema vibrazionale.....	8
Tipi di vibrazioni.....	12
Lettura di uno spettro IR.....	12
Spettroscopia in riflessione.....	14
Riflessione interna totale attenuata (ATR).....	14
Strumentazione.....	16
Tecnica Raman.....	18
Strumentazione impiegata nella spettroscopia Raman.....	21
Micro-Raman.....	21
Effetto SERS: cenni teorici.....	23
Materiali e metodi sperimentali.....	25
Filtri in fibra di vetro Vycor.....	25
Cocci a perdere.....	26
Caratteristiche chimiche dell'olio e del vino.....	28
Composizione chimica dell'olio d'oliva.....	28
Composizione chimica del vino.....	29
Soluzioni e solventi.....	32
Preparazione dei campioni per le misure SERS.....	33
Procedura di acquisizione spettri Raman/SERS.....	34
Procedura di acquisizione spettri IR.....	35
Elaborazione dei dati.....	35
Risultati sperimentali.....	36
1 Indagine IR.....	36
1.1 Campioni preparati su filtri Vycor.....	36
1.1.1 Filtro Vycor non trattato.....	36
1.1.2 Campione Vycor 1 (filtro Vycor con olio).....	37
1.1.3 Campione Vycor 3 (filtro Vycor con olio invecchiato).....	38
1.1.4 Campione Vycor 5 (filtro Vycor con vino).....	41

1.1.5 Campione Vycor 7 (filtro Vycor con vino invecchiato)	42
1.2 Cocci a perdere.....	43
Caratterizzazione preliminare dei cocci senza trattamento.....	43
1.2.1 Campioni 1I e 1E, prima del trattamento	45
1.2.2 Campioni 2I e 2E, prima del trattamento	46
1.2.3 Campioni 3I e 3E, prima del trattamento	47
1.3 Caratterizzazione dei campioni trattati	48
1.3.1 Campioni 1E e 2I	48
1.3.2 Campioni 3I e 4E	50
1.3.3 Campioni 5I e 6E	51
1.3.4 Campioni 7I e 8E	53
2 Indagine micro-FTIR.....	54
2.1 Campioni 1E e 2I	54
2.2 Campioni 3I e 4E	56
2.3 Campioni 5I e 6E	57
2.4 Campioni 7I e 8E	59
3. Indagine Raman	61
3.1 Raman portatile.....	61
Riferimenti 3.1.1.....	61
3.1.1.1 Campione filtro Vycor, non trattato	61
3.1.1.2 Campione Olio	63
3.1.1.3 Campione Vino.....	64
3.1.2 Spettri campioni Vycor	65
3.1.2.1 Campione Vycor 1 (Olio).....	65
3.1.2.2 Campione Vycor 2 (Olio).....	67
3.1.2.3 Campione Vycor 3 (Olio invecchiato)	68
3.1.2.4 Campione Vycor 4 (Olio invecchiato)	69
3.1.2.5 Campione Vycor 5 (Vino)	70
3.1.2.6 Campione Vycor 6 (Vino)	71
3.1.2.7 Campione Vycor 7 (Vino invecchiato)	72
3.1.2.8 Campione Vycor 8 (Vino Invecchiato)	73
3.1.3 Trattamenti alternativi Vycor	75
3.1.3.1 Campione Vycor 1 (Olio + Acetone)	75
3.1.3.2 Polvere del campione Vycor 1 (Olio + Acetone).....	76

3.1.3.3 Campione Vycor 1 e 2 (Olio + Acetone e Olio + Esano) polvere su alluminio	77
3.1.4 Spettri “Cocci a perdere”	78
3.1.4.1 Sample 2	78
3.1.4.2 Sample 5	79
3.2 Raman fisso	82
3.2.1 Riferimento Olio	83
3.2.2 Campioni preparati su filtri Vycor	84
3.2.3 Cocci a perdere	87
3.3 Indagine SERS	91
Discussione	94
Analisi ATR-IR dei campioni su Vycor	95
Analisi ATR-IR dei campioni su coccio	96
Analisi micro-FTIR dei campioni su coccio	97
Analisi Raman fisso campioni Vycor e cocci a perdere	98
Analisi Raman portatile campioni Vycor e cocci a perdere	99
Analisi SERS dei campioni Vycor	99
Conclusioni	100
APPENDICE	101
Bibliografia	107

Abstract

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è lo sviluppo di una metodologia ottimizzata per l'analisi di residui organici su manufatti archeologici, attraverso l'utilizzo di tecniche spettroscopiche specifiche come micro-FTIR, ATR, Raman, e tecniche mai utilizzate su questi reperti, quali il SERS. La finalità della ricerca è quella di fornire un metodo combinato e affidabile per l'analisi preliminare, non invasiva o minimamente invasiva ("prescreening"), di residui organici su reperti antichi. Per testare l'efficacia della metodologia sviluppata, la ricerca ha utilizzato modelli simulativi in vetro di materiali porosi e successivamente ha applicato le stesse tecniche di preparazione e analisi a cocci a perdere di anfore fenicie provenienti dal sito archeologico della necropoli di Nora. Obiettivo finale del lavoro, successivo al lavoro di tesi, sarà l'applicazione di questa metodica ottimizzata all'indagine dei residui organici potenzialmente presenti in vasellame del medesimo sito archeologico di Nora, al fine di chiarire la destinazione d'uso di questi manufatti.

Introduzione

Pausania, storico greco risalente al II secolo d.C. attribuiva la fondazione della città di Nora al personaggio mitologico Norace, da cui prende il nome. In realtà, la frequentazione umana del promontorio del Capo di Pula, che ha portato poi alla nascita della città, risale al periodo nuragico (1400-1100 a.C.). In seguito, nei primi decenni dell'VIII secolo a.C., il promontorio era frequentato da navigatori e mercanti levantini, principalmente di origine fenicia, dai quali veniva utilizzato come scalo stagionale per i traffici con le comunità indigene sarde, trasformandosi pian piano in un insediamento stabile. La maggior parte delle testimonianze di questo periodo non provengono da siti urbani, bensì dalla necropoli localizzata sull'istmo della penisola. La necropoli occidentale in questione ha portato alla luce sepolture risalenti alla prima metà del VII secolo a.C., le quali erano destinate ad accogliere i resti bruciati dei defunti che venivano deposti all'interno di semplici fosse di piccole dimensioni. Il rituale funebre fenicio prevedeva la deposizione di vari oggetti, tra cui boccali e brocche della tipologia di "brocca trilobata" e "brocca con orlo a fungo", elementi ricorrenti in coppia molto spesso in diverse tombe. Si ritiene che questi contenitori contenessero olii, vino e unguenti, ma è importante notare che la loro presenza non è costante. Ci sono svariate ipotesi sul motivo per cui oggetti si trovino in alcune tombe e non in altre, come la presenza di individui non ancora adulti o particolari pratiche funerarie. In particolare, le brocche rituali sembrano mancare più spesso nelle tombe infantili rispetto a quelle degli adulti (J.Bonetto, 2018). Gli studi sulla necropoli fenicia offrono importanti informazioni sulle pratiche funerarie e le credenze religiose, ma richiedono un'analisi attenta dei contesti archeologici e delle fonti storiche per capire appieno la complessità dei rituali. In questo ambito, l'analisi chimica dei residui organici nelle anfore rappresenta un valido mezzo per risalire al possibile contenuto, e quindi all'utilizzo che ne si faceva, in modo poter confermare o smentire, le ipotesi archeologiche fatte finora. Questo è l'obiettivo finale che si intende perseguire in questo progetto di tesi, cominciando dallo sviluppo e messa a punto di una metodologia efficace per l'analisi preliminare ("prescreening") di residui organici su reperti archeologici. Normalmente, nel campo dei beni culturali le tecniche analitiche maggiormente utilizzate per la caratterizzazione di residui organici sono, HPLC-MS e GC-MS, data la loro capacità di analizzare quantità minime di residui organici su piccoli prelievi di materiale archeologico (White, 1987). Tuttavia, queste tecniche sono intrinsecamente distruttive e richiedono di norma lunghi tempi di preparazione del campione. Tecniche preliminari di caratterizzazione non distruttiva dei residui rappresentano quindi un valido supporto per successive analisi approfondite:

pertanto, analisi spettroscopiche quali l'infrarosso (IR) in modalità ATR (riflessione totale attenuata), il micro-FTIR, o il Raman, sono ampiamente impiegate nell'analisi dei materiali organici e inorganici (Michele R. Derrick, 1999) (Artioli, 2010) . In campo archeologico, l'analisi IR è stata adottata principalmente per l'identificazione delle sostanze organiche; tuttavia, si tratta di una metodica non sufficiente per la caratterizzazione completa dei materiali, dal momento che essa fallisce qualora il materiale sia presente in traccia e nel caso in cui sussistano interferenze particolarmente pesanti da parte della matrice. La spettroscopia Raman è una tecnica di analisi complementare alla spettroscopia nell'infrarosso. Questa tecnica è stata utilizzata anche all'interno del campo di studi preso in considerazione. Si tratta di una metodica estremamente versatile, poiché è in grado di analizzare campioni di qualsiasi forma e dimensione, con elevata risoluzione spaziale potendosi focalizzare su aree di dimensione micrometrica. Inoltre, è possibile attualmente disporre di strumenti micro-Raman portatili, con possibilità di utilizzo direttamente *in situ*, il che è un grande vantaggio nell'ambito dei beni culturali. Infine, tale analisi permette di norma un'identificazione affidabile dei materiali indagati. Tuttavia, uno dei principali problemi dell'analisi Raman di composti organici nei beni culturali è la frequente presenza di loro prodotti di degrado, che risultano spesso fluorescenti: la fluorescenza copre completamente i deboli segnali Raman, impedendo l'identificazione dei materiali. Si può ovviare a questo problema facendo ricorso al SERS (Surface Enhanced Raman Scattering), una tecnica innovativa in questo campo, molto interessante per la capacità di abbattere la fluorescenza e amplificare i segnali Raman.

Introduzione teorica alla spettroscopia IR e alle tecniche Raman e SERS

Spettroscopia nell'infrarosso (IR)

Le spettroscopie si basano sullo studio delle interazioni tra la radiazione elettromagnetica e la materia. Le spettroscopie vengono distinte in: ottiche (interazione tra il campo elettrico della r.e.m. e proprietà elettriche della materia) e magnetiche (interazione tra il campo magnetico della r.e.m. e proprietà magnetiche della materia). La spettroscopia infrarossa (IR) è una spettroscopia di assorbimento ottica che si basa sull'impiego di radiazione con lunghezze d'onda fra 3 e 30 μm (medio infrarosso).

L'analisi spettroscopica IR consente di determinare le vibrazioni molecolari che caratterizzano una determinata sostanza, fornendo così una mappatura precisa delle sue componenti chimiche. Tale approccio si rivela estremamente utile in numerosi campi applicativi, tra cui la chimica, la biologia, la farmacologia e la scienza dei materiali, nonché l'ambito della diagnostica nei beni culturali.

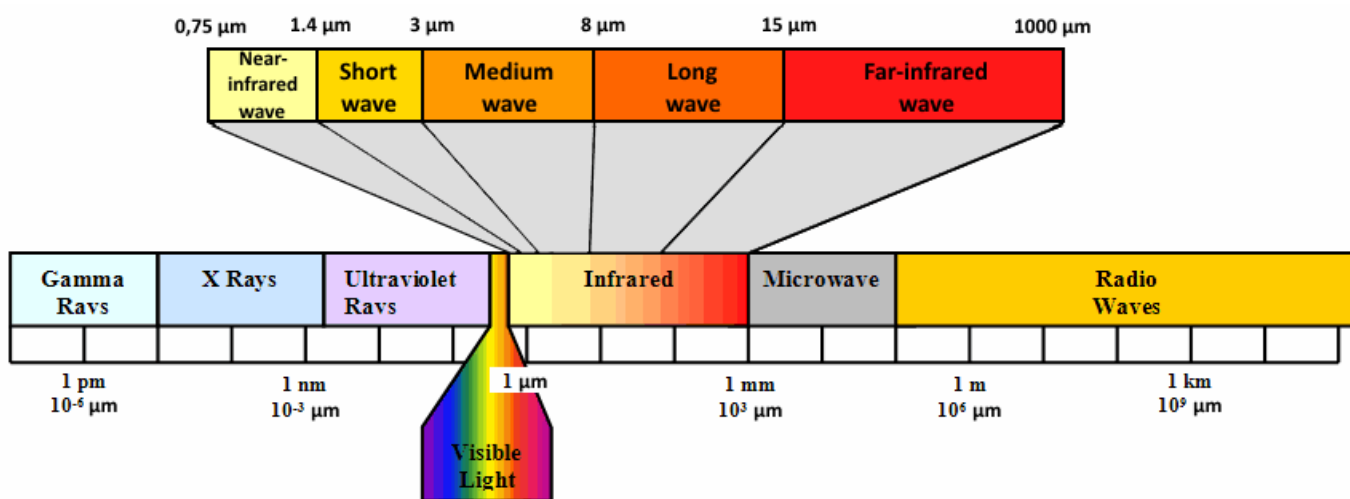


Figura 1 Spettro elettromagnetico con divisione delle lunghezze d'onda

Problema vibrazionale

L'assorbimento di un fotone infrarosso da parte di una molecola induce una transizione dal suo stato vibrazionale fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato. Tale fenomeno può essere descritto

teoricamente mediante un modello che rappresenta il sistema in questione come un oscillatore armonico. In questo modello, l'energia potenziale molecolare è l'autovalore dell'hamiltoniano elettronico molecolare nel limite di approssimazione di Born-Oppenheimer.

Indicando con x una coordinata vibrazionale (che nel caso di una molecola biatomica è la distanza tra i nuclei), l'energia potenziale può essere espansa in serie di Taylor rispetto a x intorno alla posizione di equilibrio ($x=0$):

$$V(x) = V_0 + \frac{1}{1!} \left(\frac{\delta V(x)}{\delta x} \right)_0 x + \frac{1}{2!} \left(\frac{\delta^2 V(x)}{\delta x^2} \right)_0 x^2$$

Quando il sistema si discosta poco dalla posizione di equilibrio, siamo in condizioni di approssimazione armonica, possiamo trascurare i termini di ordine superiore al secondo, e la serie si riduce all'espressione della legge di Hooke:

$$V(x) = V_0 + \frac{1}{2!} \left(\frac{\delta^2 V(x)}{\delta x^2} \right)_0 x^2 = \frac{1}{2} k x^2$$

Dove abbiamo posto $V_0=0$ (data l'arbitrarietà del punto zero del potenziale) e k è la costante di forza del legame. L'equazione di Schrödinger in approssimazione armonica può essere risolta esattamente e le autoenergie dell'oscillatore armonico valgono:

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2} \right) \hbar \omega \quad v = 0, 1, 2, 3 \dots \text{numero quantico vibrazionale}$$

ω è la frequenza vibrazionale classica della molecola ed è funzione della costante di forza del legame (k) e della massa ridotta (μ):

$$\omega = 2\pi\nu = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad \omega [s^{-1}]$$

La frequenza vibrazionale normalmente viene riportata in numeri d'onda:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{\omega}{2\pi c} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \tilde{\nu} [cm^{-1}]$$

Poiché le energie vibrazionali sono solitamente molto maggiori del quanto termico, la maggior parte delle molecole a temperatura ambiente si troverà nello stato vibrazionale fondamentale, cioè quello con $v = 0$, possedendo l'energia di punto zero:

$$E_0 = \frac{1}{2} \hbar \omega$$

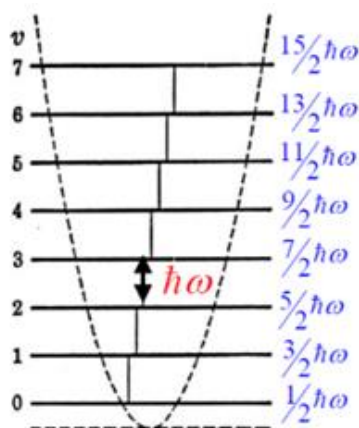


Figura 2 Livelli vibrazionali

In una molecola poliatomiche, $3N$ coordinate sono necessarie per specificare la posizione degli N nuclei rispetto ad un sistema di riferimento fisso di laboratorio. Tre di queste servono a determinare la posizione del centro di massa, quindi, descrivono la traslazione della molecola nello spazio, mentre 3 (per molecole lineari 2) coordinate angolari (angoli di Eulero) servono ad individuare l'orientazione della molecola nello spazio e quindi descrivono le rotazioni. Pertanto, le coordinate che descrivono il moto complessivo della molecola (traslazionali e rotazionali) sono 5 per molecole lineari e 6 per molecole non lineari. Le restanti $3N-6$ (o $3N-5$, per molecole lineari) coordinate sono correlate alle distanze di legame e agli angoli di legame (coordinate interne), e descrivono quindi le vibrazioni della molecola. Quando in una vibrazione cambia una delle coordinate interne, anche le altre, in generale cambiano. Esistono tuttavia delle combinazioni lineari delle coordinate interne di tutta la molecola che sono indipendenti fra loro (**modi normali di vibrazione**), cioè tali per cui l'eccitazione di un modo vibrazionale normale non cambia gli altri modi normali. Tipicamente, un moto vibrazionale normale coinvolge uno spostamento di tutti gli atomi della molecola, con la medesima frequenza (frequenza del modo normale). Dato che dalla combinazione lineare di n coordinate interne si ottengono n modi normali di vibrazione, anche i modi vibrazionali normali di una molecola sono dati dalle formule $3N-6$ (o $3N-5$ per molecole lineari).

Per portare una molecola negli stati vibrazionali eccitati è necessario irraggiarla con radiazione IR, e le diverse bande IR corrispondono a diversi tipi di transizioni vibrazionali, come mostrato in tabella:

Nome	Acronimo	Numero d'onda (cm ⁻¹)	Range lambda	Transizioni
FAR-IR	FIR	10-400	1mm-25 μm	Fondamentali intermolecolari, reticolari
Mid-NIR	MIR	400-4000	25 μm-2.5 μm	Fondamentali intramolecolari
Near-NIR	NIR	4000-12800	2.5 μm-780nm	Overtone, combinazioni

In approssimazione armonica, le regole di selezione stabiliscono che la r.e.m. IR può indurre, in una molecola una transizione fra due livelli vibrazionali, se quel modo normale di vibrazione implica una variazione del momento di dipolo elettrico della molecola, con il numero quantico vibrazionale che deve variare di un'unità:

$$\left(\frac{\delta d\boldsymbol{\mu}^{\vec{r}}}{\delta x}\right) \neq 0; \Delta v = \pm 1 \text{ (vale in approssimazione armonica)}$$

Matematicamente, questo si traduce nel fatto che la derivata prima del momento di dipolo elettrico della molecola ($\boldsymbol{\mu}^{\vec{r}}$), rispetto alla coordinata normale vibrazionale (\mathbf{x}), calcolata nella posizione di equilibrio ($\mathbf{x}=\mathbf{0}$) deve essere diversa da 0.

Si deve notare che la regola di selezione $\Delta v = \pm 1$ vale solo per potenziali armonici, ma nella realtà vi sono leggere deviazioni dall'armonicità, che causano la comparsa di transizioni debolmente permesse con $\Delta v = \pm 2, \pm 3 \dots$, dette *overtone*.

Considerando un modello reale, dove il potenziale non è puramente armonico, possono esserci tre tipi di transizioni vibrazionali: transizioni fondamentali ($\Delta v = \pm 1$), con frequenza caratteristica del modo normale vibrazione; transizioni di overtone, più deboli, con frequenza doppia o tripla rispetto ad un modo normale di vibrazione; transizioni di combinazione, con frequenza pari alla somma di frequenze di modi normali.

Tipi di vibrazioni

Nella spettroscopia infrarossa si è soliti classificare il tipo di vibrazioni che danno origine allo spettro in vibrazioni di stiramento del legame chimico (*stretching*) e di deformazione dell'angolo di legame (*bending*). Lo stiramento consiste in una variazione periodica della distanza interatomica e può essere *simmetrico* se i due atomi si avvicinano o allontanano contemporaneamente (indicato con ν_s) o *asimmetrico* nel caso contrario (indicato con ν_a). Anche la deformazione può essere simmetrica o asimmetrica e può avvenire lungo il piano su cui giace l'angolo di legame o fuori da tale piano. La deformazione simmetrica nel piano è detta *scissoring* (apertura e chiusura di una forbice, indicata con δ), mentre quella asimmetrica è chiamata *rocking* (oscillazione, indicata con ρ); la deformazione asimmetrica fuori dal piano è detta *twisting* (torsione, indicata con τ) mentre quella simmetrica fuori dal piano è chiamata *wagging* (agitamento, indicata con la lettera w).

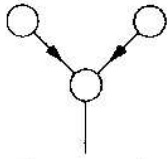
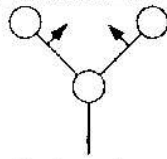
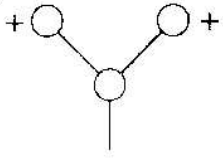
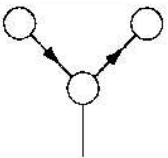
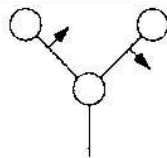
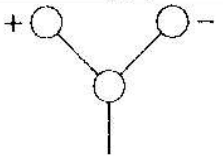
Stretching	Bending	
 Symmetric	 Scissoring	 Wagging
 Asymmetric	 Rocking	 Twisting

Figura 3 Modi di vibrazione delle molecole

Letture di uno spettro IR

In un tipico spettro infrarosso in ascissa troviamo una scala di frequenze normalmente espresse in numero d'onda $\hat{\nu}$ e con unità di misura il cm^{-1} e in ordinata la percentuale di radiazione trasmessa, detta trasmittanza, oppure il suo logaritmo in base 10, detta assorbanza.

Si può suddividere lo spettro in tre diverse zone:

zona dei gruppi funzionali: si estende da 3800 a 1300 cm^{-1} e comprende bande dovute sia a stiramenti che a deformazioni di gruppi funzionali (per esempio legami N-H, O-H, C-H, C=C, C=O, N=O, ecc.), con questi ultimi compresi tra 1600 e 1300 cm^{-1} . È da notare che le vibrazioni di stiramento che coinvolgono atomi di idrogeno si trovano a frequenze molto alte per via della massa molto ridotta di quest'atomo;

zona dell'impronta digitale: da 1300 a 650 cm^{-1} , che deve il suo nome alla presenza di bande strettamente caratteristiche di ciascuna singola molecola, in quanto originate da vibrazioni corali dell'intero scheletro molecolare;

zona del lontano IR: si estende da 650 a 200 cm^{-1} e presenta bande dovute a stiramenti di atomi pesanti, deformazioni di gruppi privi di idrogeno e vibrazioni di scheletro.

I picchi risultanti si distinguono fra *stretti* e *ampi* (picchi ampi sono spesso indicati come bande). Le bande risultano spesso dall'involuppo di picchi relativi a gruppi funzionali con frequenze leggermente differenti per via di ambienti chimici differenti in cui questi gruppi si trovano (notevole il caso dello stiramento del gruppo OH che produce spesso una banda fra 3000-3500 cm^{-1} dovuta al differente network di legami a idrogeno che ogni gruppo OH può sperimentare).

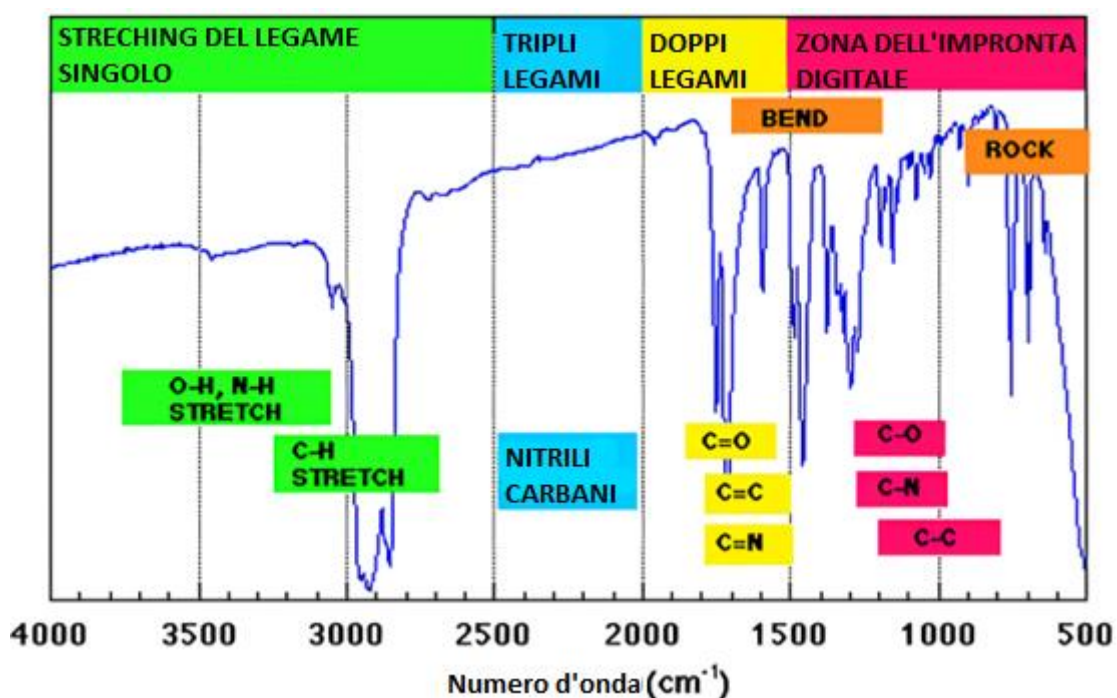


Figura 4 Tipico spettro infrarosso

Dallo spettro infrarosso è possibile trarre utili informazioni per il riconoscimento di una molecola incognita. A tal proposito, al fine di associare un legame a un dato numero d'onda, si utilizzano apposite tavole riportate in letteratura o librerie elettroniche incluse nel software della strumentazione.

Spettroscopia in riflessione

Alcuni campioni sono troppo massivi per essere analizzati in trasmissione; perciò, si ricorre alle *tecniche spettroscopiche in riflessione*, in cui si misura la *riflettanza*, cioè il rapporto fra l'*intensità della radiazione diffusa* e l'*intensità della radiazione incidente*:

$$R(\omega) = \frac{I_r(\omega)}{I_i(\omega)} \quad 0 \leq R(\omega) \leq 1$$

Si verifica quando un fascio propaga da un mezzo 1, con indice di rifrazione n_1 , ad un mezzo 2, con indice di rifrazione differente n_2 . La radiazione incidente può essere riflessa dalla superficie in modo diffuso o in modo speculare. Perché si verifichi la riflessione speculare, la rugosità del materiale (r) deve essere molto minore della lunghezza d'onda della radiazione incidente:

$$r \ll \lambda$$

Viceversa, se la rugosità media è maggiore, domina la riflessione diffusa ("scattering"). Se entrambi i mezzi sono trasparenti alla radiazione considerata (nessun assorbimento), allora all'interfaccia tra i due mezzi la radiazione subisce in parte riflessione (diffusa o speculare, o entrambe) e in parte è trasmessa dal mezzo 1 al mezzo 2: se il raggio incidente forma un angolo θ con la normale alla superficie di separazione fra i due mezzi, nel passare dal mezzo 1 al mezzo 2 il raggio subisce rifrazione, cioè l'angolo del raggio trasmesso formerà un angolo con la normale $\vartheta_t < \vartheta_i$ se si ha $n_2 > n_1$

Riflessione interna totale attenuata (ATR)

Se invece un fascio di radiazione si propaga da un mezzo 1 ad un mezzo 2 con $n_1 > n_2$, dove quindi la radiazione passa da un mezzo denso ad uno meno denso, dalla legge di Snell risulta in questo caso che $\vartheta_t > \vartheta_i$: quindi, man mano che l'angolo di incidenza del fascio cresce, il fascio trasmesso si avvicina alla linea di separazione fra i due mezzi (cioè, $\theta_t \rightarrow 90^\circ$) e via via l'intensità del fascio riflesso aumenta. Quando $\theta_t = 90^\circ$ l'angolo di incidenza raggiunge il valore dell'angolo di incidenza critico θ_c , pari a:

$$\vartheta_c = \arcsin \theta_t \frac{n_2}{n_1}$$

Quando $\theta_i > \theta_c$ non si ha più trasmissione della radiazione nel mezzo 2 e tutta la radiazione viene riflessa nel mezzo 1, si ha, cioè, il fenomeno della *riflessione interna totale*, molto importante per la trasmissione di segnali ottici in fibra. Quando si è in condizioni di riflessione totale e il mezzo 2 ha proprietà assorbitive, si osserva un'attenuazione della radiazione riflessa: si è quindi nella condizione di *riflessione totale attenuata* (ATR). Infatti, si verifica che anche in condizioni di riflessione totale, data la natura ondulatoria della radiazione, il campo elettromagnetico incidente riesce a sconfinare, in una certa misura, nel mezzo 2, con un fronte d'onda evanescente. Quindi in condizioni di riflessione totale, il campo e.m. nel mezzo 2 non è effettivamente nullo, in quanto le condizioni al contorno impongono la continuità del campo e.m. nella zona di separazione tra i due mezzi. In base alla teoria elettromagnetica, il campo elettrico nel mezzo 2 è pari a:

$$\vec{E}(x, z, t) = E_0 \vec{e}_x \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} n_1 x \sin \theta_i - \omega t\right) \cdot e^{-\frac{2\pi}{\lambda} n_1 z \left[\sin^2 \theta_i - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}}$$

Si tratta di un'onda non omogenea propagante lungo x (direzione parallela alla superficie di separazione), che decade esponenzialmente lungo z (quando, cioè, si allontana dalla superficie di separazione dei due mezzi). L'ampiezza del campo e.m. decresce molto rapidamente procedendo lungo z; perciò, la profondità di penetrazione è nell'ordine della lunghezza d'onda λ . L'onda percorre un cammino parabolico all'interno del mezzo 2 ed esce in un punto non esattamente coincidente con quello d'entrata. Se ci sono delle risonanze nel mezzo 2, può esserci assorbimento, con relativa diminuzione dell'intensità rispetto alla radiazione incidente (riflessione totale attenuata). La profondità di penetrazione è definita come la profondità lungo z alla quale il campo elettrico viene abbattuto di un fattore 1/e:

$$d_p = \frac{\frac{\lambda}{n_1}}{2\pi \left[\sin^2 \theta_i - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}}$$

La *profondità di penetrazione* (d_p) dipende dalla λ della radiazione elettromagnetica e dall'angolo di incidenza. La profondità di penetrazione effettiva è comunque pari a circa: $d_e \approx 3d_p$. Possono quindi essere svolti esperimenti ATR ad angolo variabile, in modo tale da poter campionare il materiale a profondità diverse. Solitamente per le sonde ATR si utilizzano cristalli trapezoidali di diamante ($n \approx 2.4$) o germanio ($n \approx 4$).

La quantità considerata negli spettri in ATR è la grandezza adimensionale *riflettanza*, che è assimilabile alla trasmittanza, mentre il cologaritmo in base 10 della riflettanza, chiamato *pseudoassorbanza*, è assimilabile all'assorbanza.

La tecnica ATR si presta molto bene alla misurazione di spettri di campioni spessi e opachi, che non possono essere macinati a formare pastiglie di KBr, o disciolti in solvente, e quindi non esaminabili con tecniche IR in trasmissione. I campioni nei beni culturali rientrano tipicamente in questa tipologia. La profondità di penetrazione ATR dipende dalla λ della radiazione incidente, perciò campionando uno spettro, tipicamente tra 400-4000 cm^{-1} , la profondità di penetrazione diminuisce di un ordine di grandezza, modificando anche le assorbanze, e falsando quindi le intensità relative. È d'uso quindi rinormalizzare la dipendenza della profondità di penetrazione dalla λ , riportando gli spettri in assorbanza ATR:

$$A(\tilde{\nu}) = -\log R_{ATR}(\tilde{\nu}) = -\log \frac{I_r(\omega)}{I_i(\omega)} \rightarrow A_{ATR}(\tilde{\nu}) = A(\tilde{\nu}) \frac{\tilde{\nu}}{1000}$$

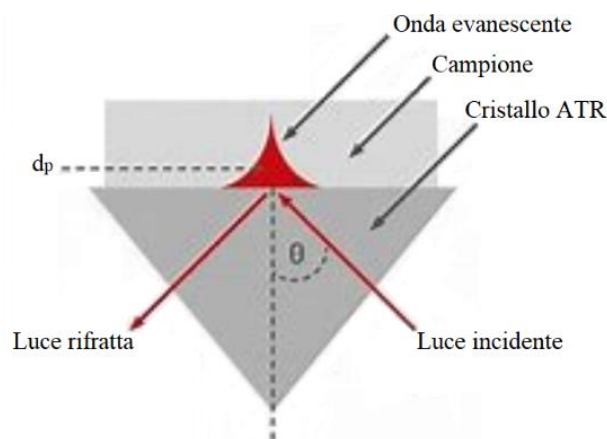


Figura 5 Riflessione totale interna

Strumentazione

Un classico spettrofotometro IR è essenzialmente composto da una sorgente infrarossa il cui fascio di radiazione viene indirizzato verso il campione ed il riferimento. Le sorgenti IR comunemente utilizzate sono del tipo a incandescenza, cioè filamenti di Nerst costituiti da ossidi sinterizzati, o lampade global, formate da bacchette di carburo di silicio (SiC) riscaldato a 800-900 K, con picco di emissione a 2000 cm^{-1} , mentre per il vicino infrarosso si utilizzano lampade a filamento al tungsteno o alogene. Posizionato successivamente vi è il monocromatore che ha la funzione di disperdere la radiazione elettromagnetica in un arco di cerchio per poter, attraverso una fenditura, selezionare le

lunghezze d'onda: i monocromatori possono essere prismi o reticoli di diffrazione. La fenditura seleziona la banda passante ($\lambda_0 \pm \Delta\lambda$). In seguito, un *chopper*, uno specchio semi discoidale rotante, sdoppia il raggio di luce, indirizzando al rivelatore in maniera alternata la radiazione proveniente dal campione e dal riferimento. La radiazione che arriva al rivelatore viene convertita in un segnale elettrico, che grazie ad un sistema di digitalizzazione ed elaborazione, sarà trasformato nello spettro infrarosso.

Gli strumenti moderni per spettroscopia IR utilizzano la *trasformata di Fourier* e montano un *interferometro di tipo Michelson* (FT-IR). La radiazione in arrivo dalla sorgente passa attraverso un beam splitter che nell'IR è un cristallo di KBr con coating di Germanio (Ge), con spessore adatto a riflettere il 50% della radiazione elettro-magnetica e trasmettere l'altro 50%. Il funzionamento è descritto nell'immagine seguente: la radiazione trasmessa arriva sullo specchio fisso M1 e viene riflessa indietro, mentre la radiazione che viene riflessa dal beam splitter arriva su uno specchio mobile M2 e viene riflessa indietro. Lo specchio M2 può muoversi avanti e indietro e in funzione del cammino ottico ($\Delta = x/2$) la radiazione ritorna al beam splitter percorrendo cammini ottici diversi, ed interferendo in modo costruttivo o distruttivo con la radiazione proveniente da M1. La radiazione elettromagnetica viene poi collimata e passa attraverso una fenditura. Tale effetto interferometrico causa un'oscillazione nell'intensità della radiazione IR in funzione del cammino ottico dello specchio mobile, secondo la relazione:

$$I(x) = \cos 2\pi \hat{\nu} x$$

dove x è il cammino ottico e $\hat{\nu}$ è il numero d'onda. Il grafico che si ottiene (intensità contro cammino ottico) è chiamato *interferogramma*. Applicando l'operazione matematica della trasformata di Fourier all'interferogramma $I(x)$ si recupera lo spettro IR del campione.

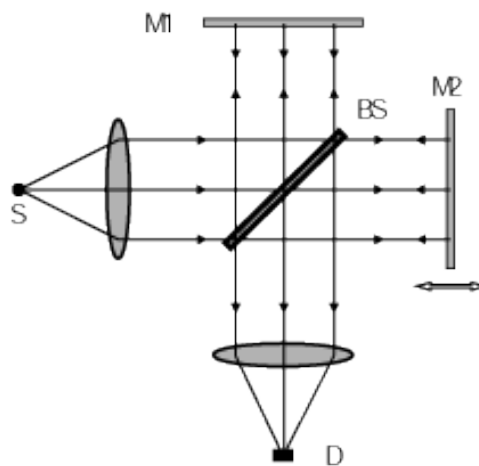


Figura 6 Interferometro di tipo Michelson

Nell'FT-IR si ha solo un canale (monoraggio), perciò si esegue prima una baseline, per misurare I_0 ed eventualmente correggendo per gli assorbimenti di H_2O e CO_2 atmosferiche. Gli strumenti FT-IR permettono di lavorare su tutta l'emissione della sorgente, aumentando di molti ordini di grandezza l'intensità del segnale, e sono perciò molto più sensibili, con un elevato rapporto segnale/rumore. Inoltre, permettono di acquisire l'intero spettro in una singola misurazione, e sono quindi molto più veloci degli strumenti dispersivi.

Attualmente, la maggior parte degli strumenti FT-IR monta un modulo esterno per le misure in ATR, mentre strumentazioni più costose sono equipaggiate con microscopi per effettuare misure IR in riflettanza esterna, senza necessità di contatto con il campione (microFTIR).

Tecnica Raman

La tecnica Raman è un metodo di indagine basato sulla diffusione anelastica della radiazione (effetto Raman). Questo fenomeno venne scoperto da Chandrasekhara Venkata Raman nel 1928. Nell'evento Raman, un fotone (di norma nell'UV, nel visibile o nel vicino infrarosso) incidente su un materiale induce una transizione elettronica di una molecola verso uno stato elettronico virtuale, dal quale la molecola torna rapidamente allo stato elettronico fondamentale. Se la molecola torna esattamente nel suo stato originale, la lunghezza d'onda del fotone emesso è uguale a quella del fotone incidente (diffusione elastica del fotone). Questo tipo di fenomeno di diffusione è noto come *diffusione di Rayleigh*. D'altra parte, è anche possibile che la molecola nello stato elettronico virtuale non torni esattamente allo stato originale, ma ricada in un livello vibrazionale eccitato dello stato elettronico fondamentale: in questo caso, il fotone emesso avrà energia leggermente inferiore al fotone incidente. Un numero molto limitato di molecole potrebbe trovarsi in uno stato vibrazionale eccitato (dello stato elettronico fondamentale) nel momento in cui il fotone induce la transizione allo stato virtuale: in questo caso, la molecola passa prima allo stato virtuale, per poi ricadere nello stato vibrazionale fondamentale dello stato elettronico fondamentale, emettendo un fotone di energia leggermente maggiore del fotone incidente. In entrambi i casi, il fotone emesso avrà energia diversa dal fotone incidente (scattering anelastico), e tale fenomeno è chiamato *effetto Raman*.

Più precisamente, se il fotone emesso ha un'energia inferiore a quella del fotone incidente, questo processo di scattering è noto come scattering *Stokes*. Quando invece il fotone emesso ha un'energia maggiore rispetto a quella del fotone incidente, si parla di scattering *anti-Stokes*.

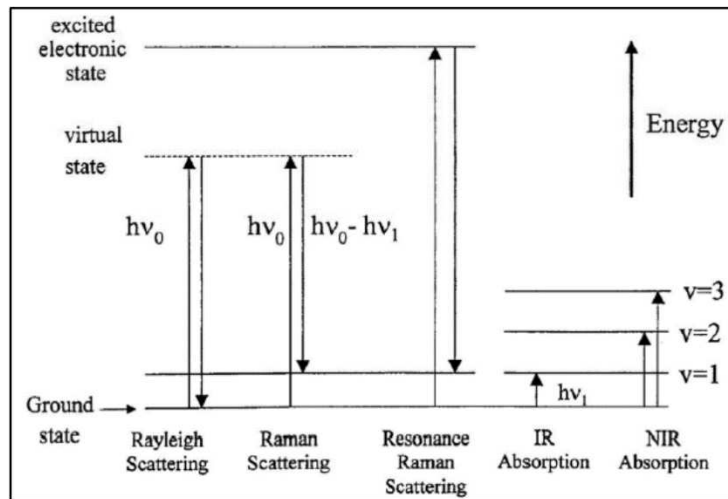


Figura 7 Processi di scattering elastico ed anelastico, con evidenziate i quanti energetici in gioco ed eventuali fenomeni di scattering risonante.

Si tratta di un fenomeno di diffusione anelastica della luce, che non è un’emissione, ma dipende dal tipo di materiale diffusore. La luce viene diffusa lungo direzioni diverse rispetto a quella di incidenza. L’effetto Raman è molto debole: solo circa 1 fotone su 10^6 viene diffuso anelasticsearchamente, e pertanto si deve utilizzare una sorgente di radiazione ad alta intensità. Attualmente, un esperimento Raman viene fatto inviando verso il campione radiazione monocromatica ad alta intensità con un laser (a frequenza ω_L) e si misura l’intensità di radiazione diffusa (a frequenza ω_S).

La diffusione può dunque essere classificata come segue:

Elastica (Rayleigh)	Anelastica (Raman)
$\omega_S = \omega_L$	$\omega_S < \omega_L$ Stokes $\omega_S > \omega_L$ Anti – Stokes

Gli spettri di scattering Raman vengono normalmente riportati in intensità della luce diffusa sull’asse verticale e in “Raman shift” (spostamento Raman) lungo l’asse orizzontale. Lo spostamento Raman rappresenta la differenza di numero d’onda fra radiazione incidente e radiazione Raman (espresso in cm^{-1}):

$$\Delta\tilde{\nu} = \tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_S = \frac{1}{\lambda_L} - \frac{1}{\lambda_S} \quad \text{Range tipico: } 10 - 4000 \text{ cm}^{-1}$$

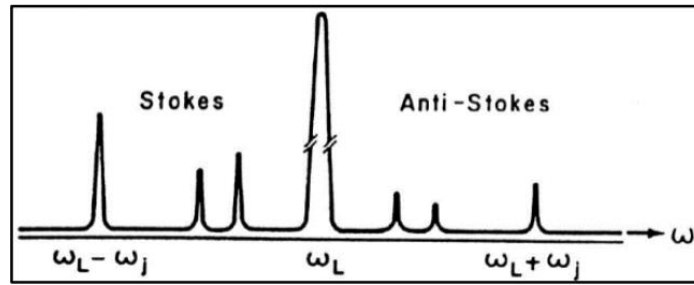


Figura 8 Spettro di scattering Raman

La diffusione Raman è un processo che avviene con una bassa intensità di fotoni diffusi. Tuttavia, ci sono alcuni metodi per aumentare la sensibilità della tecnica di analisi Raman. Ad esempio, se la lunghezza d'onda del laser utilizzato coincide con l'assorbimento elettronico di una molecola, quindi con una transizione del sistema molecolare verso uno stato elettronico effettivo (non virtuale), le vibrazioni Raman-attive associate al cromoforo assorbente vengono potenziate di un fattore che può variare da 10^2 a 10^4 . Questo effetto di risonanza Raman può essere molto utile per migliorare la sensibilità dell'analisi e per introdurre selettività elettronica. In questo modo, la tecnica di risonanza Raman viene spesso utilizzata per ottenere informazioni sia strutturali che elettroniche sulle specie di interesse in diversi campi, dalla chimica alla biologia, dalla farmacologia alla scienza dei materiali. Nonostante ciò, è importante considerare che in condizioni di *risonanza Raman* possono verificarsi effetti collaterali come l'assorbimento elevato del campione, l'eccessiva fluorescenza che copre il segnale della diffusione Raman e la possibile degradazione del campione. Per tale motivo, spesso si preferisce lavorare in *Raman normale*, ovvero al di fuori della risonanza.

L'emissione di fotoni per effetto Raman è istantanea, in quanto in questo caso lo "stato eccitato" è uno stato virtuale non quantizzato, che non può evolvere creando una popolazione di stato eccitato; quindi, decade in modo istantaneo e si ha l'emissione di fotoni. Questo permette di poter vedere il Raman scattering anche se c'è assorbimento, in quanto il primo è un processo istantaneo, mentre il secondo è un processo che impiega più tempo, non è quindi un processo a due fotoni. Il fotone assorbito presenta energia pari a:

$$\varepsilon_L = \hbar\omega_L$$

Mentre il fotone diffuso possiede energia pari a:

$$\varepsilon_S = \hbar\omega_S = \hbar\omega_L - \hbar\omega_{vibr.}$$

Strumentazione impiegata nella spettroscopia Raman

Gli spettrofotometri Raman possono essere dispersivi o non dispersivi. Lo spettrofotometro Raman dispersivo utilizza un prisma o un reticolo, mentre lo spettrofotometro Raman non dispersivo utilizza un interferometro, come l'interferometro di Michelson nello spettrofotometro Raman a trasformata di Fourier. Le sorgenti laser sono diventate disponibili alla fine degli anni '60 e hanno sostituito completamente la lampada a mercurio che si usava in precedenza. Una combinazione di filtro notch e monocromatore a reticolo di alta qualità è la più utilizzata negli strumenti dispersivi. Per separare le linee Raman relativamente deboli dall'intensa radiazione di Rayleigh si utilizzano monocromatori a reticolo doppi o addirittura tripli, filtri super notch, filtri di reiezione, filtri olografici notch o edge e filtri olografici. Come detectors, i primi modelli di spettrofotometri Raman dispersivi utilizzavano tubi fotomoltiplicatori raffreddati termoelettricamente e rivelatori ad array di fotodiodi. I progressi della strumentazione e della tecnologia hanno sostituito questi rivelatori con dispositivi a trasferimento di carica più sensibili, come i dispositivi ad accoppiamento di carica (CCD) e i dispositivi a iniezione di carica (CID). Questi dispositivi fungono da rivelatori e sono utilizzati sotto forma di array. I rivelatori CCD multicanale vengono utilizzati con lunghezze d'onda laser inferiori a 1000 nm, mentre i rivelatori a (Ge) o l'arseniuro di indio e gallio (InGaAs) raffreddati a basse temperature, vengono utilizzati con lunghezze d'onda superiori a 1000 nm. Gli spettrofotometri a trasformata di Fourier (FT-Raman) sono stati introdotti alla fine degli anni '80 per migliorare il sistema di rivelazione in grado di superare le limitazioni dei CCD e di altri rivelatori per operare nella regione del vicino infrarosso quando si utilizza l'eccitazione laser a 1064 nm. Lo spettrofotometro FT-Raman utilizza un interferometro di Michelson e un laser a onda continua come l'Nd-YAG che emette la radiazione a 1064 nm.

Micro-Raman

Mediante accoppiamento di un Raman dotato di un laser UV, VIS con un microscopio si ottiene uno spettrofotometro micro-Raman. La radiazione laser è focalizzata dall'obiettivo del microscopio su un'area di dimensioni molto piccole. Il diametro dell'area esaminata (risoluzione spaziale) dipende dalla lunghezza d'onda del laser λ e dall'apertura numerica NA dell'obiettivo:

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

NA è dipendente dal tipo di obiettivo (incrementando gli ingrandimenti aumenta NA) ed è direttamente proporzionale all'indice di rifrazione del mezzo, per cui se si aumenta l'indice di rifrazione del mezzo, la risoluzione spaziale aumenta.

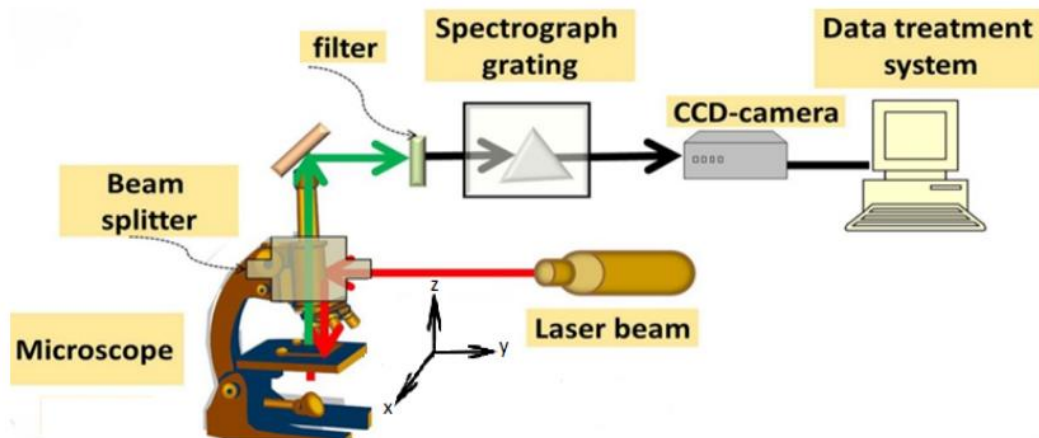


Figura 9 Configurazione sperimentale tipica di uno spettrometro μ -Raman.

L'accoppiamento dello spettrofotometro Raman al microscopio e l'avvento di spettrometri Raman portatili che sfruttano la possibilità di usare le fibre ottiche hanno ampliato di molto la possibilità di impiego della tecnica, in special modo nei beni culturali, permettendo un'analisi dei reperti in situ. Gli spettrofotometri Raman portatili sono utili per l'esame di oggetti e manufatti di grandi dimensioni e molto fragili.

Uno dei principali vantaggi del Raman è che i campioni possono essere analizzati virtualmente in qualsiasi forma, il che lo rende ideale per l'analisi di campioni complessi e non omogenei. Inoltre, il micro-Raman offre una grande risoluzione spaziale, il che significa che è possibile analizzare campioni su scala microscopica con grande precisione. Un altro vantaggio del Raman è che il vetro è trasparente nel Vis-NIR, ma non nel MIR, il che significa che il Raman può essere utilizzato per analizzare campioni attraverso il vetro se necessario. Inoltre, l'acqua non interferisce con il Raman, il che lo rende ideale per l'analisi di campioni biologici o acquosi. Infine, il Raman offre un ampio intervallo spettrale, il che significa che può essere utilizzato per analizzare una vasta gamma di materiali e composti. In definitiva, il Raman è una tecnica di analisi spettroscopica estremamente versatile e potente che offre numerosi vantaggi rispetto ad altre tecniche simili, mentre la bassa sensibilità, dovuta alla debole dispersione Raman, è il problema principale associato a questa tecnica. La sensibilità può essere migliorata utilizzando la spettroscopia Raman risonante (RRS) e la diffusione Raman amplificata da superficie (SERS).

Effetto SERS: cenni teorici

In particolari circostanze, si osserva un'enorme amplificazione superficiale della diffusione Raman (intensificazioni di 10^8 - 10^{18} ordini di grandezza rispetto al Raman normale) da parte di molecole adsorbite sulla superficie rugosa o nanostrutturata di un metallo. L'amplificazione ha origini sia elettromagnetiche che chimiche (Lombardi, 2009). L'effetto SERS è stato oggetto di un intenso dibattito, per oltre trent'anni, all'interno della comunità scientifica, riguardo all'effettiva ragione dell'amplificazione, ma ad oggi gran parte degli autori sono concordi nell'imputare il SERS ad almeno tre contributi:

- a) Risonanza plasmonica di superficie (SPR, *Surface Plasmon Resonance*),
- b) Risonanza per accoppiamento metallo/molecola (Risonanza CT, *Charge Transfer*)
- c) Risonanza molecolare (SERRS, *Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering*).

Il primo e più citato contributo (a) è di origine elettromagnetica e si basa sull'eccitazione del plasmone generato per irraggiamento della superficie della nanostruttura metallica con un fascio laser di opportuna lunghezza d'onda. L'interazione con la luce incidente induce un'oscillazione collettiva degli elettroni della banda di conduzione del metallo, in risonanza con la luce incidente. Per nanostrutture metalliche, la radiazione induce una risonanza plasmonica di superficie localizzata (LSPR), e se una molecola è in prossimità della superficie, viene a trovarsi immersa nell'onda plasmonica di superficie, che causa un forte aumento della diffusione anelastica. Quando le oscillazioni del plasmone sono perpendicolari alla superficie, la diffusione da parte della molecola è massima. La scelta del tipo di metallo e della forma e dimensione delle NPs da usare per il SERS dipendono dalla frequenza di risonanza del corrispondente plasmone: per le particelle di Au e di Ag, i tipici metalli impiegati negli esperimenti SERS, si ha condizione risonante rispettivamente nella regione del visibile e nel NIR.

Il secondo contributo (b), ritenuto di norma meno rilevante, è di origine chimica ed è attribuito a trasferimenti di carica tra la specie chemisorbita e la banda di conduzione della nanoparticella metallica, per effetto della sovrapposizione degli orbitali HOMO e LUMO molecolari con la banda di conduzione del metallo. Il trasferimento può avvenire in entrambe le direzioni (metallo→molecola o molecola→metallo) a seconda delle energie relative del livello di Fermi del metallo e i livelli HOMO e LUMO della molecola.

L'ultimo contributo (c) è riconducibile a risonanze molecolari interne alla molecola in esame.

Più di recente, si è formulata l'ipotesi che i diversi contributi partecipino più equamente al SERS e siano interconnessi secondo il seguente schema: (1) l'analita è adsorbito (*fisi-* o *chemi-*sorbito)

sulla superficie metallica e la frequenza di eccitazione del laser eccita il plasmone, creando diffusione; (2) il plasmone trasferisce energia alle molecole adsorbite, che diffondono anelasticamente i fotoni; (3) l'energia viene ritrasferita al plasmone e viene diffusa dalla superficie come luce di lunghezza d'onda spostata (McNay, 2011). Il peso relativo di ciascun contributo può far variare l'entità dell'amplificazione complessiva e dipende da molti fattori: natura delle nanoparticelle, natura del campione, lunghezza d'onda di eccitazione. Nelle normali condizioni di lavoro (ossia esperimento con una sola linea laser) è impossibile distinguere l'entità di ogni contributo poiché l'analisi completa degli apporti relativi richiederebbe un range di eccitazione molto ampio (Lombardi, 2009). Le tre amplificazioni risonanti concorrono tutte a determinare l'aspetto finale dello spettro SERS di una molecola, che appare abbastanza diverso dal corrispondente spettro Raman normale: sebbene le frequenze molecolari non varino molto, le intensità relative risultano molto alterate. I contributi relativi delle vibrazioni totalmente simmetriche e non totalmente simmetriche (alquanto diversi per SERS e Raman), l'orientazione della molecola rispetto alla superficie metallica, l'inclusione del livello di Fermi del metallo nella lista dei contribuenti agli stati accessibili del sistema molecola-metallo, l'orientazione del sistema rispetto al vettore elettrico di polarizzazione della luce incidente: tutto ciò ha forti implicazioni nell'aspetto dello spettro osservato.

Materiali e metodi sperimentali

Filtri in fibra di vetro Vycor

Prima dell'utilizzo dei veri cocci di anfore provenienti dalla Necropoli di Nora, materiale archeologico complesso e relativamente limitato, per testare le tecniche si è fatto ricorso a dei modelli costituiti da filtri in vetro poroso: tali modelli dovrebbero riprodurre la porosità naturale dei cocci, ma con il vantaggio, tipico del vetro, di avere pochi segnali Raman di fondo. Si sono quindi impiegati dei filtri in fibra di vetro Vycor, dischi in borosilicato (96% di silice e 4% di Triossido di Boro).

Su quattro filtri si è deposta una goccia di olio di oliva extravergine e su altri quattro si è deposta una goccia di vino rosso Montepulciano. Due filtri con olio e due con vino sono stati invecchiati termicamente in stufa a 100 °C per 8 ore. In tabella sono riportati campioni così preparati:

Tabella 1 Campioni filtri Vycor

Campioni filtri Vycor	Trattamento
1 e 2	Olio
3 e 4	Olio invecchiato
5 e 6	Vino
7 e 8	Vino invecchiato

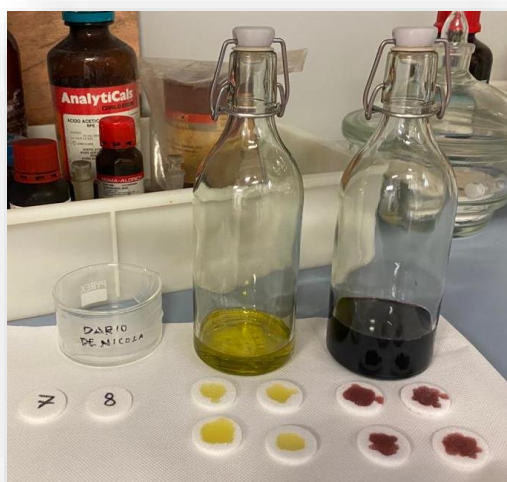


Figura 10 Olio, vino e campioni filtri Vycor utilizzate nell'esperimento

Per l'analisi IR dei filtri, effettuata in sola modalità ATR, si è proceduto al raschiamento di circa 20 µg di polvere da ciascun campione considerato poco prima dell'effettuazione delle misure

Cocci a perdere

Nella seconda parte del progetto di tesi, sono state condotte analisi sui cosiddetti "cocci a perdere". Questi frammenti di anfora provenivano dallo stesso sito archeologico di Nora e risalivano allo stesso periodo delle anfore di interesse. Tuttavia, a differenza di queste ultime, i cocci in questione non avevano alcun valore archeologico, o rilevanza per l'indagine analitica: infatti, erano costituiti principalmente dagli orli delle anfore, in modo da ridurre la probabilità della presenza di eventuali residui organici durante l'analisi.



Figura 11 Cocci a perdere provenienti dal sito archeologico di Nora

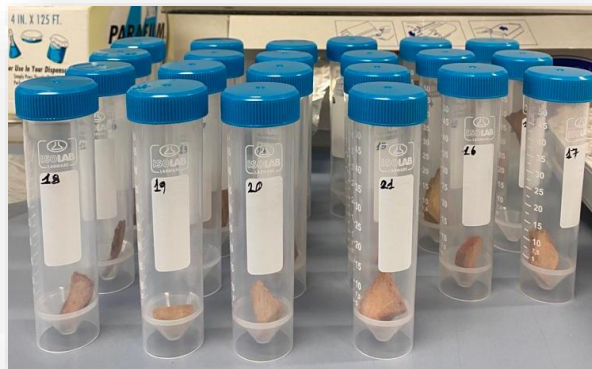


Figura 12 Cocci a perdere numerati e riposti in provette Falcon

I “cocci a perdere” sono stati successivamente sottoposti a trattamenti con olio e vino, e una parte è stata sottoposta a un processo di invecchiamento. È stata fatta una distinzione in base al tipo di campione, con l'analisi di due campioni per ogni tipo (olio, vino, olio invecchiato, vino invecchiato), distinguendo tra la parte interna ed esterna dei cocci al fine di individuare eventuali differenze nei risultati dell'analisi. I cocci a perdere trattati sono stati quindi etichettati come in tabella:

Tabella 2 Campioni cocci a perdere

Campioni cocci a perdere	Trattamento
1E e 2I	Olio
3I e 4E	Olio invecchiato
5I e 6E	Vino
7I e 8E	Vino invecchiato

“I” indica la parte interna del coccio, mentre “E” indica la parte esterna.

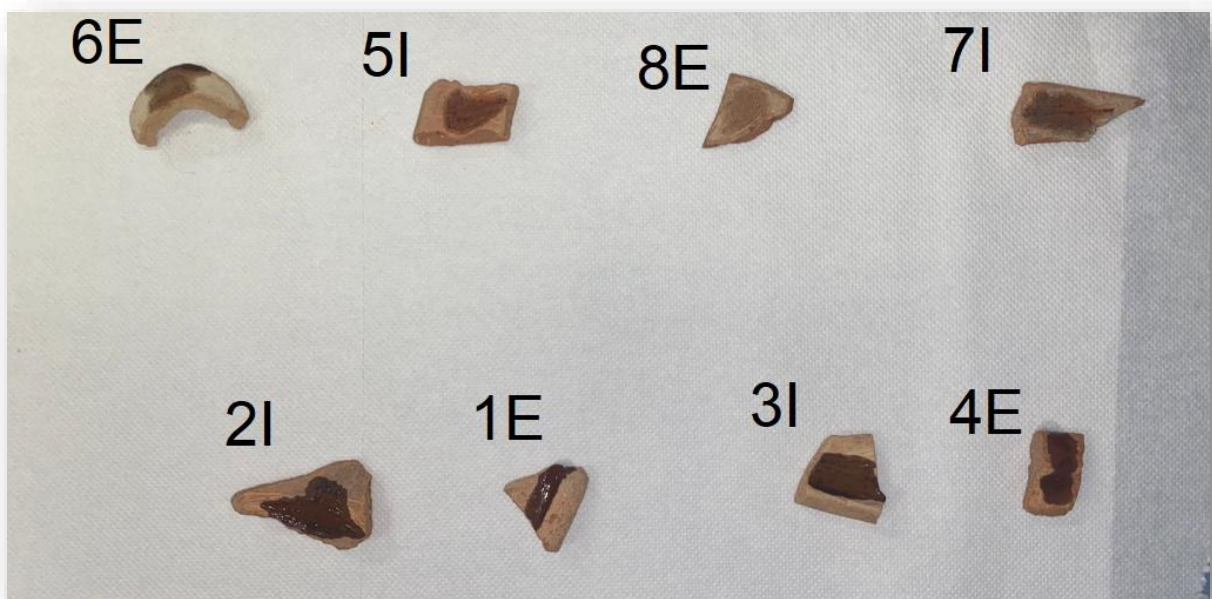


Figura 13 Campioni cocci a perdere trattati con olio e vino

I vari cocci sono stati numerati e riposti in provette Falcon. Per ogni coccio, si sono raccolti 20 µg di polvere dalla parete esterna e altri 20 µg dalla parete interna, raschiando la superficie del campione,

così da vedere se c'erano differenze fra interno ed esterno. Dopodiché son state fatte analisi Raman direttamente sui cocci e sulle polveri si è condotta l'analisi ATR-IR e microFTIR.

Caratteristiche chimiche dell'olio e del vino

Composizione chimica dell'olio d'oliva

La composizione chimica dell'olio d'oliva è principalmente costituita da trigliceridi, che rappresentano circa il 95% dei suoi costituenti lipidici. I trigliceridi sono esteri di glicerolo formati dalla combinazione di tre molecole di acidi grassi e una molecola di glicerolo. Questa combinazione chimica crea una struttura a forma di Y, con il glicerolo come "ponte" centrale e gli acidi grassi che si estendono dalle tre estremità.

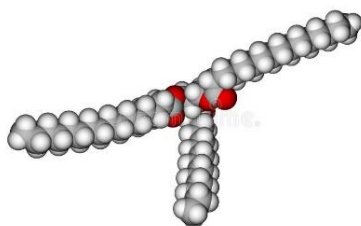


Figura 14 Struttura a "Y" dei trigliceridi

Gli acidi grassi che costituiscono i trigliceridi possono essere classificati come saturi, monoinsaturi o polinsaturi, a seconda del numero di legami carbonio-carbonio nella loro catena. L'olio d'oliva contiene principalmente acidi grassi monoinsaturi, con l'*acido oleico* (C18:1) che rappresenta la maggioranza, costituendo circa il 55-83% degli acidi grassi totali. L'acido oleico è caratterizzato dalla presenza di un doppio legame nella catena carboniosa, situato nel carbonio 9. Questo acido grasso conferisce all'olio d'oliva la sua consistenza liquida a temperatura ambiente e contribuisce alle sue proprietà organolettiche, nutrizionali e funzionali. Oltre all'acido oleico, l'olio d'oliva contiene anche acidi grassi saturi, sebbene in quantità minori rispetto ad altri oli vegetali e grassi animali. L'acido grasso saturo principalmente presente è l'*acido palmitico* (C16:0), caratterizzato dalla presenza di legami carbonio-carbonio singoli. L'olio d'oliva contiene anche acidi grassi polinsaturi, tra cui l'*acido linoleico* (C18:2) e l'*acido linolenico* (C18:3). La caratteristica distintiva di questi acidi grassi è la presenza di doppi legami nella loro struttura chimica. L'acido linoleico presenta due doppi legami, che si trovano ai carboni 9 e 12 nella sua catena carboniosa. L'acido linolenico, invece, presenta tre

doppi legami nella sua struttura. Due di questi doppi legami sono posizionati ai carboni 9 e 12, simili all'acido linoleico, ma il terzo doppio legame si trova al carbonio 15 (Dimitrios Boskou, 2006).



Figura 15 Struttura molecolare dei trigliceridi

Composizione chimica del vino

La composizione chimica del vino è estremamente complessa e diversificata, comprendendo una vasta gamma di sostanze. L'acqua è il componente principale del vino, costituendo la maggioranza della sua composizione. Essa svolge un ruolo fondamentale nella crescita delle viti e nella fermentazione alcolica, durante la quale gli zuccheri presenti nell'uva vengono convertiti in alcol etilico. L'*alcol etilico*, conosciuto anche come etanolo, è il principale alcol presente nel vino. Si forma attraverso il processo di fermentazione alcolica, in cui i lieviti trasformano gli zuccheri in alcol e anidride carbonica.

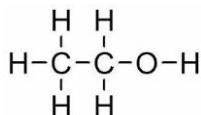


Figura 16 Struttura molecolare alcol etilico

Oltre all'acqua e all'etanolo, il vino contiene una vasta gamma di altre sostanze chimiche. Ad esempio, i *polifenoli*, i quali sono un gruppo di composti chimici noti per contribuire ai suoi benefici per la salute e per influenzarne il sapore, il colore e l'aspetto. La struttura chimica dei polifenoli nel vino può variare, ma sono generalmente costituiti da anelli aromatici con gruppi idrossilici (-OH) attaccati ad essi. Questa struttura chimica conferisce loro proprietà antiossidanti.

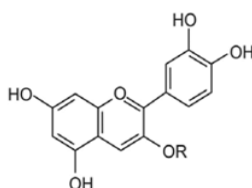


Figura 17 Struttura molecolare di un tipo di polifenolo

Importanti composti polifenolici presenti nel vino sono i *tannini* e i *flavonoidi*. I tannini sono composti acidi, con marcate proprietà astringenti, che risultano dal metabolismo delle piante (le proprietà astringenti derivano dalla loro capacità di legarsi alle proteine facendole precipitare). Sono raggruppati in *tannini idrolizzabili*, *florotannini* e *tannini condensati*. L'*acido tannico* (Fig. 18) è il rappresentante capostipite dei tannini idrolizzabili, così chiamati perché la loro struttura polifenolica risulta dalla combinazione di gruppi acidi e gruppi OH a formare esteri che possono idrolizzare con una certa facilità nell'ambiente acido, liberando glucosio e acido gallico. I florotannini sono tannini non idrolizzabili presenti in molte alghe brune (non presenti nel vino), mentre i tannini condensati sono presenti nella maggior parte delle piante, e si ritrovano facilmente anche nel vino. I tannini condensati sono formati per ripetizioni di unità monomeriche di *catechina* (Fig. 19), unite mediante legami covalenti, e hanno importanti proprietà antiossidanti (oltre ad essere astringenti come tutti i tannini). La catechina da sola è anche presente nei vini, e contribuisce alla colorazione e al sapore del vino.

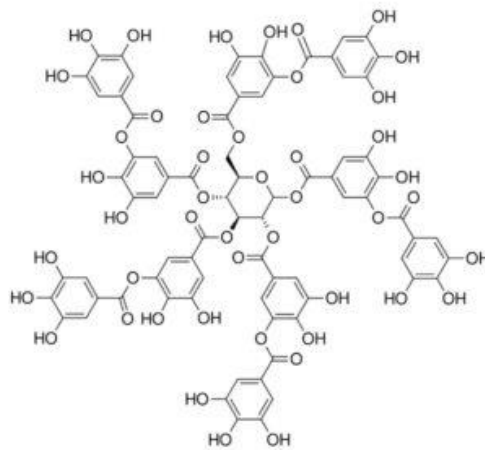


Figura 18 Struttura molecolare dell'acido tannico

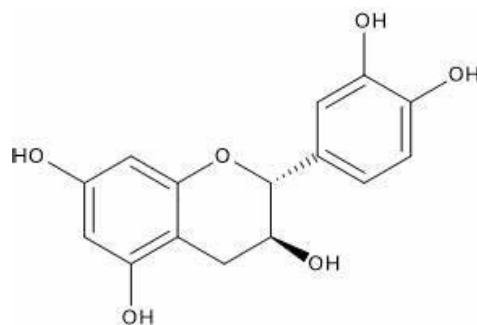


Figura 19 Struttura molecolare catechina

Nel vino sono presenti diversi acidi organici che contribuiscono al suo profilo di gusto e al suo equilibrio. Alcuni degli acidi organici più comuni nel vino includono l'*acido tartarico*, l'*acido malico*, l'*acido lattico* e l'*acido citrico*.

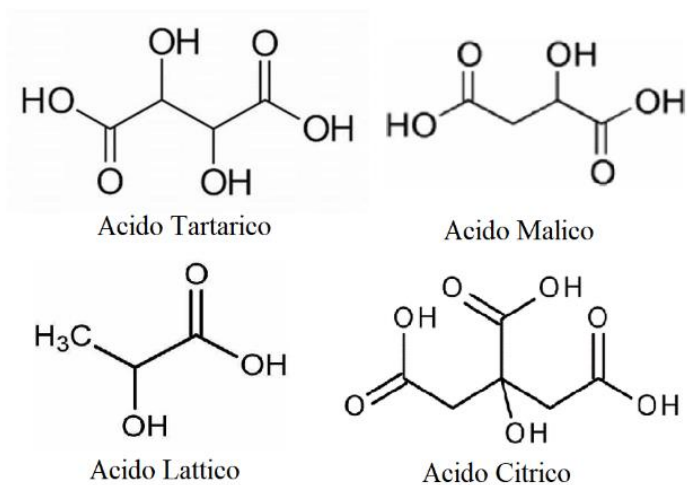


Figura 20 Struttura molecolare dei principali acidi inorganici nel vino

Nel vino sono anche presenti diversi tipi di zuccheri, che sono prodotti durante il processo di fermentazione dell'uva. I principali zuccheri che si possono trovare nel vino includono il *glucosio*, il *fruttosio*, il *saccarosio* e il *sorbitolo*.

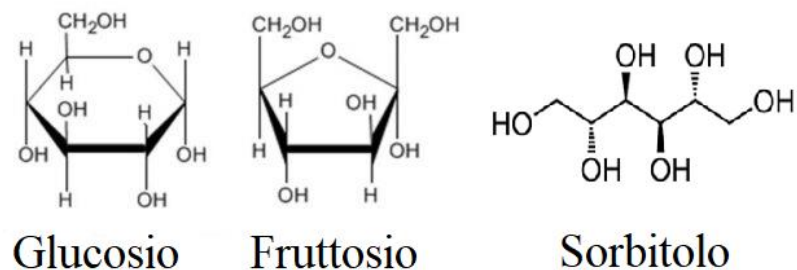


Figura 21 Struttura molecolare dei principali zuccheri contenuti nel vino

È importante notare che la composizione chimica del vino può variare considerevolmente a seconda di numerosi fattori, tra cui la varietà dell'uva utilizzata, le condizioni di crescita, le pratiche di vinificazione e l'invecchiamento (Monica B., 2019).

Nell'ambito di questa tesi, è stato scelto il Montepulciano d'Abruzzo come vino di riferimento. Questa scelta è stata motivata dalla volontà di ricreare la composizione e le caratteristiche del vino antico dell'epoca fenicia. Si è ritenuto che i vini prodotti durante l'epoca fenicia fossero caratterizzati da una maggiore robustezza e da un contenuto alcolico più elevato rispetto ai vini contemporanei.

Soluzioni e solventi

Durante le analisi SERS e micro-FTIR si sono impiegati diversi solventi per sciogliere le sostanze desiderate, come olio e vino. Questo è stato fatto al fine di favorire la formazione di patine laterali, cioè sottili strati di materiale contenente le sostanze di interesse, con una concentrazione maggiore di analita.

I solventi utilizzati in questo esperimento sono stati:

Tabella 3 Solventi utilizzati nell'esperimento

Solvente	Formula Chimica
Acetone	C_3H_6O
Idrossido di Sodio 1M	NaOH
Cloroformio	$CHCl_3$
Acido Cloridrico 1M	HCl
Etanolo	CH_3CH_2OH

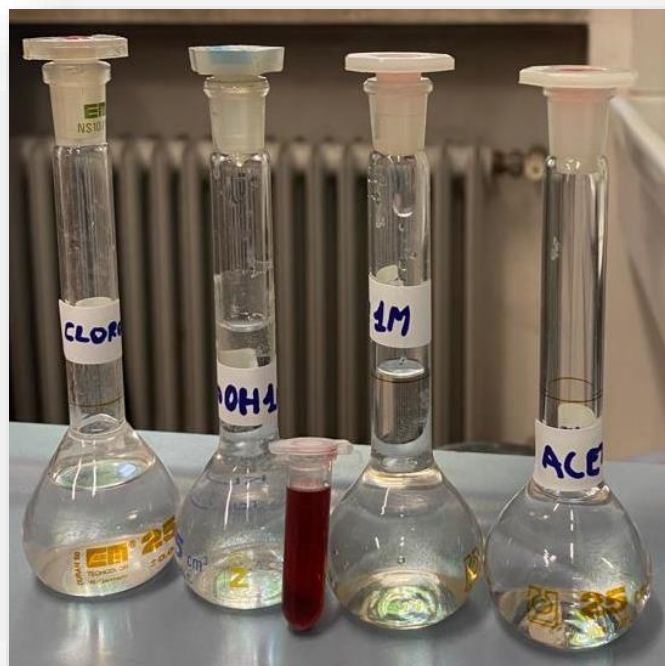


Figura 22 Solventi utilizzati in tesi

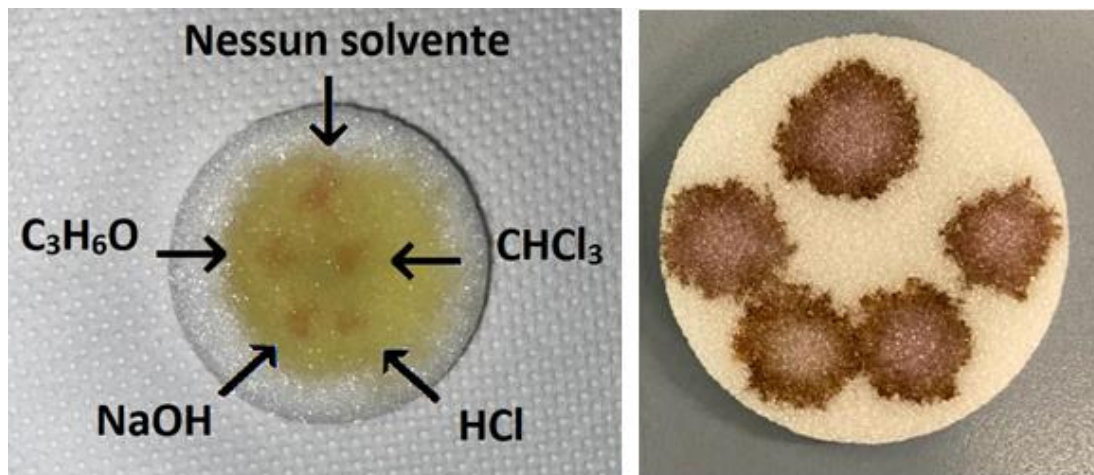


Figura 23 Campioni Vycor trattati con olio e vino con indicati gli spot in cui sono state poste le gocce di solvente

Per l'analisi tramite micro-FTIR è stata utilizzata una miscela di etanolo e cloroformio come solvente. Questa miscela è stata applicata sotto forma di gocce sui vetrini, sul quale erano precedentemente stati depositati le polveri provenienti dai "cocci a perdere". La miscela di etanolo e cloroformio è stata applicata sui vetrini sotto forma di gocce. Questo è stato fatto per distribuire uniformemente il solvente sulla superficie del vetrino e sulla polvere depositata, consentendo una migliore interazione tra il solvente e le sostanze organiche presenti.

Preparazione dei campioni per le misure SERS

Nell'esperimento SERS, ogni campione è trattato applicando una piccola goccia (100 μ L) di sospensione acquosa di nanoparticelle d'oro. La sospensione di nanoparticelle è preparata mediante ablazione laser secondo la metodologia LASiS (Laser Ablation Synthesis in Solution) (V.Amendola, 2006). La sintesi è condotta focalizzando un laser Nd:YAG a 1064 nm su un bersaglio d'oro immerso in una soluzione acquosa 10 μ M di NaCl, con impulsi di 9 ns. Le particelle hanno un diametro medio di 25 ± 5 nm, con superficie libera, evitando in tal modo che nell'analisi SERS si raccolgano segnali derivanti da legandi superficiali delle nanoparticelle.

Su ogni campione trattato con olio, vino, olio invecchiato, vino invecchiato, sia esso un filtro Vycor o un coccio a perdere, si sono depositate cinque gocce nell'area interessata dal componente organico (olio o vino), realizzando altrettanti "spot" di nanoparticelle d'oro. Il primo "spot" non ha avuto l'aggiunta di alcun solvente, mentre negli altri quattro spot si è adoperato un solvente fra quelli riportati in *Tabella Solventi*. Lo scopo di questa aggiunta era determinare quale solvente potesse risultare più efficace nell'estrazione degli organici di interesse. Sull'area ricoperta di

nanoparticelle d'oro, con l'eventuale aggiunta di solvente, si è proceduto ad effettuare le misure Raman secondo le modalità riportate nella sezione che segue.

Procedura di acquisizione spettri Raman/SERS

Due tipi di strumenti sono stati impiegati per l'analisi Raman/SERS. Si è fatto uso preliminarmente di un Raman portatile i-Raman plus della BWTeK, con linea laser a 785 nm ed equipaggiato con microscopio. Lo strumento era dotato di fibre ottiche per l'invio della radiazione laser e per la raccolta della radiazione diffusa. Gli spettri Raman sono stati acquisiti con potenze del laser dal 60% all'80% della potenza nominale massima (500 mW). Il microscopio disponeva di ingrandimenti 10X, 20X, 40X e 80X, ma nella maggior parte delle acquisizioni si è optato per il massimo ingrandimento (80X) per minimizzare effetti di fluorescenza. Questa indagine preliminare aveva l'obiettivo di valutare l'applicabilità di misure Raman in situ, un aspetto frequentemente richiesto nell'ambito delle indagini nei beni culturali. Con la strumentazione portatile si sono condotti solo esperimenti Raman e non SERS (non essendo la linea a 785 nm la migliore per misure SERS con nanoparticelle d'oro).

Secondariamente, si è proceduto all'analisi Raman con strumento da banco *Renishaw InVia* equipaggiato di microscopio *Leica DM-LM*, con obiettivi da 5 X a 100 X, e dotato di linee laser selezionabili a 514 nm, 633 nm, e 785 nm.

Nelle misure con lo strumento da banco, prima di avviare ogni sessione di misurazione, la routine sperimentale prevedeva la calibrazione dell'apparecchiatura utilizzando il segnale di un campione di silicio presente all'interno dello strumento. Questa calibrazione garantiva che l'intensità e la posizione del picco principale dello standard fossero corrette. Successivamente, si esaminava la morfologia del campione utilizzando un microscopio ottico. Una volta selezionato il punto specifico di acquisizione, si verificava la corretta messa a fuoco del fascio laser sulla superficie del campione, eventualmente apportando regolazioni tramite una traslazione micrometrica del piatto porta campione lungo l'asse z. Nel caso dell'acquisizione del SERS, si aveva naturalmente cura di focalizzare il laser sullo spot di nanoparticelle d'oro applicate al campione.

Dopo aver selezionato l'obiettivo ottico del microscopio, il laser di eccitazione e la sua potenza, il tempo di integrazione e il numero di acquisizioni, si procedeva con l'acquisizione dello spettro.

Procedura di acquisizione spettri IR

L'analisi dei campioni mediante l'impiego di tecniche infrarosse è stata eseguita ottenendo delle polveri dai campioni iniziali.

Nel caso dell'ATR, si è fatto uso dello strumento FTIR Alpha Bruker, presente presso il CEASC, equipaggiato con modulo ATR con cristallo al diamante.

Per la misura, la polvere veniva posizionata sulla superficie del cristallo, premuta mediante il perno, avviando successivamente l'analisi e acquisendo lo spettro.

Nell'analisi micro-FTIR, si è fatto uso di uno strumento Nicolet iS 10 della thermofisher accoppiato ad un microscopio continuum con detector del microscopio MCTA, raffreddato ad azoto. Lo spot d'analisi era circa 50micron. L'analisi è stata condotta in riflettanza esterna, e quindi senza contatto con il campione.

Nell'analisi, la polvere veniva depositata su un vetrino precedentemente lavato con alcol. Successivamente, veniva aggiunta una miscela 1:1 di etanolo e cloroformio, consentendo il completo essiccamento. L'estrazione con solvente determinava la formazione di un sottile alone (contenente il residuo organico estratto) attorno alla polvere. A questo punto, si utilizzava un microscopio per puntare sull'alone e si procedeva alla messa a fuoco dell'area, acquisendo successivamente lo spettro IR in riflettanza. Questa modalità conduce a spettri non sempre con la corretta fasatura dei diversi picchi, e richiede quindi una certa cautela nell'analisi degli spettri.

Elaborazione dei dati

L'elaborazione dei dati spettrali è stata effettuata utilizzando il software OriginPro 2019b. In questo processo, ciascuno spettro è stato normalizzato. Negli spettri Raman, sono stati rimossi eventuali picchi anomali causati da raggi cosmici che hanno colpito il rivelatore ed è stata sottratta la componente di fondo, comunemente attribuita ai fenomeni di fluorescenza.

Risultati sperimentali

1 Indagine IR

Le analisi in infrarosso in modalità ATR sono state condotte sia sui filtri Vycor che sui cocci a perdere su polveri raccolte mediante raschiamento superficiale, come descritto nella parte di Materiali e Metodi Sperimentali.

1.1 Campioni preparati su filtri Vycor

1.1.1 Filtro Vycor non trattato

Lo spettro ATR-IR della polvere del filtro Vycor, non trattato, presenta bande di assorbimento con riscontro nella letteratura caratteristiche del legame Si-O, evidenziando lo *stretching asimmetrico* a 1082 cm^{-1} , lo *stretching asimmetrico* del legame Si-OH nella spalla a 920 cm^{-1} e lo *stretching simmetrico* del legame Si-O a 797 cm^{-1} , dovuta ad impurità o all'assorbimento di acqua dall'ambiente circostante. Inoltre, è osservabile una piccola banda di assorbimento a 2937 cm^{-1} , attribuita alla presenza di gruppi alchilici. Tuttavia, è importante notare che nella regione compresa tra $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, in cui normalmente ci si aspetterebbe di osservare una banda ampia, legata allo *stretching OH*, questa si presenta poco evidente nello spettro in analisi. Inoltre, si rileva un picco distintivo a 1400 cm^{-1} , che corrisponde alla vibrazione caratteristica del legame singolo del B-O, indicativo di un vetro borosilicato (Alexandru Mihai Grumezescu, 2014).

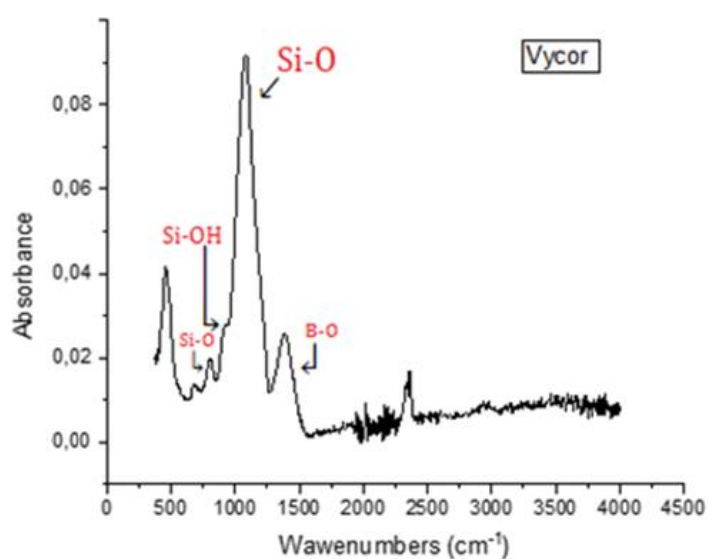


Figura 24 Spettro IR filtro Vycor

1.1.2 Campione Vycor 1 (filtro Vycor con olio)

Sul campione Vycor 1 è stato possibile osservare diverse bande di assorbimento che indicano la presenza dell'olio nel materiale. L'analisi ha confermato la rilevabilità dell'olio d'oliva utilizzando questa tecnica, consentendo così di verificare la presenza e la distribuzione dell'olio all'interno dei campioni. Questa metodologia si è dimostrata efficace nel fornire informazioni sulle componenti caratteristiche dell'olio d'oliva presenti nel materiale in esame.

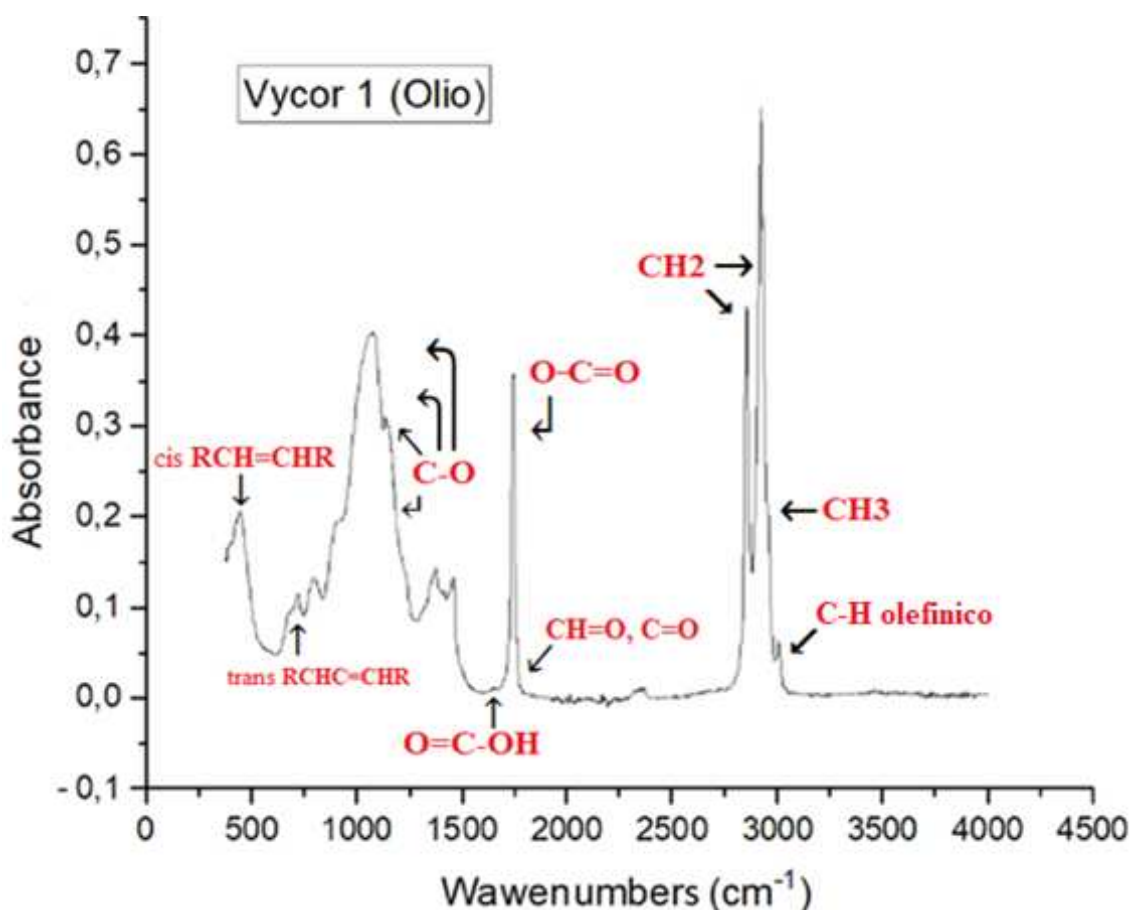


Figura 25 Spettro IR del campione Vycor 1

In Fig. 25 si possono osservare diverse bande di assorbimento che trovano conferma in letteratura come la banda di assorbimento a 3006 cm^{-1} la quale indica lo *stretching simmetrico* del gruppo CH olefinico, riconducibile ai doppi legami di acidi grassi insaturi quali l'acido oleico e linoleico. La spalla a 2962 cm^{-1} è dovuta allo *stretching asimmetrico* del legame C-H alifatico del gruppo CH_3 , che è caratteristico dei trigliceridi presenti in quantità significative negli olii in questione. Ulteriori bande di assorbimento sono state osservate a 2920 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} , corrispondenti allo *stretching asimmetrico* e *simmetrico* del legame C-H del gruppo alifatico CH_2 . Questi legami alifatici sono tipici delle catene degli acidi grassi che costituiscono una parte essenziale della composizione dell'olio d'oliva. La banda a 1746 cm^{-1} , invece, è stata associata allo *stretching* del gruppo funzionale estereo

C=O dei trigliceridi presenti nell'olio d'oliva. Un piccolo segnale a 1710 cm^{-1} è indicativo dello *stretching* del gruppo carbonilico C=O degli acidi grassi liberi. La banda a 1654 cm^{-1} è stata correlata allo *stretching* del legame C=C delle olefine *cis*-disostituite, che sono presenti nelle strutture degli acidi grassi dell'olio d'oliva. Le vibrazioni di *bending* dei gruppi alifatici CH_2 e CH_3 a 1458 cm^{-1} . Allo stesso modo, la vibrazione di *bending* a 1397 cm^{-1} è riconducibile al gruppo *cis*-olefinico, che è caratteristico degli acidi grassi presenti nell'olio d'oliva. Le bande di assorbimento a 1237 cm^{-1} , 1141 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} e 1096 cm^{-1} sono state attribuite allo *stretching* dei legami C-O. Infine, le vibrazioni di *bending* a 914 cm^{-1} e 722 cm^{-1} sono attribuibili a gruppi *cis*-RHC=CHR e *trans*-RHC=CHR nelle olefine disostituite presenti nell'olio d'oliva (María D Guillén, 2000).

Le analisi condotte hanno dimostrato chiaramente la presenza di numerosi picchi di assorbimento tipici dell'olio d'oliva fresco, indicativi dell'efficacia dell'analisi ATR nell'identificazione dell'olio impregnato su materiale poroso teoriche.

Un secondo campione, identico al campione Vycor1, è stato preparato per valutare la riproducibilità dei risultati (Fig. 83 in Appendice). Lo spettro appare assolutamente identico, indicativo di una buona riproducibilità del risultato sperimentale.

1.1.3 Campione Vycor 3 (filtro Vycor con olio invecchiato)

Durante il trattamento termico della Vycor contenente olio d'oliva, a una temperatura di 100°C per un periodo di 8 ore, si prevede che si verifichino alterazioni osservabili nella struttura chimica dell'olio, anche se è noto dalla letteratura che l'entità di queste alterazioni è fortemente dipendente dalla composizione dell'olio (Frankel, 2010). Il trattamento termico provoca la degradazione dell'olio d'oliva, alterandone la composizione chimica e determinando modifiche nella disposizione molecolare e nella presenza di specifici gruppi funzionali. Sulla base di dati di letteratura (María D Guillén, 2000), una delle variazioni più significative riguarda una delle bande spettrali di interesse vicino a 3468 cm^{-1} , originariamente dovuta all'overtone dell'assorbimento del carbonile dell'estere gliceridico. Durante l'ossidazione degli oli, questa banda subisce cambiamenti. Inizialmente, la frequenza di questa banda rimane invariata, mentre successivamente l'assorbanza massima si sposta verso valori di numero d'onda più bassi, generalmente intorno a 3435 cm^{-1} . Tuttavia, gli oli di oliva possono mostrare un valore intermedio vicino a 3450 cm^{-1} . Durante il processo di degradazione, si osserva uno spostamento finale della frequenza dell'assorbanza massima a causa della comparsa di un nuovo assorbimento crescente vicino a 3530 cm^{-1} , che si sovrappone alle bande spettrali precedentemente citate, banda legata allo *stretching* OH. Questo nuovo

assorbimento è attribuito alla presenza di proporzioni significative di alcoli o prodotti di ossidazione secondaria. Un'altra banda spettrale di rilevanza si trova a circa 3006 cm^{-1} ed è dovuta alla vibrazione di stiramento dei gruppi CH cis-olenici. Durante il processo di ossidazione degli oli, questa banda rimane quasi invariata o subisce uno spostamento molto lento verso valori più bassi di lunghezza d'onda. Si verificano anche variazioni nella banda a circa 1746 cm^{-1} , associata al gruppo funzionale estere carbonilico dei trigliceridi, il quale subisce significativi cambiamenti durante il processo di ossidazione degli oli. Inizialmente, il valore di frequenza rimane praticamente invariato, ma successivamente si osserva una variazione pronunciata, con allargamento della banda, e spostamento a numeri d'onda più bassi: questo effetto è dovuto alla sovrapposizione con bande dovute *stretching* C=O di aldeidi (1728 cm^{-1}), che si formano nell'ossidazione, e gruppi carbossilato (1710 cm^{-1}) che si formano in processi di idrolisi/ossidazione.

Nel nostro caso, però, (Fig. 26), l'analisi degli spettri ottenuti dopo il processo di invecchiamento termico della Vycor contenente olio d'oliva non ha evidenziato differenze significative rispetto agli spettri del campione Vycor 1. Anche il campione Vycor 4, replica del campione Vycor 3, non ha evidenziato differenze rispetto all'olio fresco (Fig.84 in Appendice).

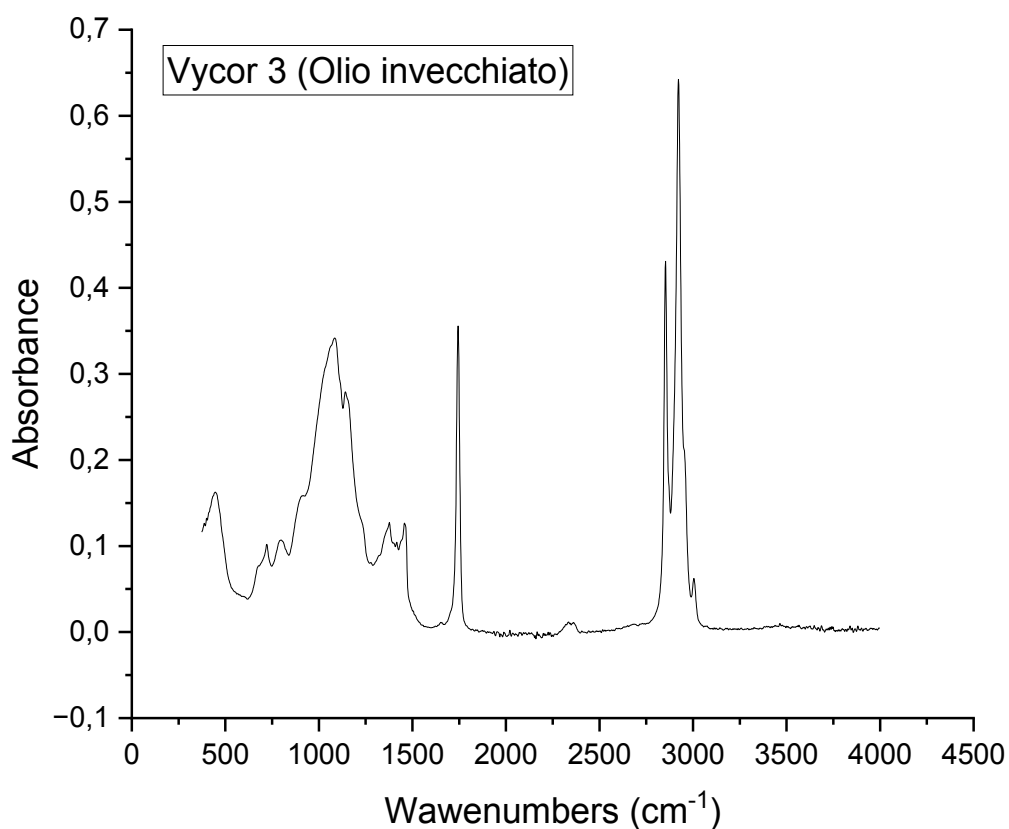


Figura 26 Spettro IR del campione Vycor3

È evidente, quindi, che le condizioni adottate non erano sufficienti ad indurre un apprezzabile invecchiamento dell'olio considerato (Fig.27) almeno in termini della sensibilità offerta dall'analisi ATR-IR: è probabile che la composizione dell'olio abbia influito in modo rilevante sulla velocità di degrado, ed in particolare, la presenza di antiossidanti ha giocato un ruolo rilevante nel conferire all'olio considerato resistenza rispetto all'invecchiamento.

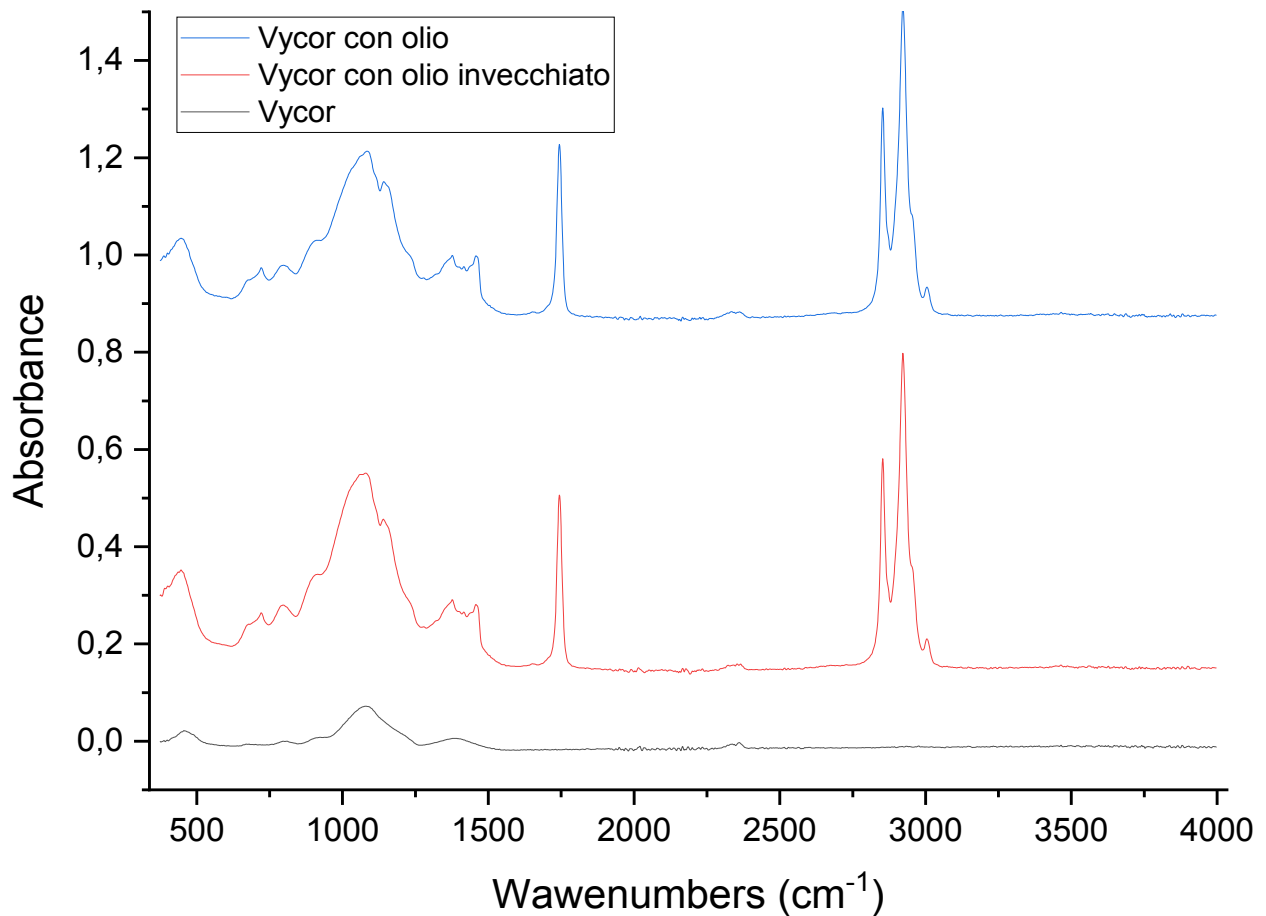


Figura 27 Confronto spettri dei campioni Vycor, Vycor 1, Vycor 3

Sono in programma trattamenti di invecchiamento termico con periodi più lunghi per osservare l'evoluzione dei segnali dell'olio.

1.1.4 Campione Vycor 5 (filtro Vycor con vino)

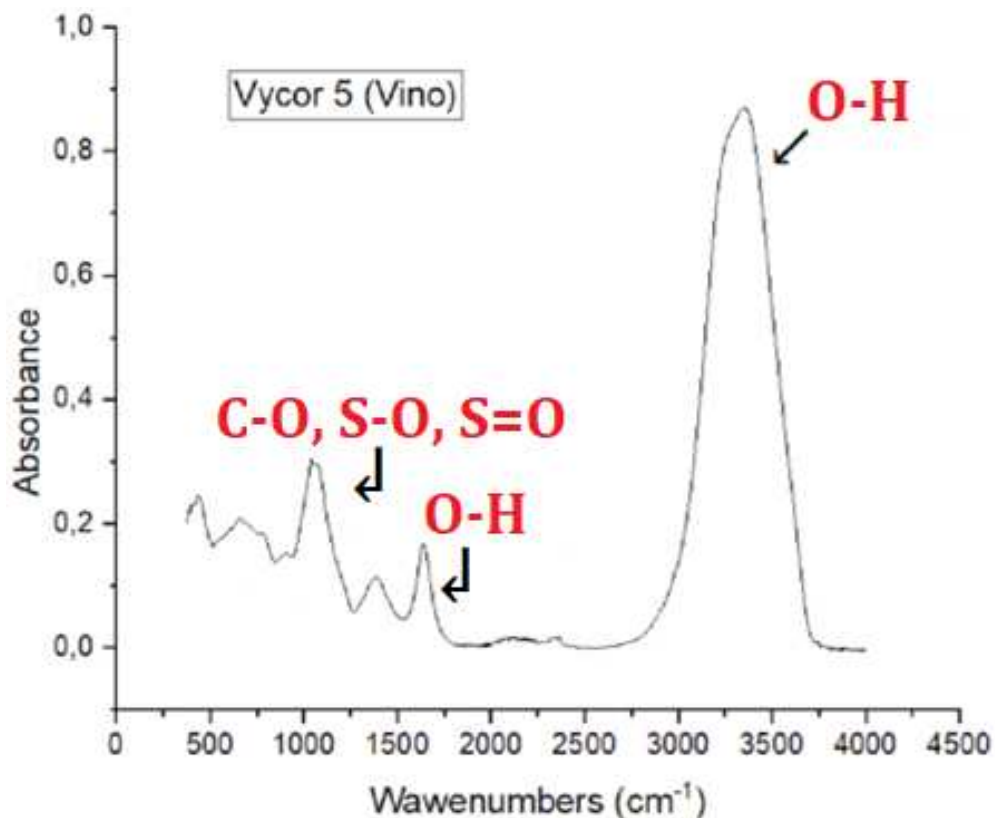


Figura 28 Spettro IR campione Vycor 5

L'analisi spettrale condotta sul campione Vycor 5, filtro in vetro impregnato con vino, ha prodotto i seguenti risultati. Alla lunghezza d'onda di 1620 cm^{-1} , si osserva una banda di assorbimento che indica il *bending* del legame H-O-H di acqua legata. Alla frequenza di 3340 cm^{-1} , si osserva un'ampia banda attribuibile allo *stretching* del legame O-H dei molti gruppi OH presenti nei composti del vino (acqua, alcool, carboidrati, tannini). Tuttavia, non si osservano intorno a 3000 cm^{-1} CH, né segnali riconducibili a gruppi carbonilici, fra 1700 e 1800 cm^{-1} , il che rende poco probabile che residui organici quali tannini, zuccheri o carboidrati siano effettivamente visibili nei limiti della nostra analisi ATR (benché la presenza di un residuo fisso sia evidente dalla colorazione rossastra dei filtri Vycor trattati con il vino), e che pertanto i segnali osservati siano essenzialmente dovuti alla componente acquosa del vino (Scano, 2021).

Lo spettro del campione Vycor 6 (Fig.85), replica del campione Vycor 5, mostra segnali del tutto analoghi.

1.1.5 Campione Vycor 7 (filtro Vycor con vino invecchiato)

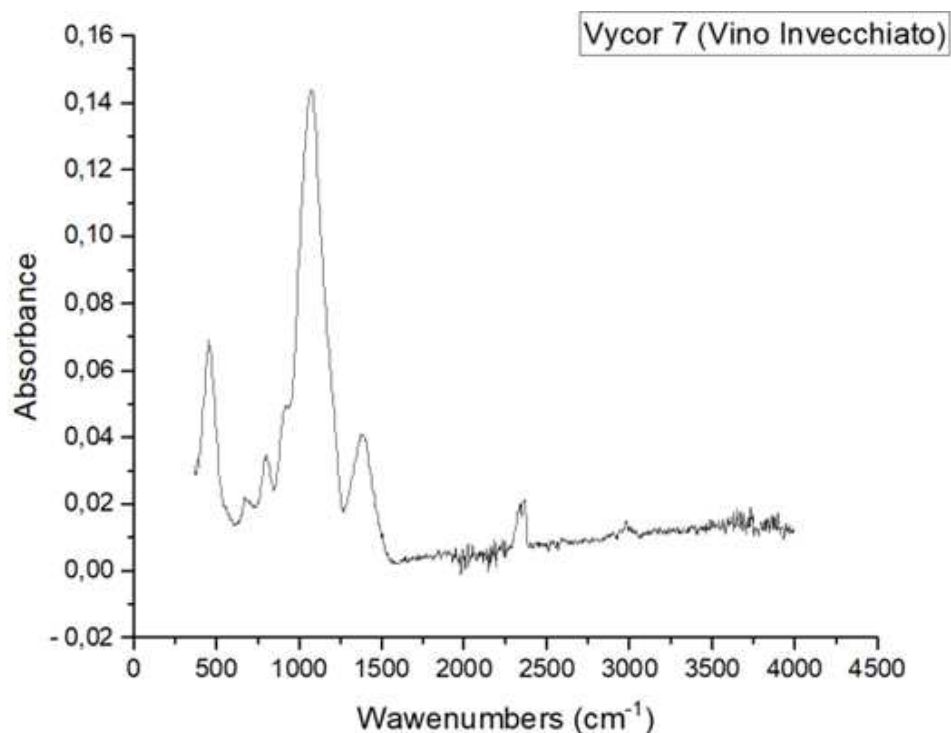


Figura 29 Spettro IR campione Vycor 7

Il processo di invecchiamento della Vycor con il vino ha seguito il medesimo protocollo adottato per la Vycor con l'olio. L'analisi IR (Fig. 29) mostra segnali riconducibili unicamente al vetro borosilicato della Vycor, senza indicazione di alcun residuo organico, come emerge da un confronto diretto dello spettro della Vycor e dello spettro campione Vycor 7 (Fig.30).

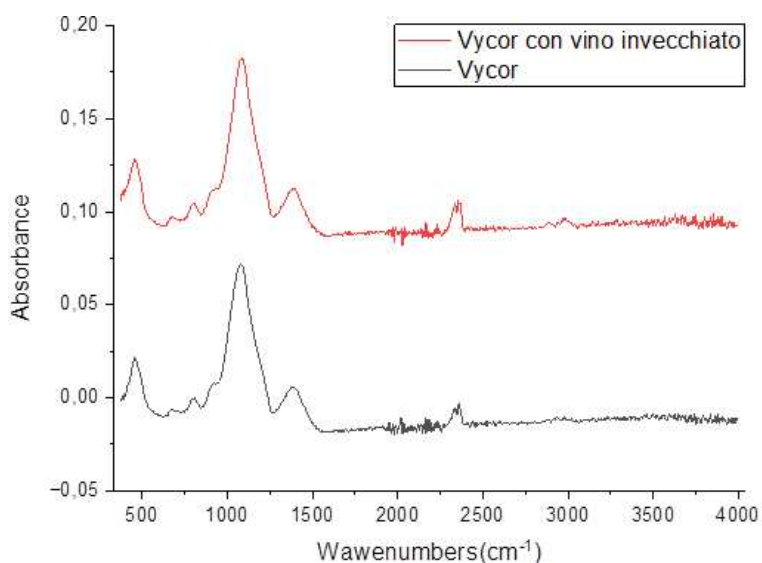


Figura 30 Confronto spettro IR del campione Vycor 7 e Vycor

Il risultato evidenzia che, nei limiti dell'analisi ATR-IR, il vino ha subito una completa evaporazione dei suoi componenti volatili (acqua, etanolo) e che i residui non volatili sono probabilmente in ammontare molto basso. La differenza con l'olio è evidente e suggerisce che il vino si sia probabilmente distribuito più uniformemente nelle porosità dei filtri in vetro, producendo un film di residuo fisso, dopo il trattamento termico, molto sottile e non visibile in ATR. La presenza di un residuo organico del vino è comunque evidente dalla colorazione rossastra residua osservabile sul filtro anche dopo il trattamento termico.

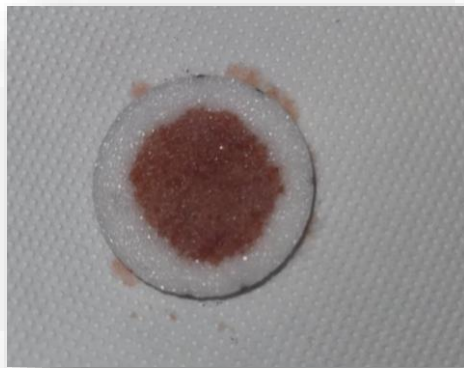


Figura 31 Campione Vycor ancora colorata di vino

1.2 Cocci a perdere

Caratterizzazione preliminare dei cocci senza trattamento

Preliminarmente, si è preceduto ad una caratterizzazione ATR-IR della polvere raschiata dai setti cocci (Campioni 1-8), sia interno che esterno (I ed E), riportati nella *Tabella 2* della sezione Materiali e metodi sperimentali, e mostrati in *Fig.13*, Questa caratterizzazione serviva a identificare i segnali di fondo ed evidenziare eventuali residui organici, trattandosi di campioni autentici e come tali soggetti a possibili contaminazioni o residui di vario tipo. Fondamentalmente, tutti i campioni mostrano segnali confermati dalla letteratura riconducibili ai minerali argillosi della ceramica, come mostrato per i campioni 1I e 1E. Più precisamente, si osserva un segnale dominante intorno a 989 cm^{-1} , attribuibile allo *stretching* Si-O-Si e Si-O-Al di argille feldspatiche, piccoli picchi a 777 cm^{-1} dovuti a quarzo, e una larga la banda a $3350\text{-}3365\text{ cm}^{-1}$ attribuibile all'acqua contenuta nella ceramica. Per alcuni campioni, come per il campione 2I e 2E, si osservano ulteriori segnali dovuti a carbonato di calcio, identificato dallo stretto picco a 873 cm^{-1} , accompagnato da un picco più largo

fra 1400-1430 cm^{-1} . Infine, per altri campioni, come il campione 3I ed E, si osserva una coppia di segnali intorno a 3000 cm^{-1} (*stretching* CH), accompagnata da una piccola banda a 1440 cm^{-1} , verosimilmente attribuibile a qualche residuo organico non meglio identificato (G.E. De Benedetto, 2002). Le figure degli spettri ATR-IR dei campioni 4-8, I ed E, sono riportati in Appendice.

1.2.1 Campioni 1I e 1E, prima del trattamento

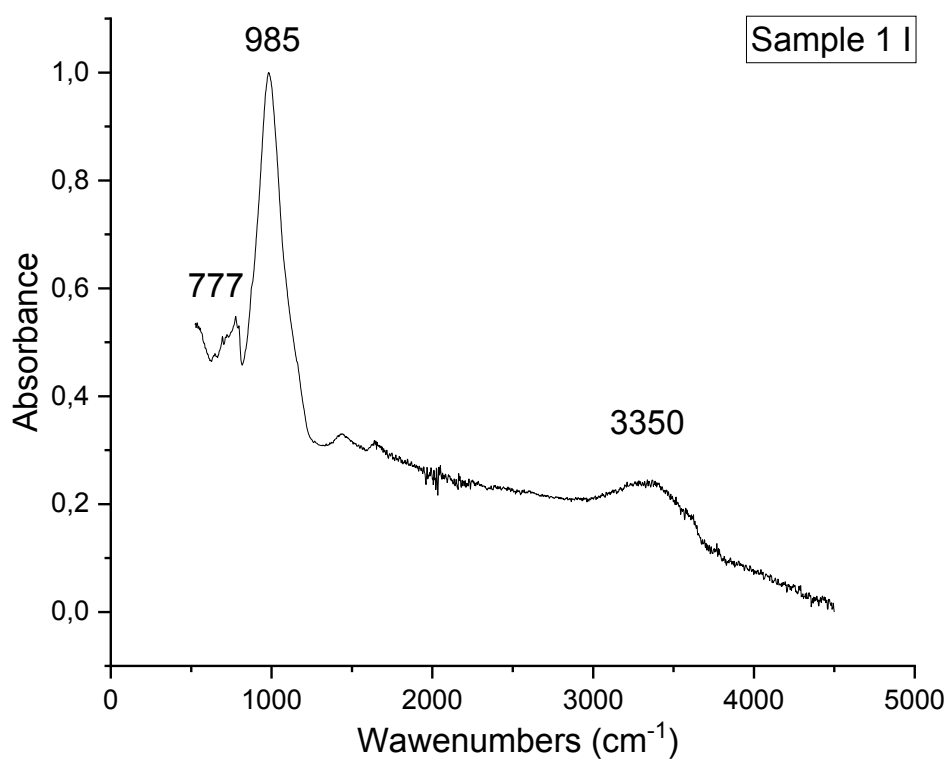


Figura 32 Spettro IR campione 1I

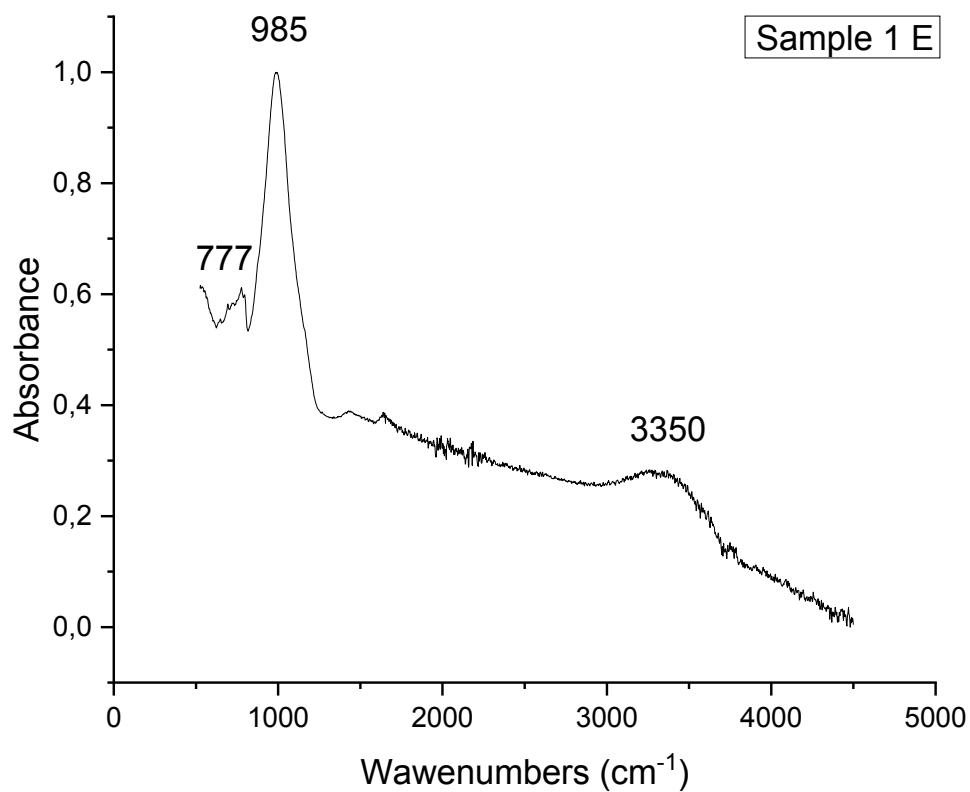


Figura 33 Spettro IR campione 1E

1.2.2 Campioni 2I e 2E, prima del trattamento

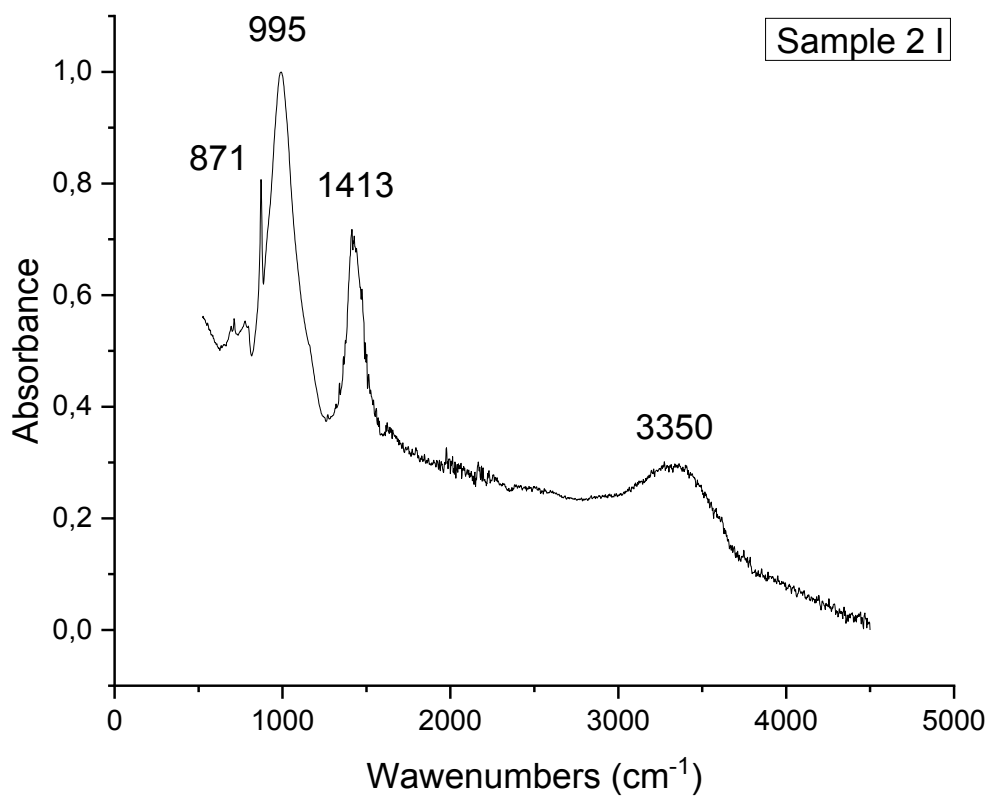


Figura 34 Spettro IR Campione 2I

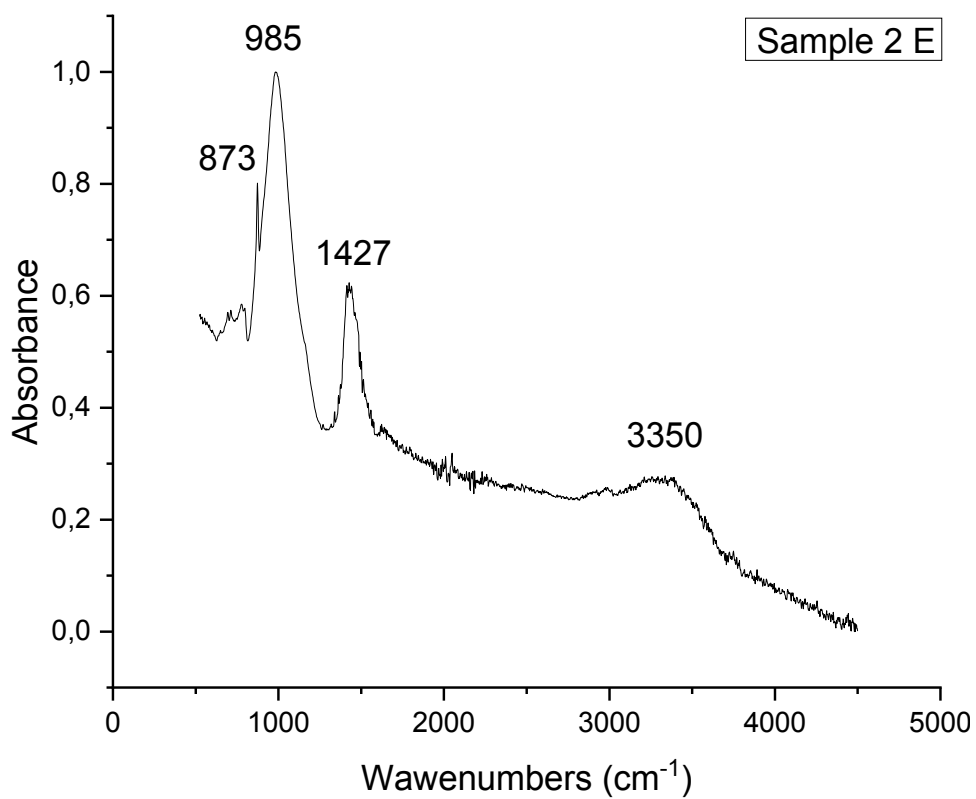


Figura 35 Spettro IR campione 2E

1.2.3 Campioni 3I e 3E, prima del trattamento

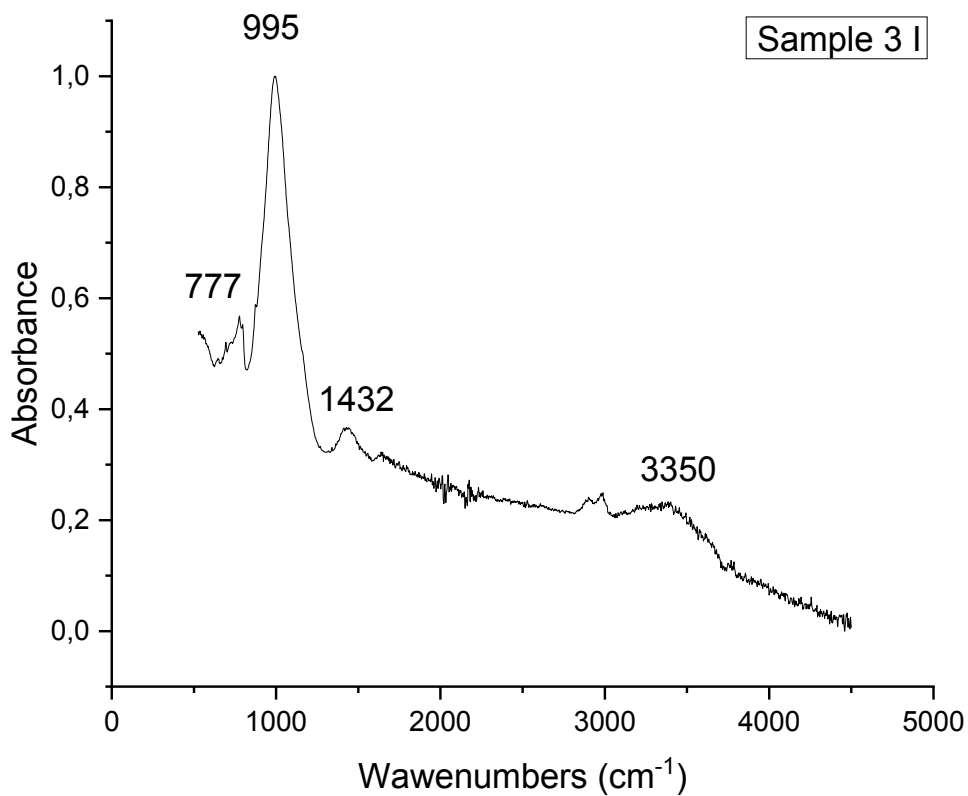


Figura 36 Spettro IR Campione 3I

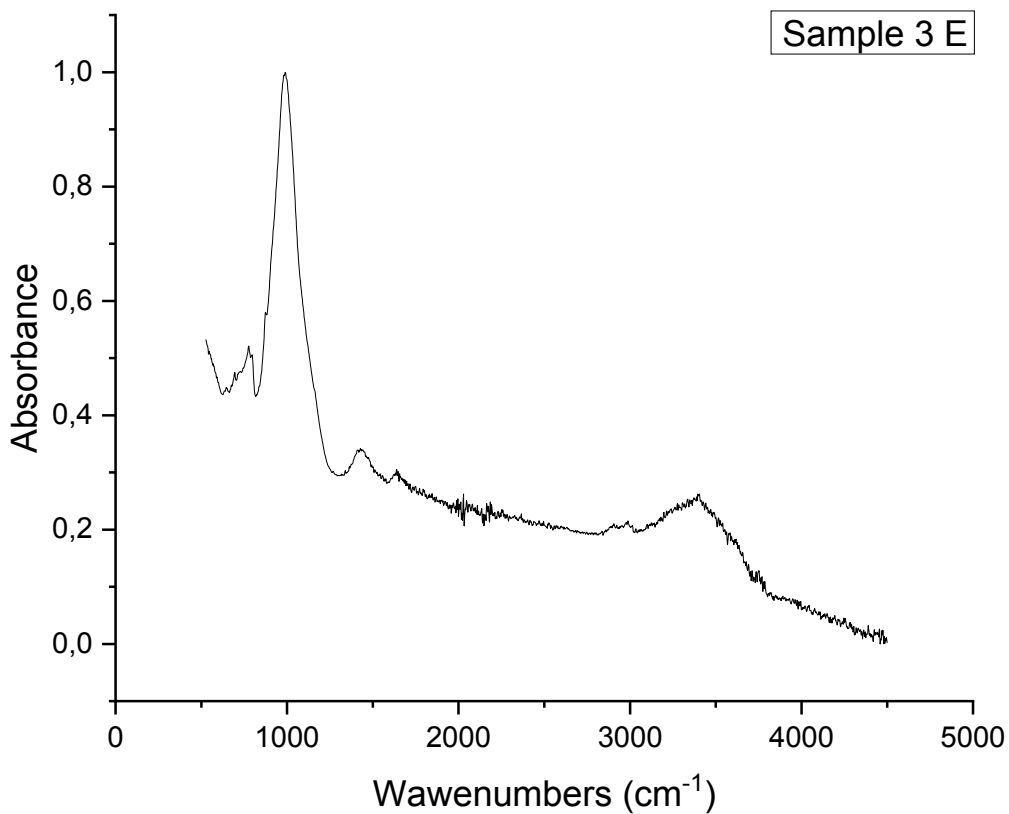


Figura 37 Spettro IR campione 3E

1.3 Caratterizzazione dei campioni trattati

Come riportato nella parte “Materiali e metodi sperimentali”, i campioni di cocchi 1,2,3,4,5,6,7 e 8 sono stati trattati, alternativamente, sulla parte esterna e interna, con olio e vino, e in parte invecchiati, determinando i campioni 1E, 2I, 3E, 4I, 5E, 6I, 7E, 8I riportati in *Tabella 2*. Come riportato in precedenza, ai fini dell’analisi ATR, un piccolo ammontare di polvere è stato raschiato dal frammento.

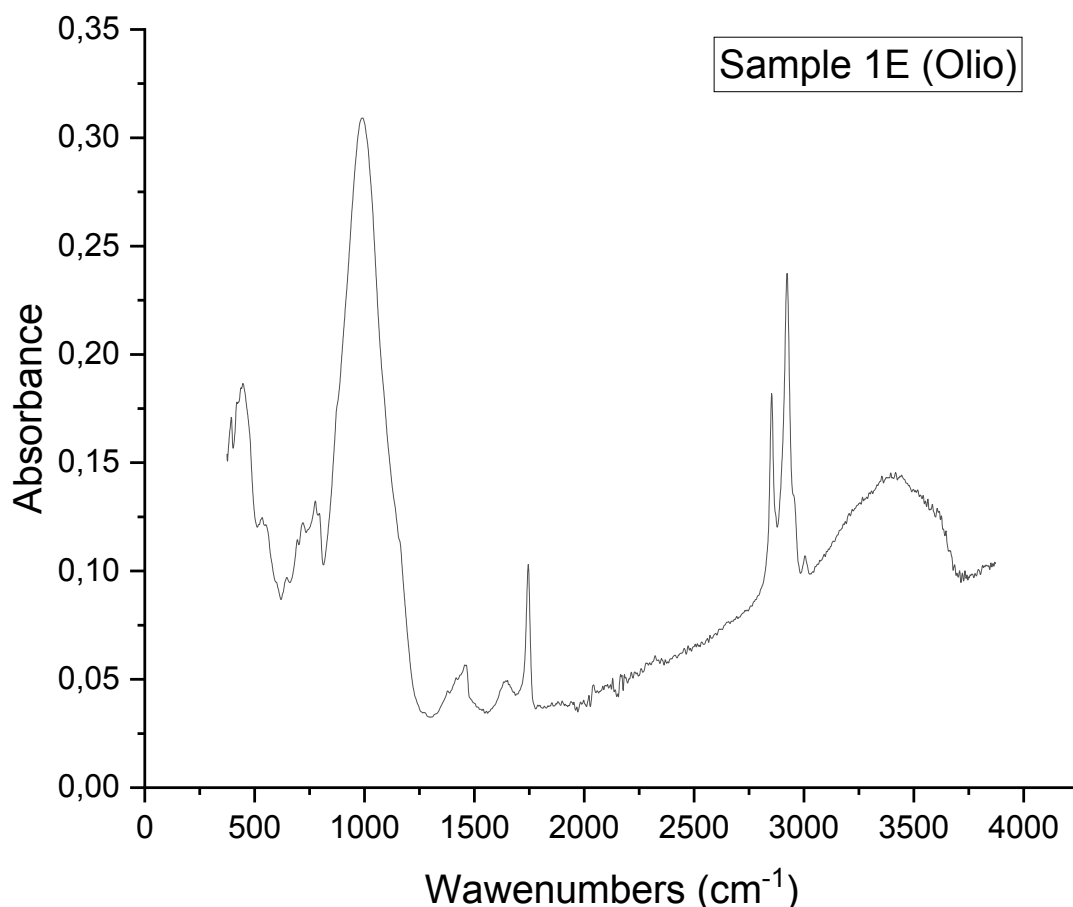


Figura 38 Spettro IR Campione 1E trattato con olio

1.3.1 Campioni 1E e 2I

In *Fig.38* è riportato lo spettro del campione 1E, trattato con olio. È possibile osservare le diverse bande di assorbimento presenti nello spettro dell’olio, già osservate nei campioni Vycor 1 e 2, quali il picco a 3006 cm⁻¹ (*stretching simmetrico* del CH olefinico), a 2962 cm⁻¹ (*stretching asimmetrico* del legame C-H alifatico del gruppo CH₃), insieme ai picchi a 2920 cm⁻¹ e 2854 cm⁻¹, corrispondenti allo *stretching asimmetrico* e *simmetrico* del legame C-H del gruppo alifatico CH₂. Similmente, si osserva il picco già osservato nel campione Vycor 1, a 1746 cm⁻¹, (*stretching* del gruppo funzionale estereo C=O dei trigliceridi). A 1458 cm⁻¹, si osserva una vibrazione di *bending* dei gruppi alifatici CH₂ e CH₃

degli acidi grassi. Il picco a 722 cm^{-1} rappresenta la vibrazione di *rocking* del *cis*-HC=CH- nelle olefine disostituite. Non visibili, invece, i segnali a 1237 , 1141 , 1118 e 1096 cm^{-1} dovuti allo stretching C-O, che si osservano nei campioni Vycor 1 e 2, probabilmente perché coperte dai segnali della ceramica. Lo spettro IR del campione 2I (coccio a perdere con olio, zona interna) è identico al campione 1E, a parte i segnali aggiuntivi legati al carbonato di calcio, parte della matrice ceramica, già osservati nella polvere del frammento non trattato (Fig. 34, 35). Un confronto tra il segnale IR dell'olio e quello della ceramica, indica che i segnali dell'olio nel campione 2I sono relativamente più intensi che nel campione 1E, suggerendo forse (ma il dato andrebbe convalidato da altre misure) una minore porosità della superficie interna, o forse un trattamento di qualche tipo sulla superficie interna del vaso, che ha favorito il ristagno dell'olio alla superficie.

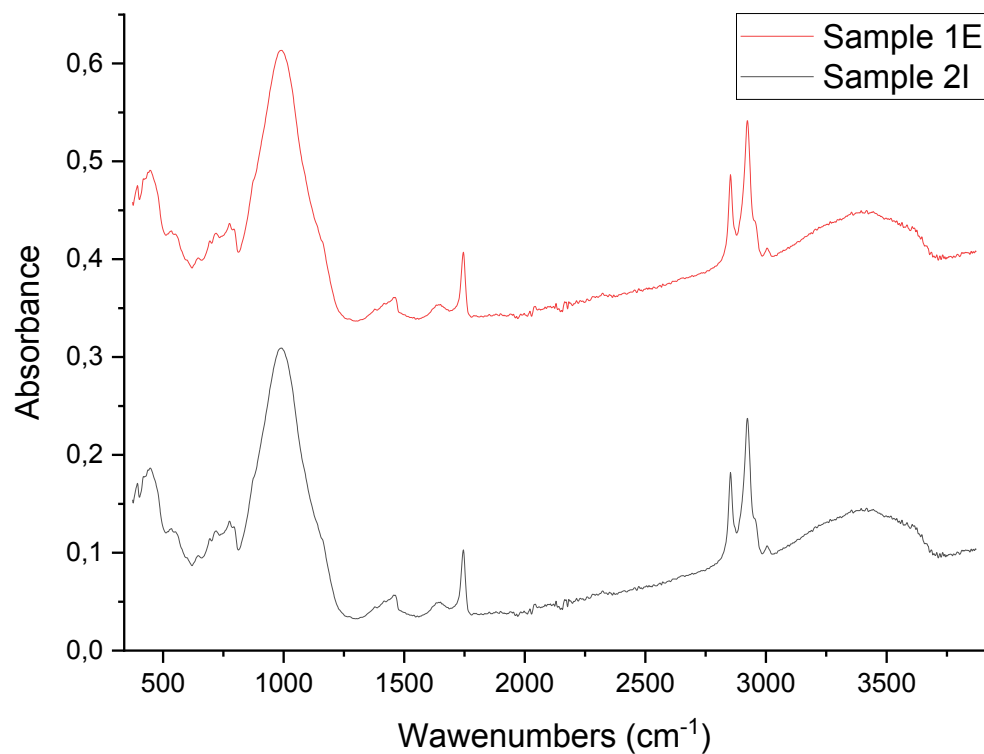


Figura 39 Spettri IR a confronto dei campioni 1E e 2I

Il campione 3I, olio invecchiato, trattamento parte interna, mostra molti dei picchi identificativi dell'olio osservati nel campione con olio fresco (Fig. 39), ed in particolare i segnali legati agli *stretching* dei CH alifatici. Tuttavia, l'intensità relativa dei segnali dell'olio rispetto a quelli della ceramica appare più bassa che nel campione 2I o 1E. Inoltre, il picco a 3006 cm^{-1} risulta quasi assente. In parte, questo effetto potrebbe essere correlato ad una maggiore degradazione dell'olio nel supporto ceramico, rispetto al filtro Vycor, ma in parte potrebbe essere legato alla diffusione dell'olio all'interno delle porosità del materiale in seguito al riscaldamento.

1.3.2 Campioni 3I e 4E

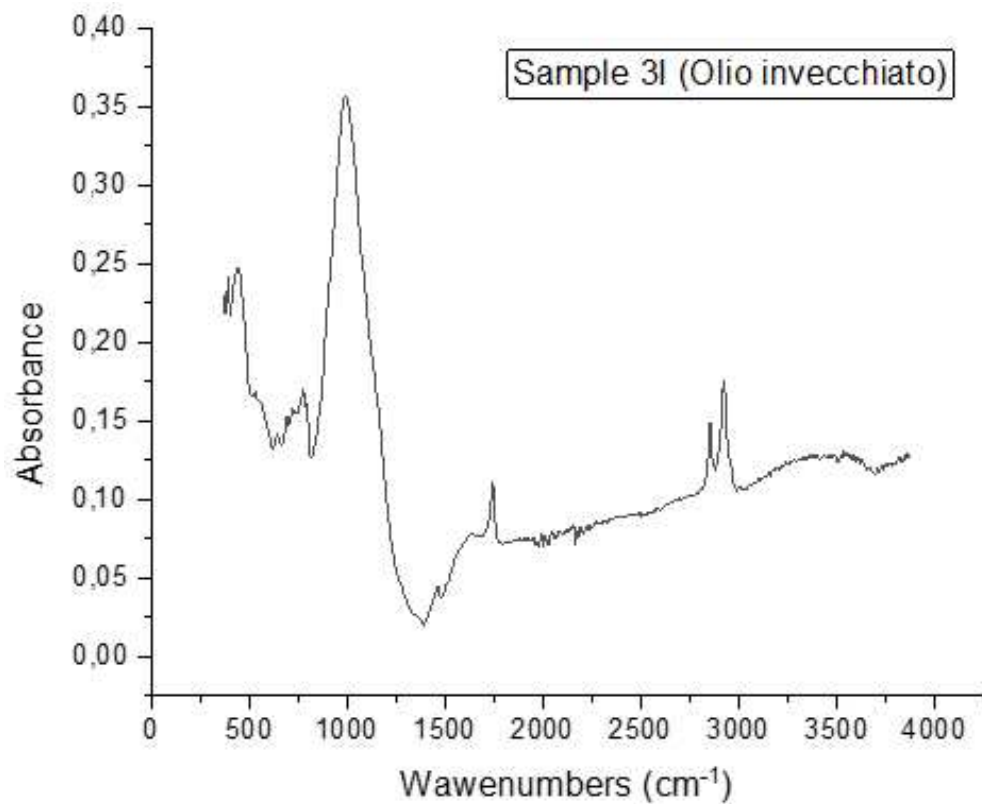


Figura 40 Spettro IR campione 3I trattato con olio

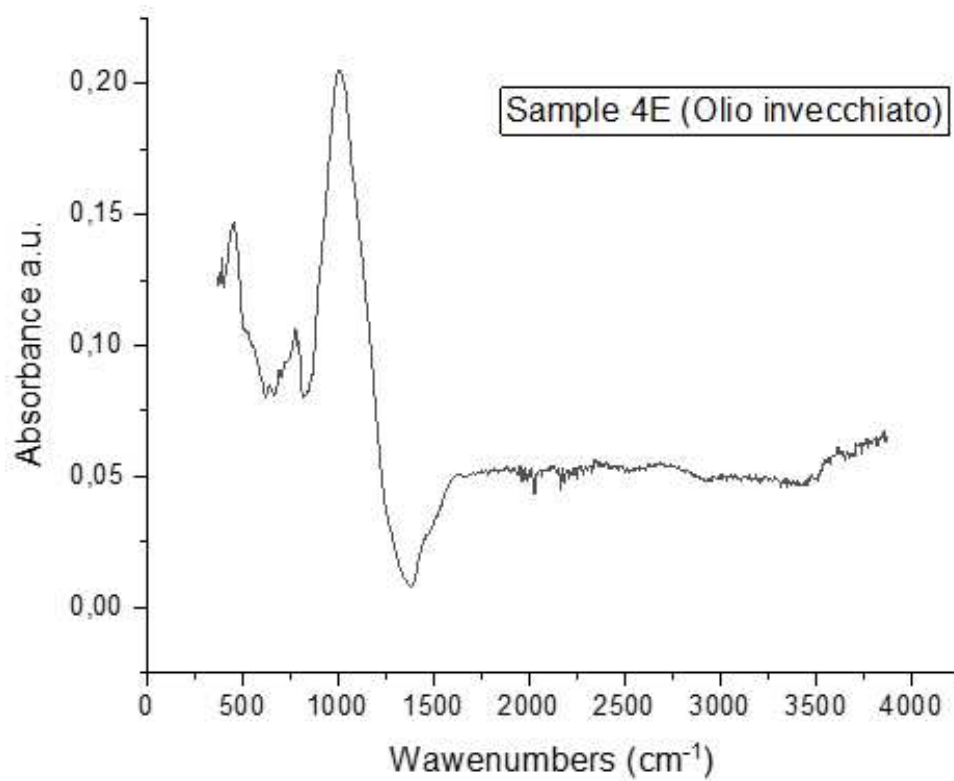


Figura 41 Spettro IR campione 4E trattato con olio

Nel campione 4E (Fig.40) olio invecchiato, trattamento sulla superficie esterna, emerge un dato interessante: non si evidenziano picchi spettrali associabili all'olio, ma ogni spettro è unicamente attribuibile alla firma spettrale della matrice ceramica, contrariamente a quanto osservato nel campione 3I. Tale discrepanza sembra confermare una differenza significativa nella deposizione dell'olio sulla superficie esterna rispetto a quella interna, soprattutto considerando l'effetto del trattamento di invecchiamento. Il trattamento termico ha probabilmente favorito una diffusione dell'olio nei pori della ceramica, sulla superficie esterna del coccio, ad una maggiore profondità rispetto a quanto avvenuto sulla superficie interna, tale che il raschiamento superficiale ha raccolto solo una frazione trascurabile del residuo oleoso.

1.3.3 Campioni 5I e 6E

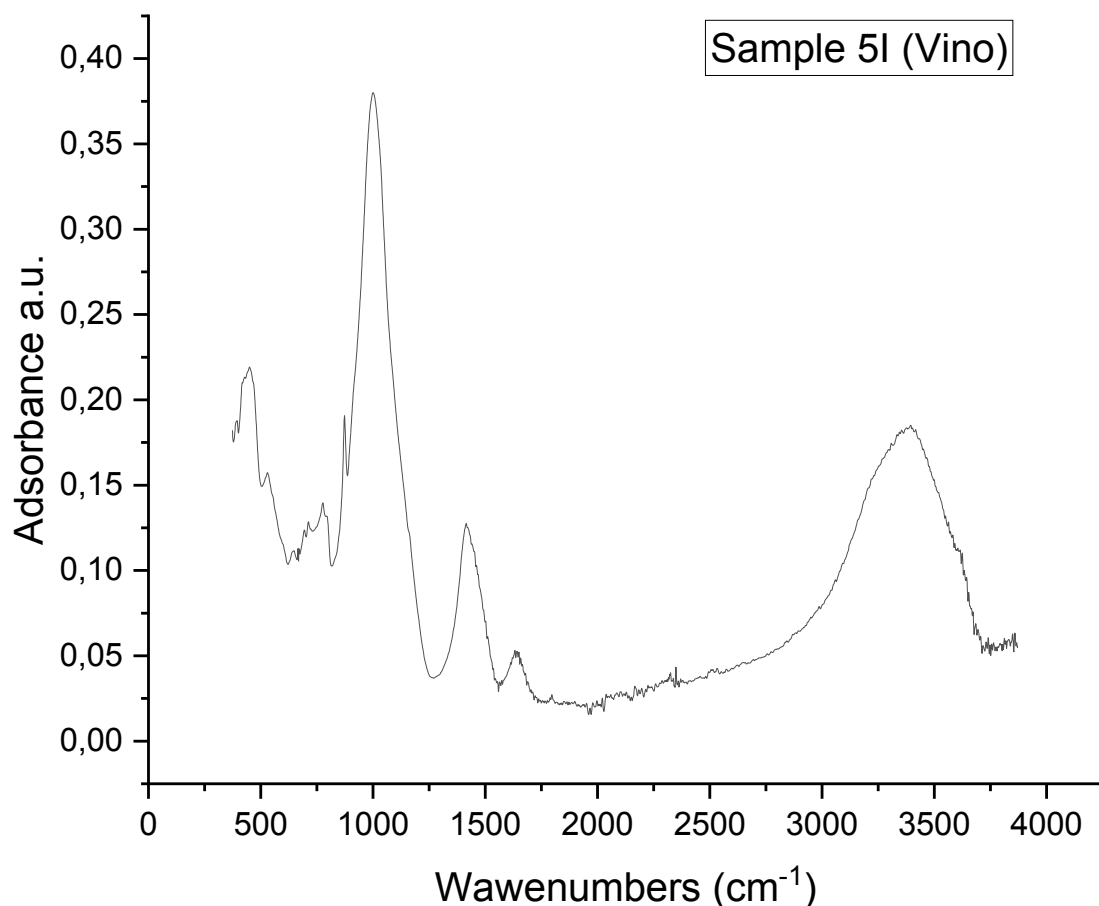


Figura 42 Spettro IR campione 5I trattato con vino

L'analisi degli spettri IR del campione 5I (Fig. 5I), vino, trattamento della superficie interna, ha evidenziato la presenza di due picchi significativi: uno a 1620 cm⁻¹ e l'altro a 3340 cm⁻¹, attribuibili rispettivamente al *bending* dell'acqua e allo *stretching* di gruppi OH, legati a idrogeno, presenti nell'acqua o in altre componenti del vino. Tuttavia, analogamente a quanto visto nel campione

Vycor 5, l'assenza dei segnali di *stretching* del CH e del carbonile indica che molto probabilmente lo spettro IR osservato derivi principalmente dall'acqua presente nel vino.

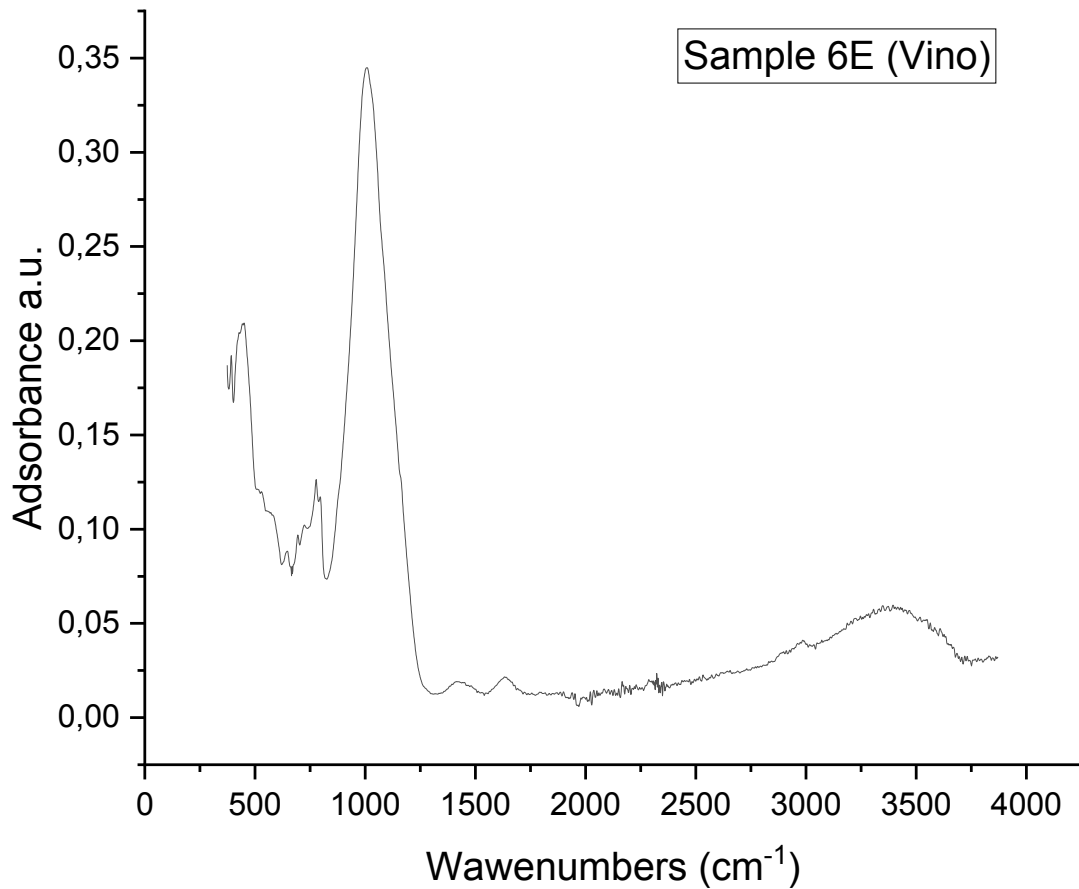


Figura 43 Spettro IR campione 6E trattato con vino

Molto interessante è il confronto con il campione 6E, dove il vino è stato depositato sulla superficie esterna del coccio: si osservano i medesimi segnali a 1620 cm⁻¹ e 3340 cm⁻¹, ma, come osservato nel confronto interno-esterno con l'olio, la minore intensità relativa di questi segnali rispetto a quelli della ceramica suggerisce una maggiore permeabilità della superficie esterna, con una maggiore diffusione del liquido all'interno dei pori.

1.3.4 Campioni 7I e 8E

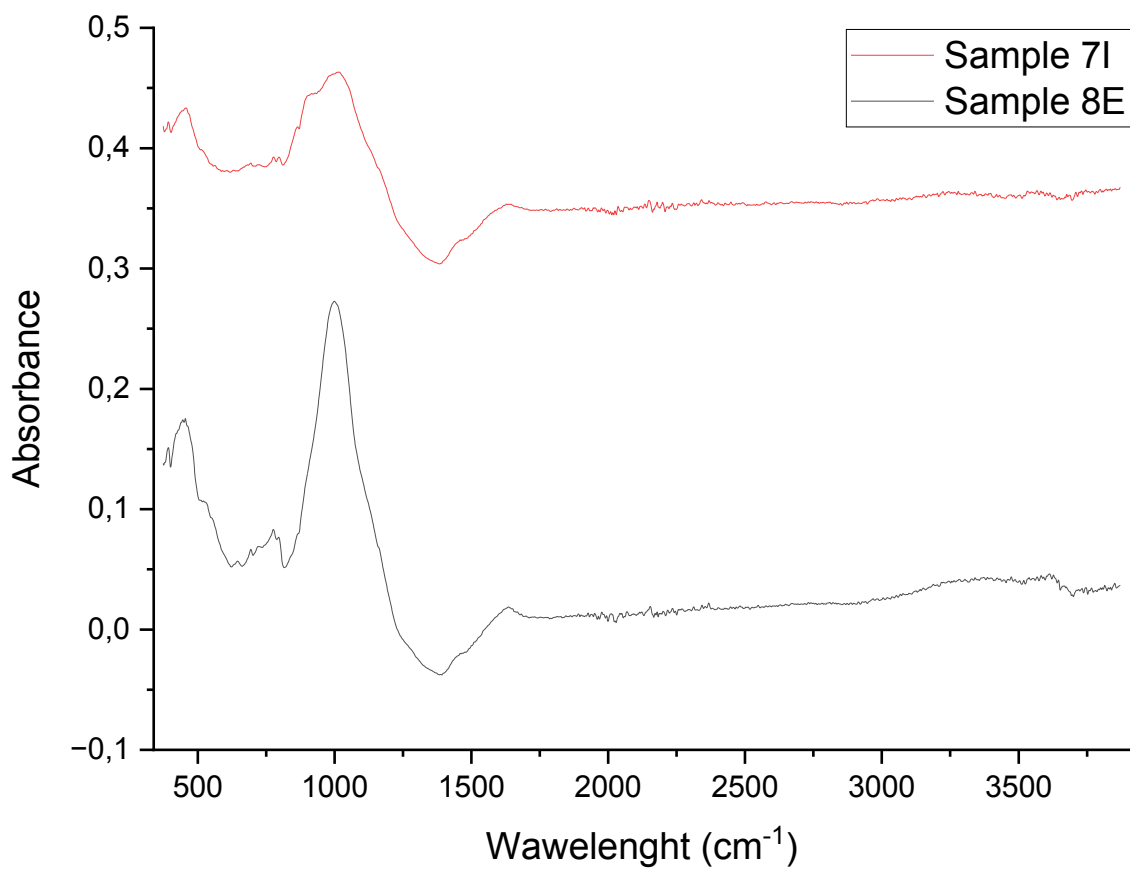


Figura 44 Spettri IR a confronto campione 7I (a) e campione 8E (b)

Infine, quando consideriamo gli spettri IR dei campioni 7I (vino invecchiato, superficie interna, Fig.43 (a)) e 8E (vino invecchiato, superficie esterna, Fig.43 (b)), osserviamo solo i segnali ceramici, come notato con le Vycor, di nuovo indicando che il residuo organico fisso o è completamente degradato o è troppo poco e troppo distribuito nelle porosità per dare un segnale identificabile.

2 Indagine micro-FTIR

Le analisi in infrarosso in modalità microFTIR in riflettanza esterna sono state condotte solo sull'alone, che conteneva l'estratto con miscela cloroformio-etanolo delle polveri di cocci a perdere (si veda il capitolo "Materiali e metodi sperimentali", sezione "Procedura di acquisizione degli spettri IR" per i dettagli).

2.1 Campioni 1E e 2I

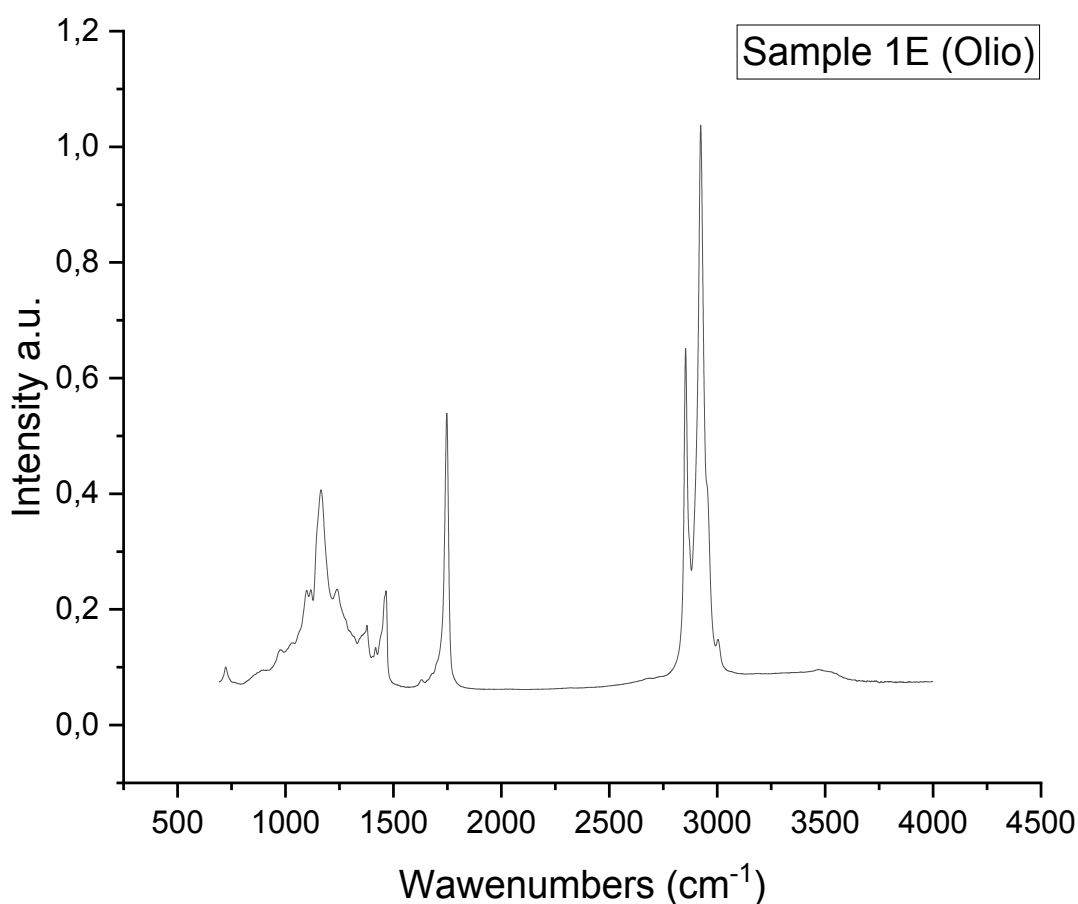


Figura 45 Spettro micro-FTIR campione 1E

Nell'alone del campione 2I sono stati individuati diversi picchi spettrali caratteristici dell'olio d'oliva (Fig.45). La banda di assorbimento a 3006 cm^{-1} è associata allo *stretching simmetrico* del doppio legame C=C degli acidi grassi insaturi come l'acido oleico e linoleico. La spalla a 2962 cm^{-1} corrisponde allo *stretching asimmetrico* del legame C-H alifatico del gruppo CH_3 dei trigliceridi. Inoltre, sono stati osservati picchi a 2920 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} , attribuiti allo *stretching asimmetrico* e *simmetrico* del legame C-H del gruppo alifatico CH_2 degli acidi grassi. La banda a 1746 cm^{-1} è riconducibile allo *stretching* del gruppo funzionale estereo C=O dei trigliceridi, mentre la spalla a 1710 cm^{-1} indica lo *stretching* del gruppo carbonilico C=O degli acidi grassi liberi. La banda a 1654

cm^{-1} è associata allo *stretching* del legame C=C delle olefine cis-disostituite degli acidi grassi. Le vibrazioni di *bending* dei gruppi alifatici CH_2 e CH_3 sono evidenti a 1458 cm^{-1} , mentre il picco a 1376 cm^{-1} corrisponde alla vibrazione di *bending simmetrico* del gruppo CH_2 . Le bande di assorbimento a 1237 cm^{-1} , 1141 cm^{-1} , 1118 cm^{-1} e 1096 cm^{-1} sono attribuite allo *stretching* dei gruppi esterei C-O, che sono presenti nella composizione degli esteri degli acidi grassi. Infine, le vibrazioni di *bending* a 914 cm^{-1} e 722 cm^{-1} indicano la presenza di gruppi cis-HC=CH- e trans nelle olefine disostituite dell'olio d'oliva.

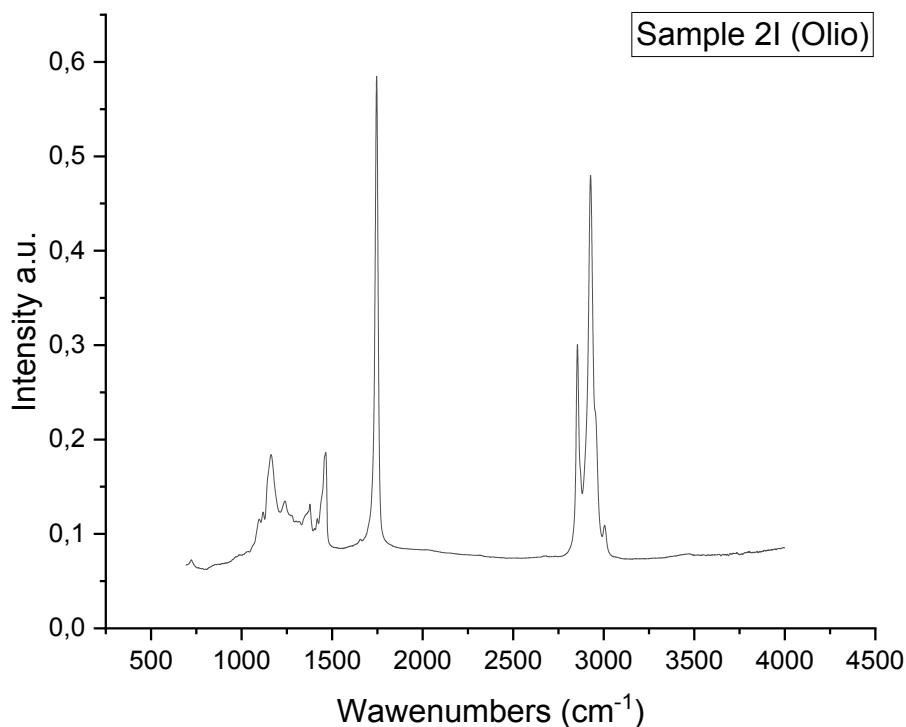


Figura 46 Spettro micro-FTIR campione 2I

L'analisi dello spettro IR del campione 2I rivela la presenza dei medesimi picchi riscontrati nel campione precedente, a parte una certa differenza di intensità e un non perfetto fasamento dei picchi nella zona a basso numero d'onda, fra 1000 e 1200 cm^{-1} . Questo conferma così la buona riproducibilità dell'esperimento. Un'interessante osservazione riguarda la presenza il picco a 1746 cm^{-1} con un'intensità maggiore rispetto al campione precedente.

Nel complesso, è da notare che la metodica di analisi microFTIR su alone, ottenuto con estrazione con solvente, consente di ottenere uno spettro IR "pulito", con tutti i picchi attesi per l'olio, anche quelli presenti nella zona a basso numero d'onda (600 - 1500 cm^{-1}). Questa zona risultava invece preclusa nelle analisi dirette mediante ATR-IR sulle polveri, a causa dei dominanti segnali IR della matrice vetrosa (nelle Vycor) o ceramica (nei cocci a perdere).

2.2 Campioni 3I e 4E

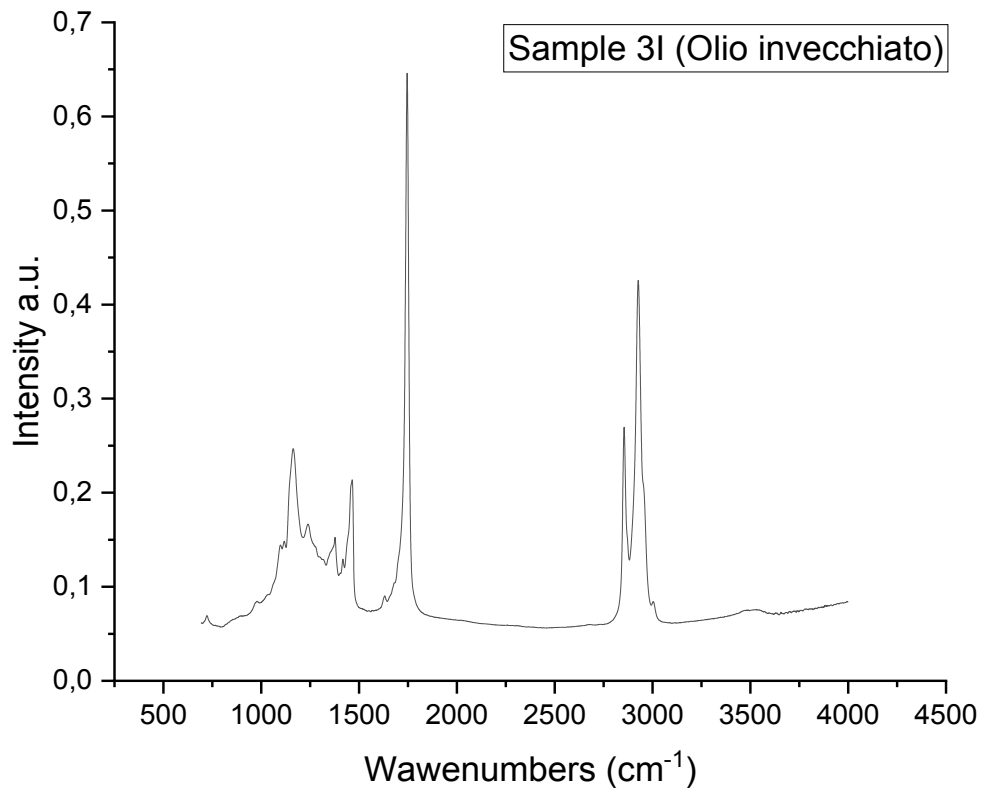


Figura 47 Spettro micro-FTIR campione 3I

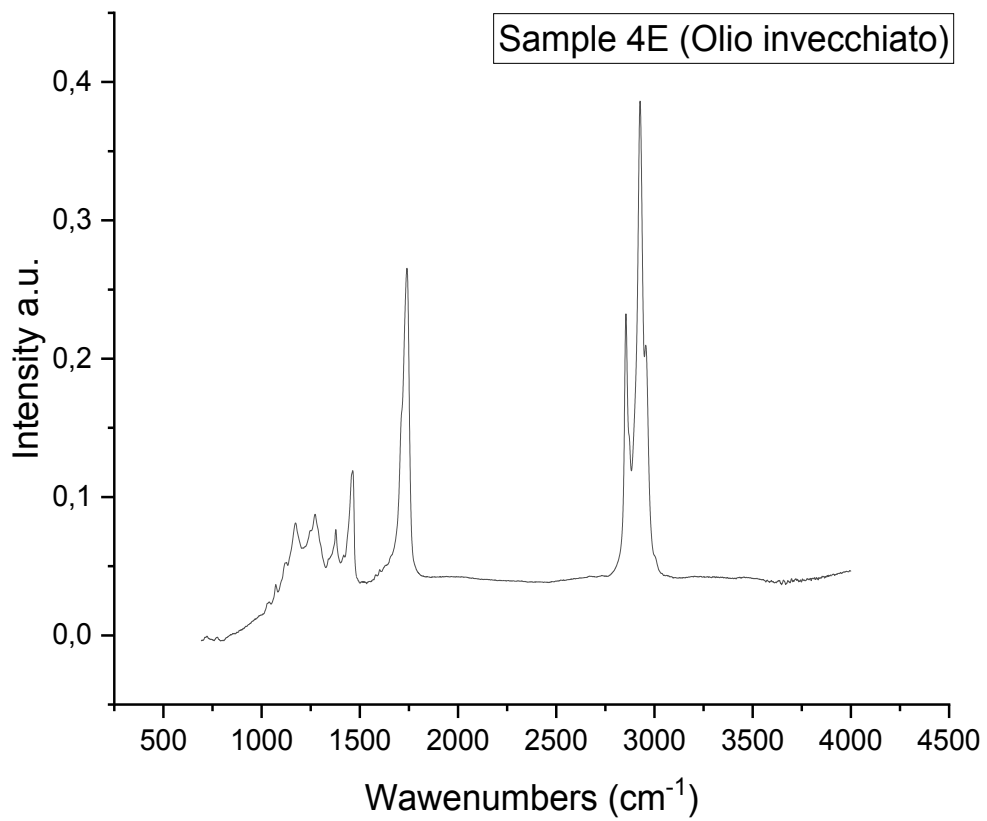


Figura 48 Spettro micro-FTIR campione 4E

L'analisi degli aloni estratti dai campioni 3I e 4E (Fig.46-47) ha mostrato che i picchi spettrali dell'olio sono rimasti pressoché identici a quelli dei campioni contenenti olio non invecchiato, confermando quanto emerso anche nell'analisi in modalità ATR-IR. Questo suggerisce che l'effetto d'invecchiamento applicato ai campioni probabilmente non è stato sufficiente. Inoltre, non sono state rilevate differenze sostanziali tra la parte interna e la parte esterna dei campioni, indicando che l'applicazione dell'olio su diverse parti del coccio non ha influenzato in modo significativo i picchi spettrali. Tuttavia, un confronto tra parte interna ed esterna, sui campioni con olio e olio invecchiato, evidenzia alcuni aspetti interessanti: il picco degli esteri a 1746 cm^{-1} appare più intenso, rispetto ai segnali dei CH, nel campione estratto dalla parte interna rispetto all'esterno e nel caso dell'olio invecchiato appare più largo nell'estratto della parte esterna rispetto alla parte interna.

2.3 Campioni 5I e 6E

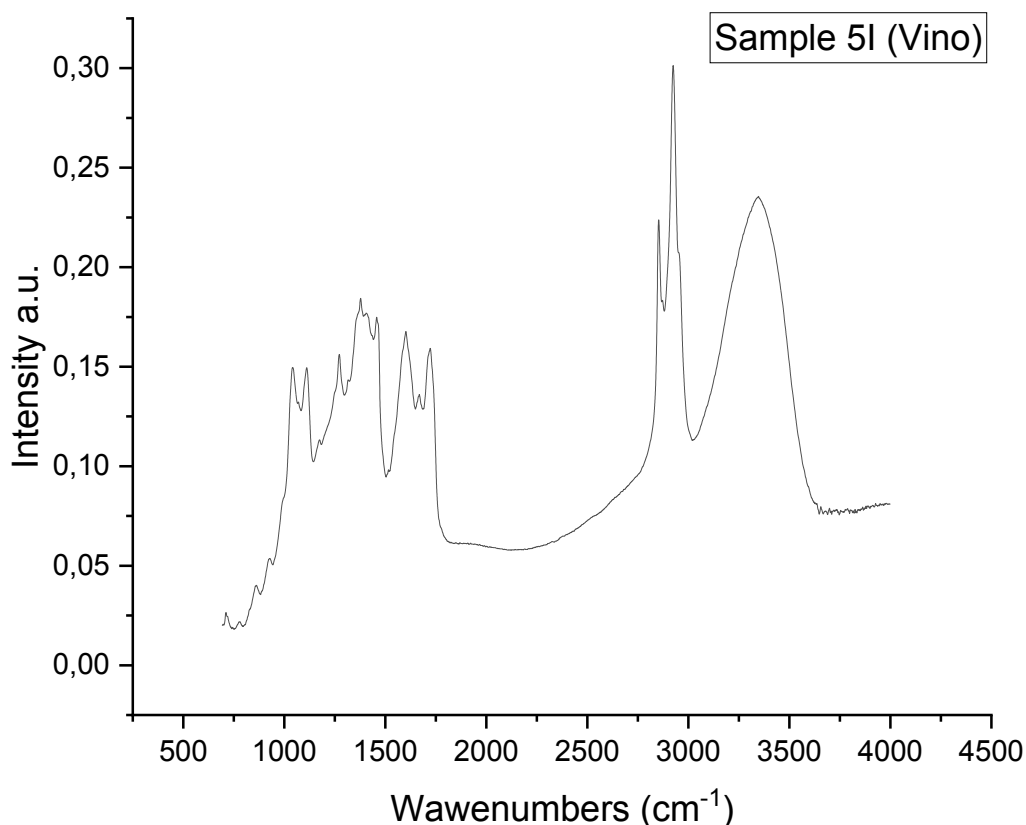


Figura 49 Spettro micro-FTIR campione 5I

L'analisi dell'alone del campione 5I (trattato con vino) offre risultati di grande interesse, in quanto evidenzia in modo chiaro segnali correlati alle componenti chimiche del vino, eliminando le ambiguità di attribuzione dei segnali IR alla matrice. Infatti, l'analisi dell'alone esclude che i segnali derivino dai componenti più volatili (etanolo), visto che è condotta quando l'alone è asciutto, ed esclude naturalmente i contributi della matrice vetrosa o ceramica. È osservabile una banda

significativa intorno a 3400 cm^{-1} , che indica lo *stretching* degli atomi di ossigeno legati a gruppi -OH. Questa caratteristica è tipica degli alcoli e dei fenoli presenti nel vino e suggerisce la presenza di tali gruppi funzionali nel campione analizzato, ed in particolare può essere ricondotta a fenoli, tannini, carboidrati o altri componenti a maggiore peso molecolare. La coppia di picchi a 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} essere attribuita ai legami C-H delle catene alifatiche, inclusi gruppi metilici (-CH₃) e legami C-H alifatici. È possibile osservare un picco a 1725 cm^{-1} , che può essere attribuito al carbonile C=O di acidi carbossilici, caratteristico, per es., dell'unità galloilica degli idrolizzati tanninici presenti nel vino, mentre il picco a 1658 cm^{-1} è correlabile allo *stretching* di gruppi carbossilati. I picchi a 1604 cm^{-1} e 1444 cm^{-1} possono essere attribuiti a vibrazione di anello in strutture aromatiche, forse riconducibile a polifenoli. Il picco a 1108 cm^{-1} è attribuibile allo *stretching* del C-O, come il picco a 1046 cm^{-1} , riconducibili entrambi a gruppi C-OH di polifenoli o carboidrati.

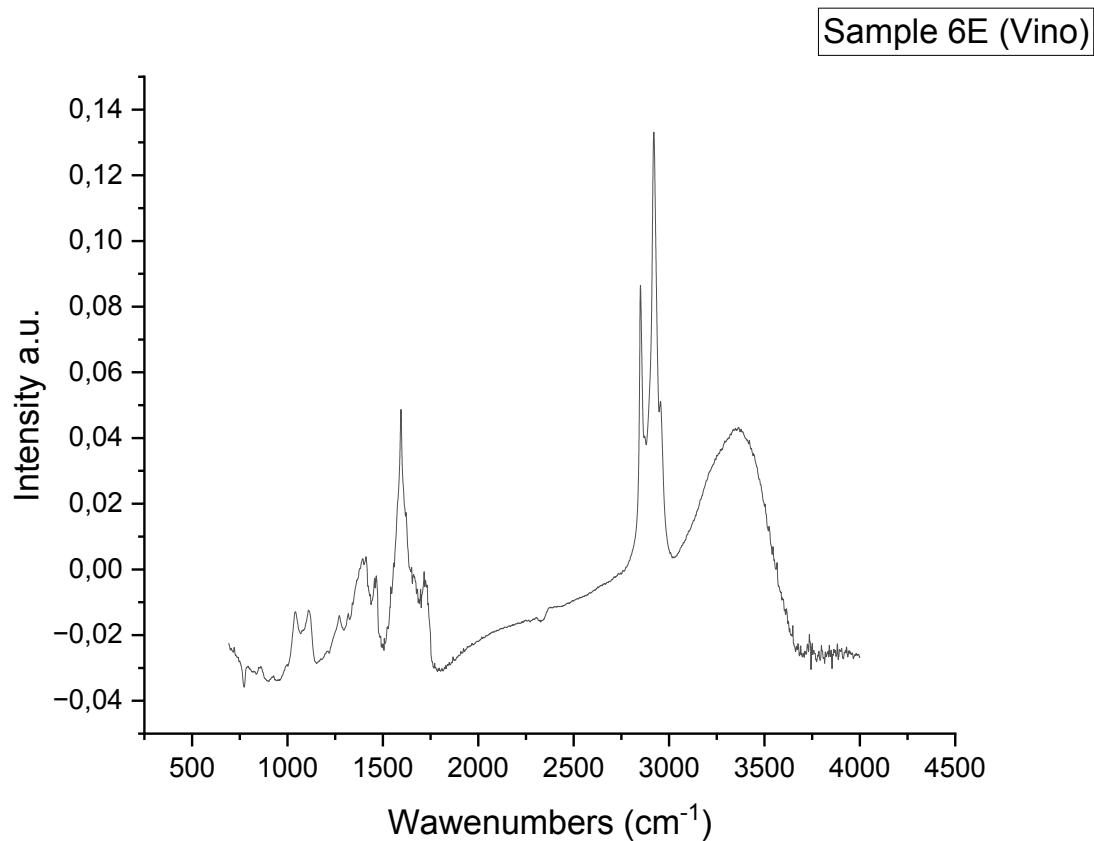


Figura 50 Spettro micro-FTIR campione 6E

Nell'analisi dell'alone del campione 6E si osserva sostanzialmente lo spettro osservato per il campione 5I; tuttavia, alcuni dei segnali appaiono avere un'intensità relativa diversa, in linea con quanto osservato anche per l'olio.

2.4 Campioni 7I e 8E

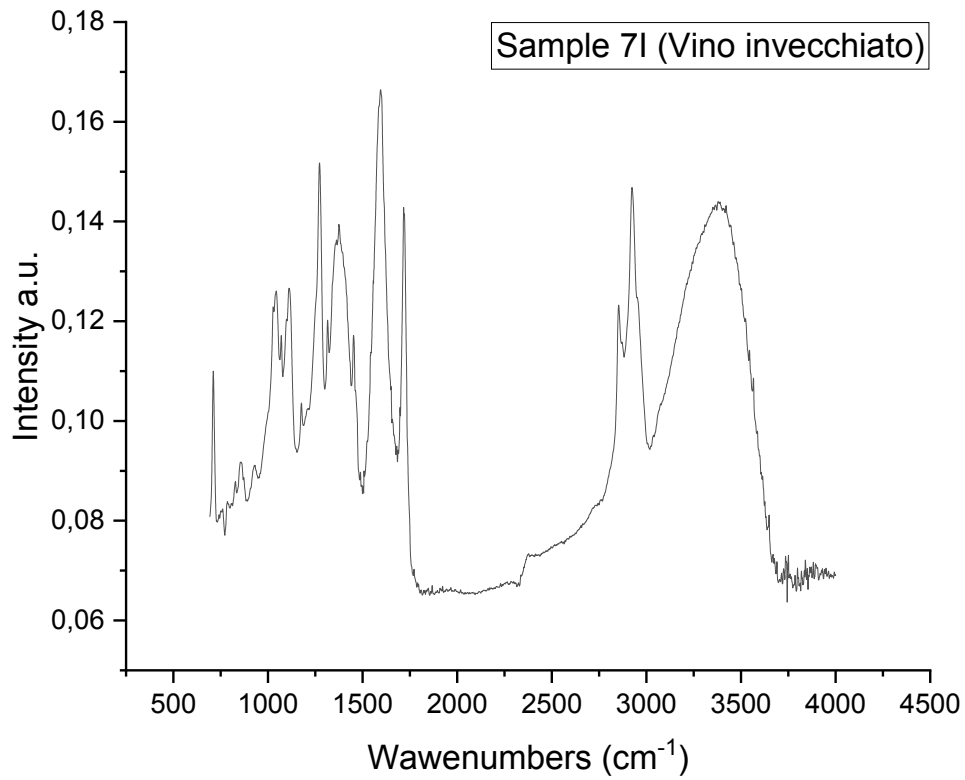


Figura 51 Spettro micro-FTIR campione 7I

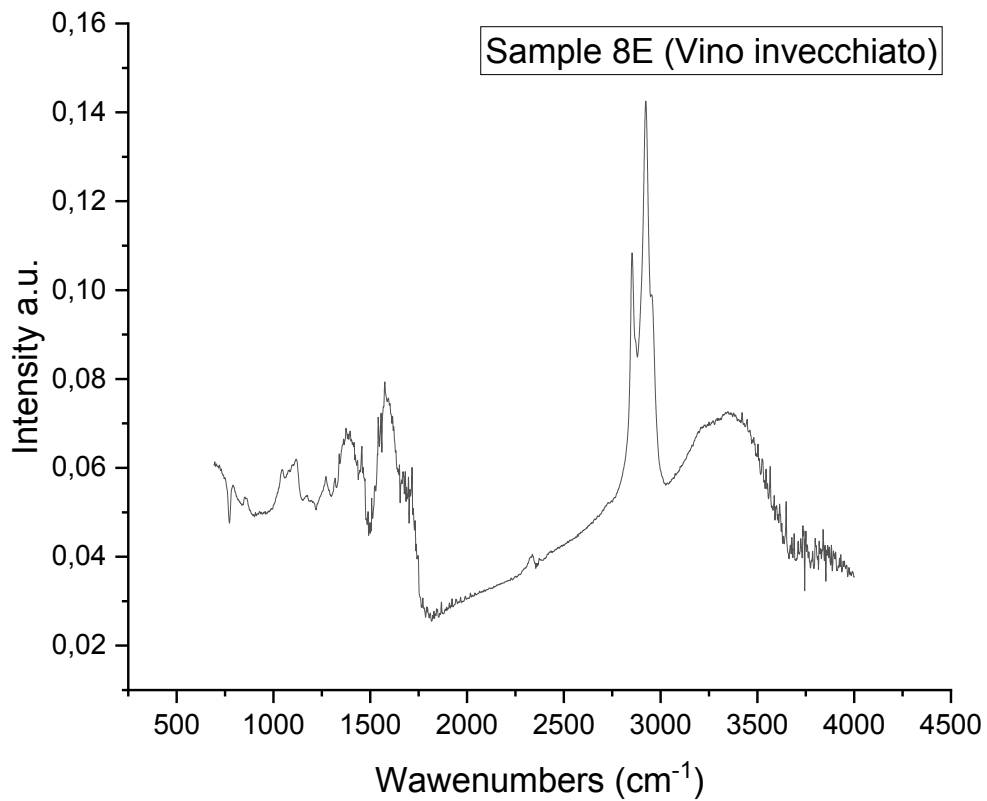


Figura 52 Spettro micro-FTIR campione 8E

L'analisi micro-FTIR degli aloni nei campioni 7I e 8E evidenzia spettri simili a quelli dei campioni 5I e 6E, con la banda dello *stretching* OH (3400 cm^{-1}), i segnali degli *stretching* CH delle catene alifatiche (picchi a 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1}), e un gruppo di picchi fra 600 e 1800 cm^{-1} . In questa zona, appare importante confrontare il campione 7I e il campione 5I: nel campione 7I vi sono numerosi deboli picchi, assenti in 5I, indicativi di sottoprodotti formati in seguito al degrado termicamente indotto. Nel campione 8E, tutti i picchi fra 600 e 1800 cm^{-1} appaiono allargati in bande poco definite, suggerendo nuovamente che i composti organici nella parte interna ed esterna del coccio si distribuiscono in modo differente e/o vadano incontro a processi chimici diversi, rispondendo così anche in modo diverso all'analisi IR.

3. Indagine Raman

L'indagine tramite la strumentazione Raman è stata condotta utilizzando due dispositivi differenti, inizialmente si è lavorato con uno strumento portatile e successivamente con uno fisso.

3.1 Raman portatile

Anche in questo caso, sono state effettuate analisi preliminari, inizialmente sulle Vycor trattate e successivamente sui cocci trattati. Inizialmente, sono stati inclusi nella valutazione anche i cocci a perdere non trattati, al fine di esaminare la matrice e potenzialmente individuare eventuali residui organici. Tuttavia, a causa della presenza di una forte fluorescenza, risultava difficile l'identificazione precisa. Occasionalmente, nei cocci non trattati si sono osservate delle sostanze che bruciavano sotto il laser, quando alzato ad alta potenza, indicando una presenza organica.

All'inizio del processo, sono stati acquisiti gli spettri di riferimento dell'olio, del vino e della Vycor, al fine di stabilire una base di confronto e distinguere eventuali picchi provenienti da queste sostanze.

Nell'ambito delle analisi Raman, in particolare quelle effettuate con uno strumento portatile, si è riscontrata una certa mancanza di affidabilità. Infatti, per vino e cocci, ma anche in misura parziale per l'olio, sono stati individuati dei picchi costanti, che appaiono verosimilmente come artefatti della strumentazione e della procedura di elaborazione degli spettri.

Riferimenti 3.1.1

3.1.1.1 Campione filtro Vycor, non trattato

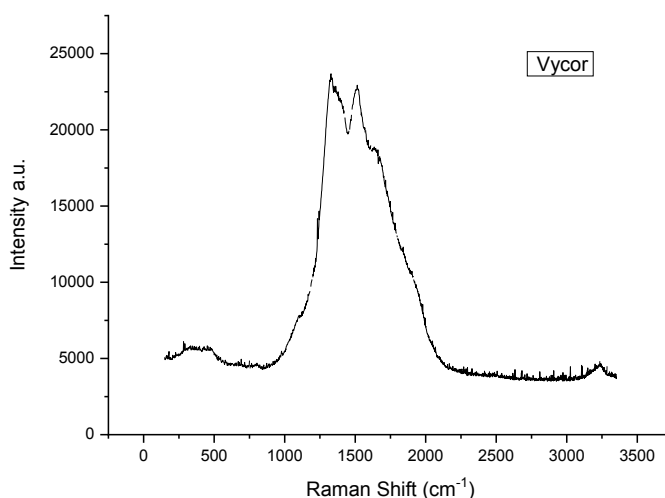


Figura 53 Spettro Raman portatile senza baseline Vycor non trattata

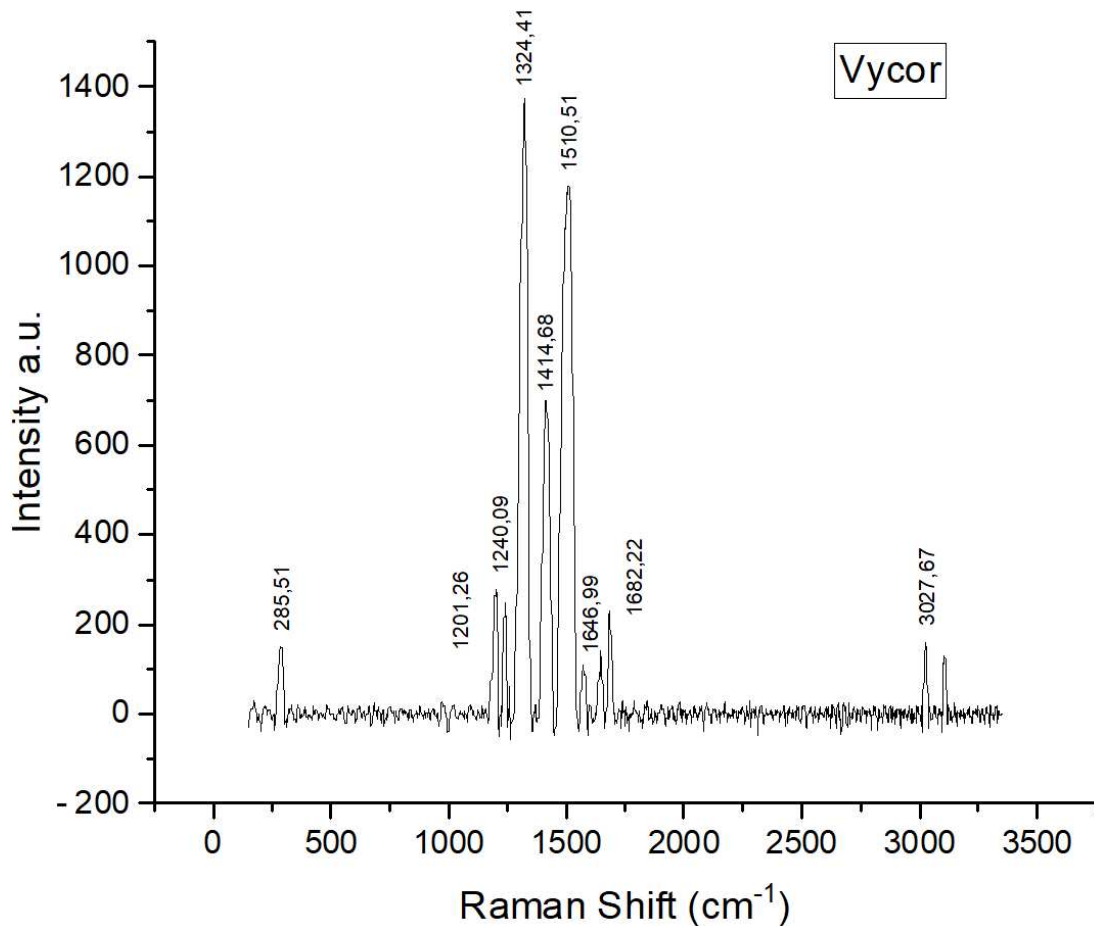


Figura 54 Spettro Raman portatile Vycor non trattata

Le misure sono state condotte con ingrandimento 80 X e potenza del laser pari all' 80%, tempo di integrazione 3 sec. e 30 accumuli. In Fig.52 è riportato lo spettro Raman del filtro Vycor. Si evidenziano delle bande fra 300 e 500 cm^{-1} , che in letteratura sono attribuite al *bending* Si-O-Si nei vetri. Un altro picco rilevante, riportato a circa 1200 cm^{-1} , è attribuito allo *stretching simmetrico* (B_3) o allo *stretching* degli atomi di silicio e ossigeno (Si-O) nella struttura SiO_4 , che qui appare come una spalla: questo picco rappresenta un'importante caratteristica spettrale associata alla composizione chimica specifica del vetro (che però nei nostri spettri appare debole). Il restante intenso segnale fra 1200 e 2000 cm^{-1} è invece legato ad un segnale di fotoluminescenza del vetro, associata con l'uso del laser a 785 nm (Tuschel, 2016). La presenza di questo segnale ha richiesto la correzione della line di base, per la sua rimozione e per evidenziare deboli segnali Raman residui in Fig. 53 non però interamente separabili da picchi dovuti ad artefatti strumentali.

3.1.1.2 Campione Olio

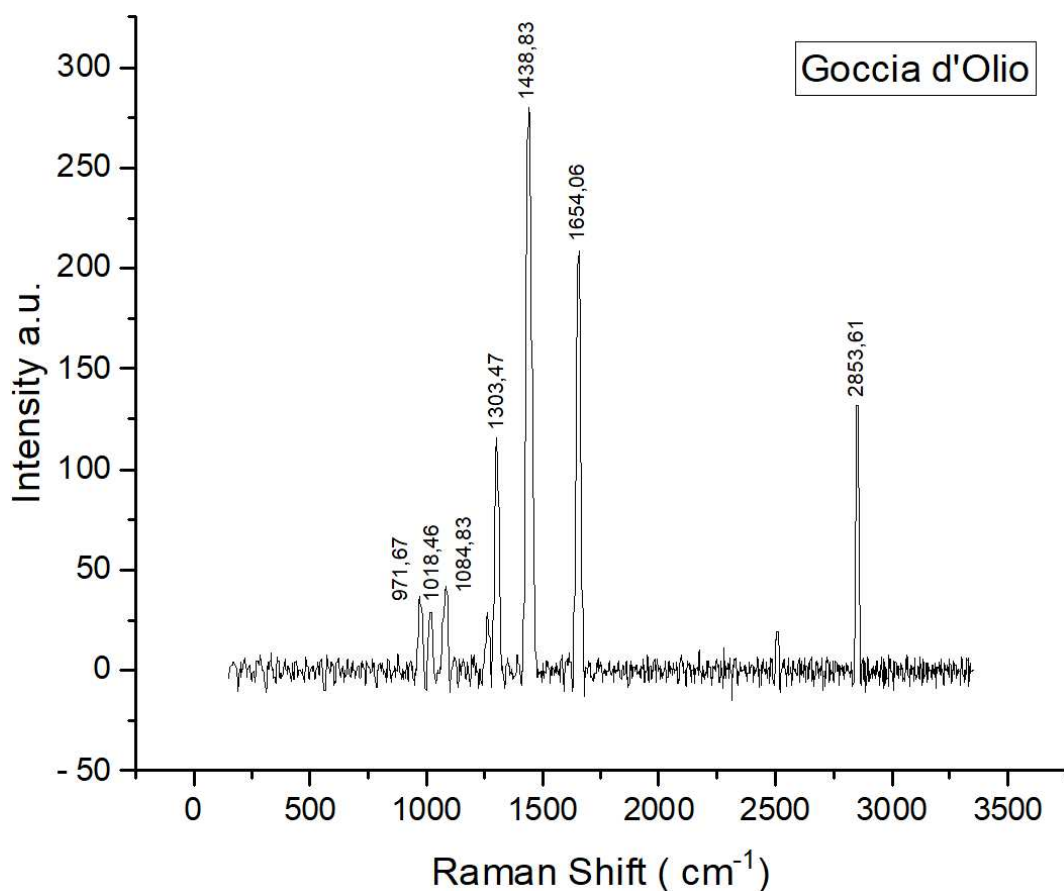


Figura 55 Spettro Raman portatile Olio

Durante l'analisi dell'olio mediante la collocazione di una goccia su un vetrino, sono stati individuati diversi picchi spettrali che sono stati riportati in letteratura come correlati alle vibrazioni specifiche dell'olio stesso. Questo elenco di picchi rappresenta importanti marcatori spettrali che consentono di identificare e caratterizzare le diverse vibrazioni e gruppi funzionali presenti nell'olio (Haoquan Jin, 2021).

Tra i picchi individuati, si è osservato un picco a 970 cm⁻¹, associato alla vibrazione (C-C) fuori dal piano. Successivamente, è stato rilevato un picco a 1018 cm⁻¹, attribuibile alla vibrazione di *bending* dei gruppi alifatici dei trigliceridi. Un ulteriore picco significativo è stato osservato a 1084 cm⁻¹, indicativo dello *stretching* del gruppo (CH₂)_n nel composto (C-C). Altre vibrazioni rilevanti includono il picco a 1265 cm⁻¹, che rappresenta la deformazione del gruppo cis(R-HC=CH-R), e il picco a 1300 cm⁻¹, corrispondente al *bending* del gruppo (CH₂). Inoltre, è stato individuato un picco a 1440 cm⁻¹, che indica lo *scissoring* del gruppo (CH₂), e un picco a 1655 cm⁻¹, attribuito alla vibrazione (C=C) del gruppo cis(RCH=CHR) nelle olefine disostituite. Ulteriori picchi rilevanti comprendono quello a 1750 cm⁻¹, che rappresenta lo *stretching* del carbonile del gruppo estereo dei trigliceridi, e il picco a 2850

cm^{-1} , associato allo *stretching* dei CH. La presenza di questi picchi spettrali, come descritto in letteratura, offre una base di riferimento solida per l'identificazione e la caratterizzazione delle vibrazioni e dei gruppi funzionali presenti nell'olio.

3.1.1.3 Campione Vino

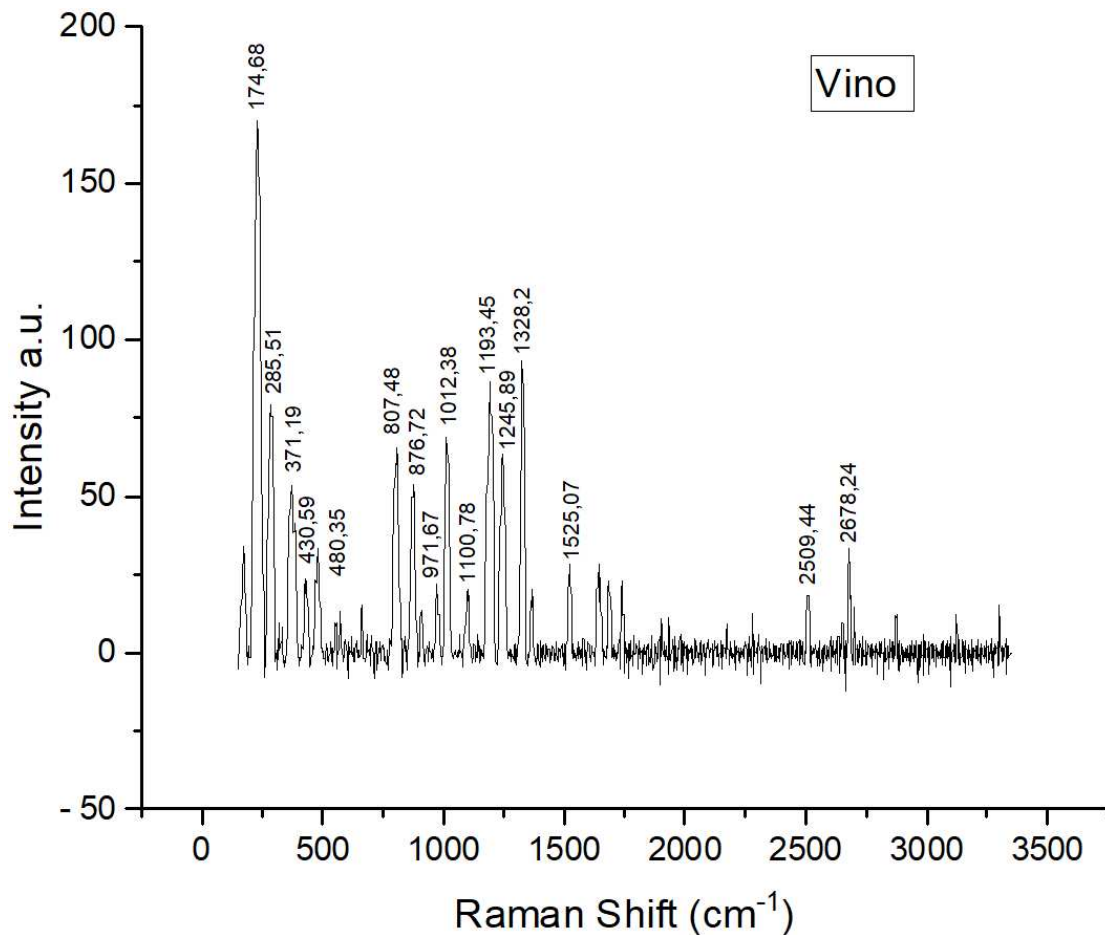


Figura 56 Spettro Raman portatile Vino

Le misure sono state condotte con ingrandimento 80 X, potenza del laser pari al 30%, tempo di integrazione 1 sec. e 10 accumuli.

Dall'indagine Raman sul vino, sono stati riscontrati picchi che hanno trovato corrispondenze con la letteratura. In particolare, i picchi nei range $420\text{-}430\text{ cm}^{-1}$, $880\text{-}890\text{ cm}^{-1}$, $1010\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$, $1100\text{-}1110\text{ cm}^{-1}$ si possono attribuire all'etanolo e corrispondono bene ai picchi a 430, 876, 1012, 1100 cm^{-1} osservati nello spettro Raman in Fig.55. Altri picchi osservati nello spettro sono riconducibili a zuccheri, fenoli e acidi organici.

Benché i picchi spettrali ritrovati nei campioni analizzati siano coerenti con quelli riportati in letteratura, è importante sottolineare che l'attribuzione definitiva di tali picchi al vino risulta complessa, a causa degli artefatti strumentali legati all'uso del portatile, che causano la comparsa

di picchi spuri sovrapposti, e ad una certa variabilità degli spettri Raman quando si sono effettuate misure ripetute sulla goccia di vino: si osservavano leggeri spostamenti della posizione e dell'intensità relativa dei picchi, rendendo incerta la loro attribuzione.

3.1.2 Spettri campioni Vycor

3.1.2.1 Campione Vycor 1 (Olio) [80X 40% 1 sec. 10 acc.]

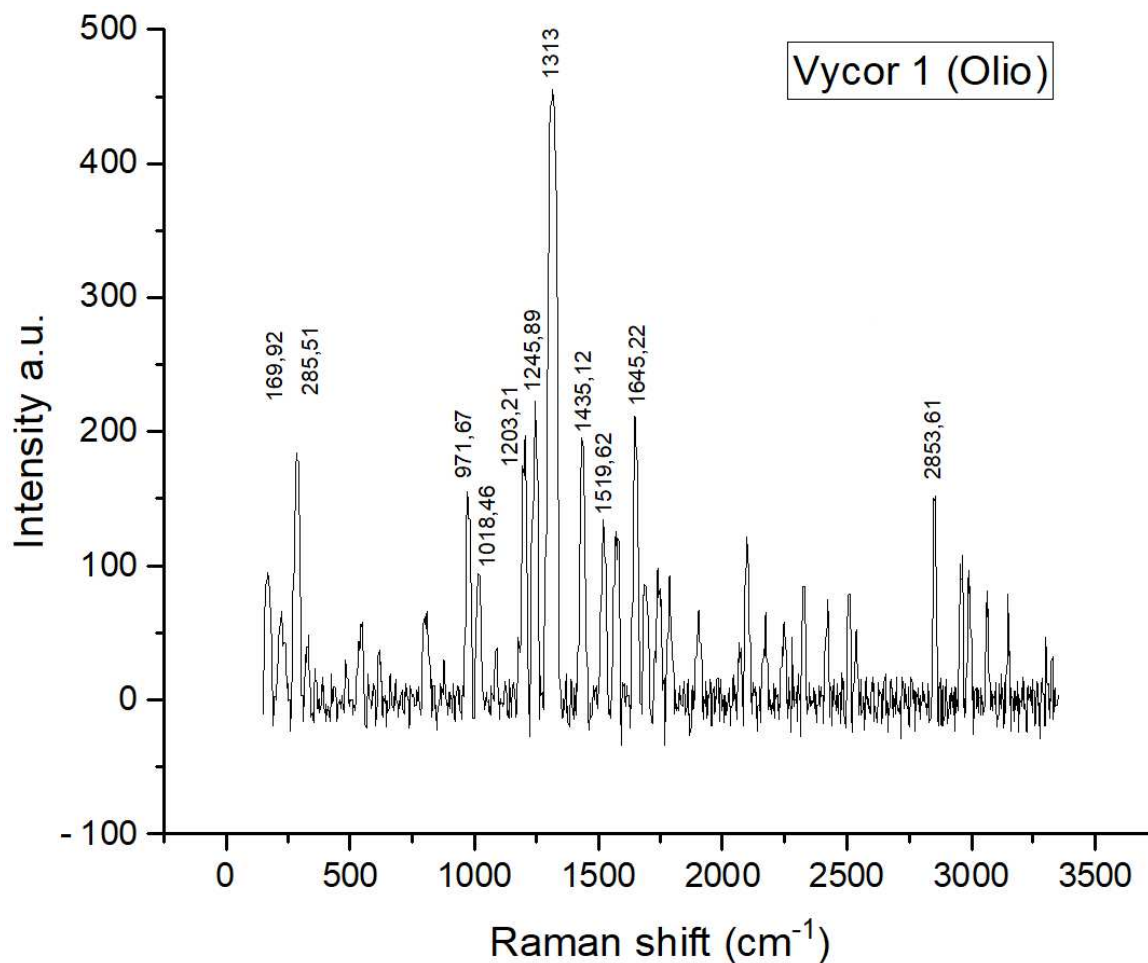


Figura 57 Spettro Raman portatile campione Vycor 1

Tabella 4 Picchi campione Vycor 1

Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
971	-		1203	Stretching simmetrico Si-O
1018	Bending C-C		1245	-
1313	Bending CH ₂		1313	Stretching O-P
1245	Deformation cis(R-HC=CH-R)		1519	-
1435	Scissoring CH ₂		1645	-
1654	C=C di cis(RCH=CHR)			
2853	Bending C-CH ₃			

In tabella sono riportati i principali picchi osservati e la loro possibile attribuzione. Si deve tuttavia osservare che è complesso determinare con precisione l'origine di questi picchi, poiché, sebbene abbiano posizioni coerenti con quelle attese per l'olio o per il vetro Vycor, un confronto tra campioni ripetuti, campione Vycor 1 olio e campione Vycor 2 olio, indica una non perfetta riproducibilità delle loro posizioni. Ad esempio, il picco a 1303 cm⁻¹, osservato nel Raman della goccia d'olio, si trova a 1313 cm⁻¹ nel campione Vycor 1 (Olio) e a 1324 cm⁻¹ nel campione Vycor 2 (Olio). Anche l'intensità relativa dei picchi Raman appare cambiare.

Le stesse prove sono poi state fatte anche con l'estrazione tramite Acetone (sul campione Vycor 1) e con Esano (sulla Vycor 2). Inizialmente sulla Vycor direttamente, poi sulla polvere e infine sull'alluminio nel tentativo di inibire la fluorescenza.

3.1.2.2 Campione Vycor 2 (Olio) [80X 80% 2 sec 20 acc.]

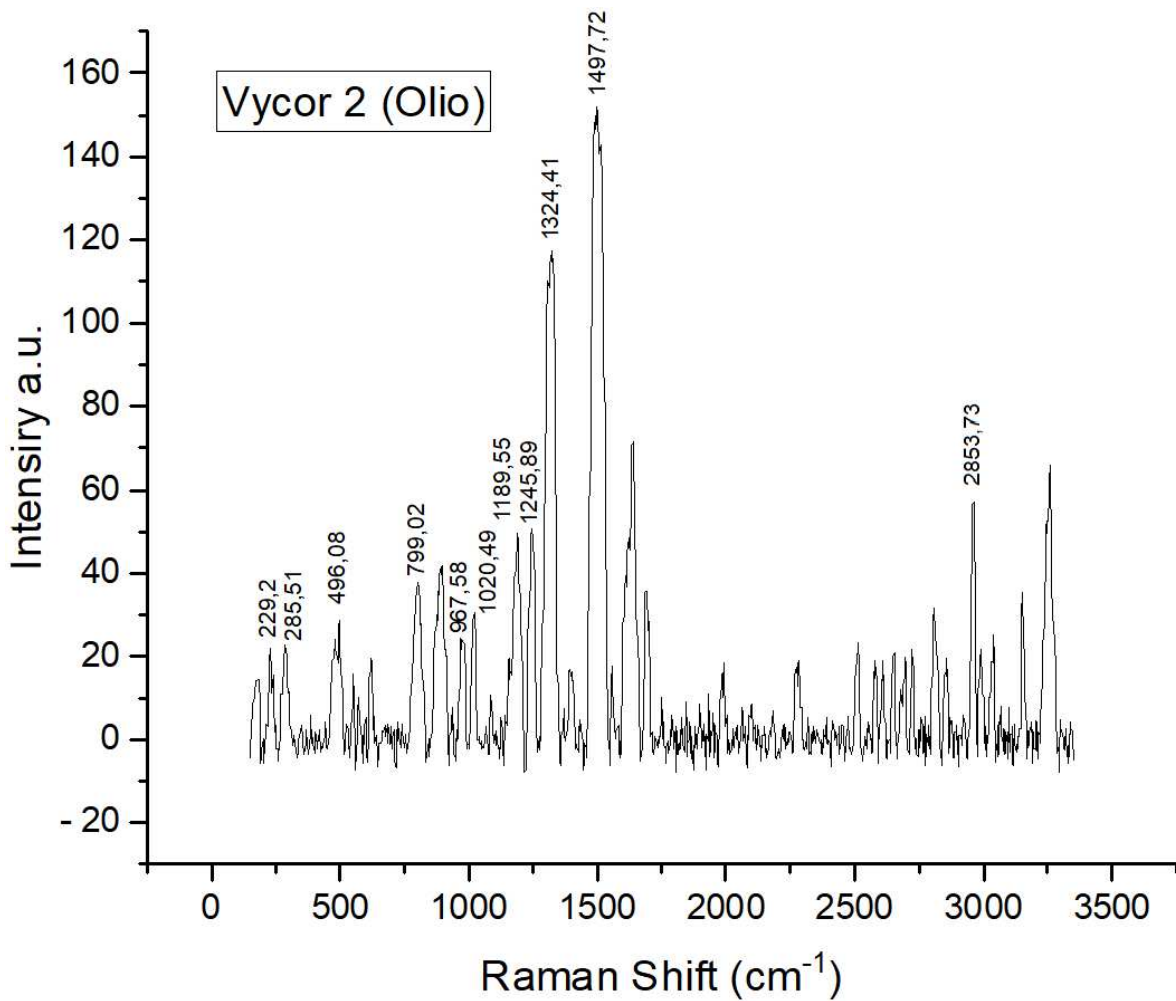


Figura 58 Spettro Raman portatile campione Vycor 2

Tabella 5 Picchi campione Vycor 2

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	971	-		1313	Stretching O-P
	1018	Bending C-CH ₃			
	1084	Stretching (CH ₂) _n			
	2853	Bending (C-CH ₃)			

3.1.2.3 Campione Vycor 3 (Olio invecchiato) [80X 80% 2 sec. 20 acc.]

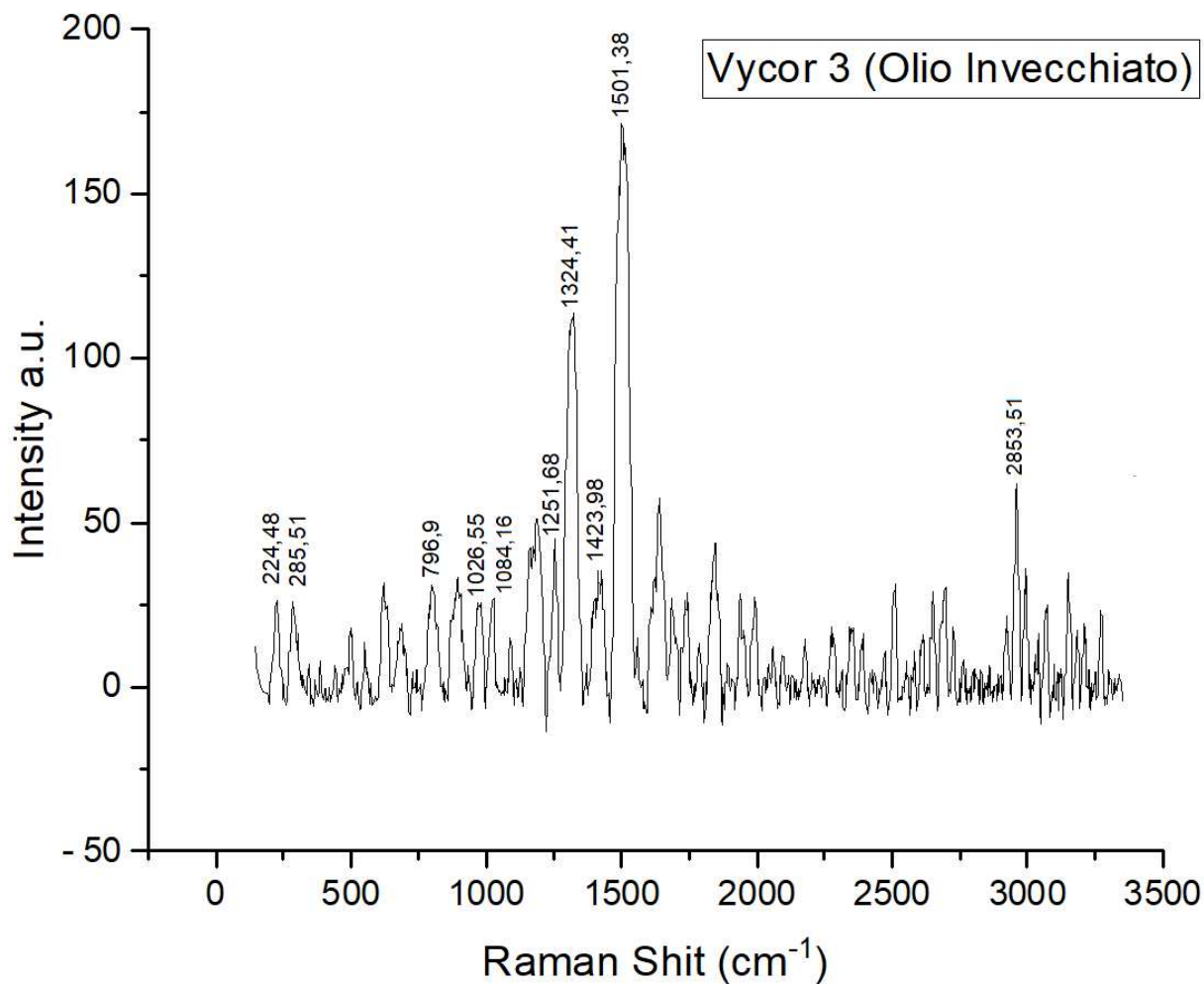


Figura 59 Spettro Raman portatile campione Vycor 3

Tabella 6 Picchi campione Vycor 3

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	971	-		1313	Stretching O-P
	1018	Bending C-CH ₃		1423	-
	1084	Stretching (CH ₂) _n		1510	-

3.1.2.4 Campione Vycor 4 (Olio invecchiato) [80X 80% 2 sec. 20 acc.]

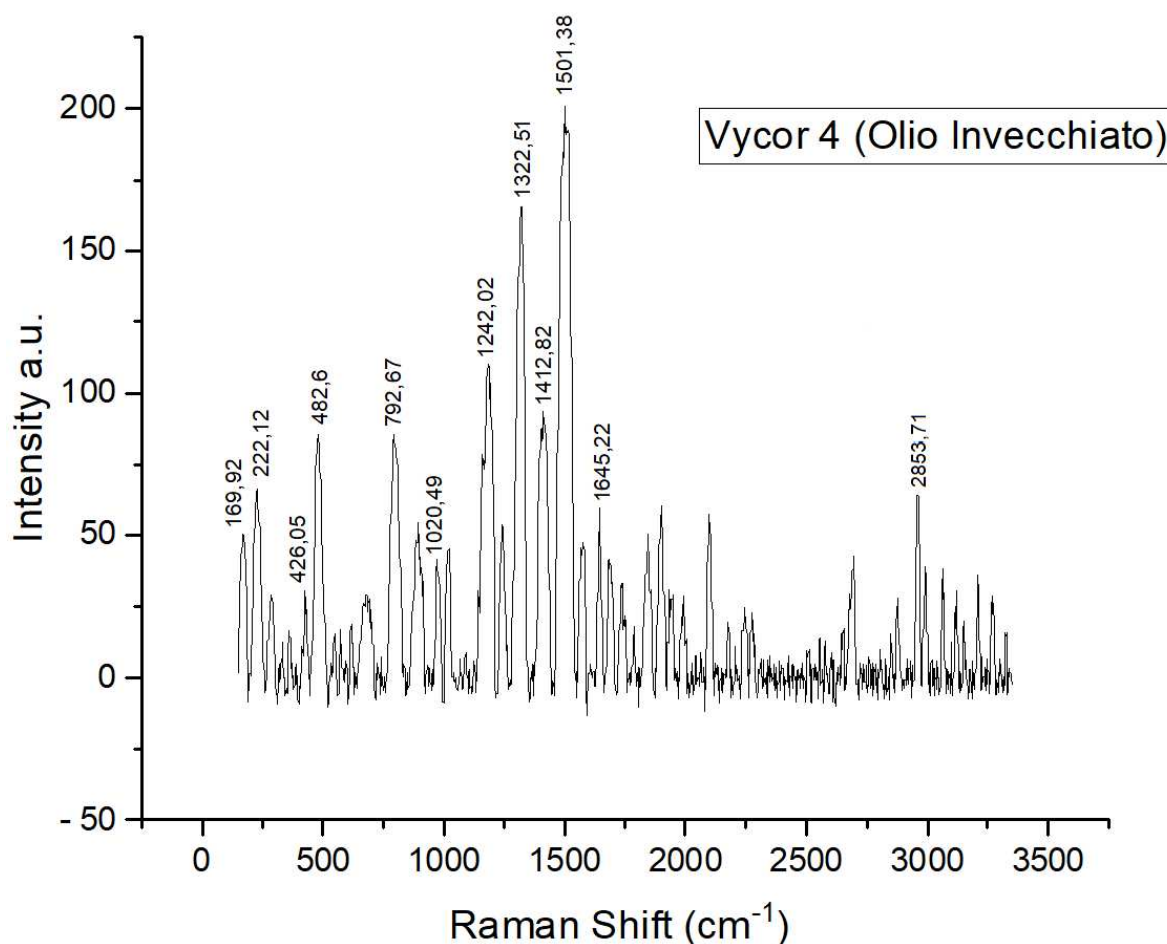


Figura 60 Spettro Raman portatile campione Vycor 4

Tabella 7 Picchi campione Vycor 4

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	971	-		1313	Stretching O-P
	1018	Bending C-CH ₃		1423	-
	1084	Stretching (CH ₂) _n		1510	-

L'analisi dei picchi presenti nelle Vycor contenenti olio e invecchiato si è rivelata un'operazione complessa, con difficoltà nell'osservare differenze significative tra i due gruppi. Sebbene sia evidente che le Vycor invecchiate mostrino un numero ridotto di picchi rispetto alle Vycor contenenti olio fresco, è arduo effettuare valutazioni approfondite riguardo all'intensità dei picchi e ad altri fattori che potrebbero confermare l'effetto dell'invecchiamento.

3.1.2.5 Campione Vycor 5 (Vino) [80X 50% 3 sec. 20 acc.]

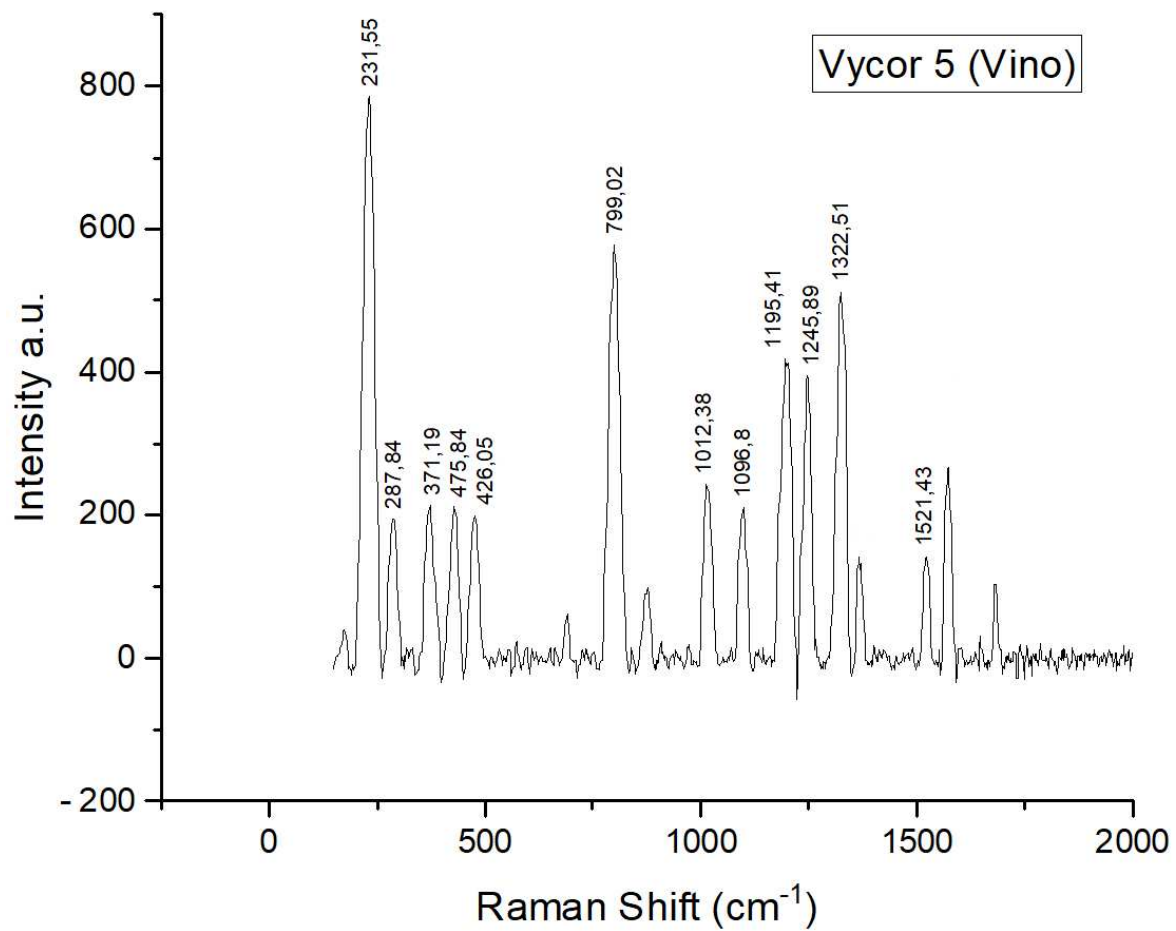


Figura 61 Spettro Raman portatile campione Vycor 5

Tabella 8 Picchi campione Vycor 5

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	480/471	Bending O-C-C		1313	Stretching O-P
	1012	-		1519	
	1096	Stretching C-O			
	1195	-			

3.1.2.6 Campione Vycor 6 (Vino) [80X 60% 4 sec. 20 acc.]

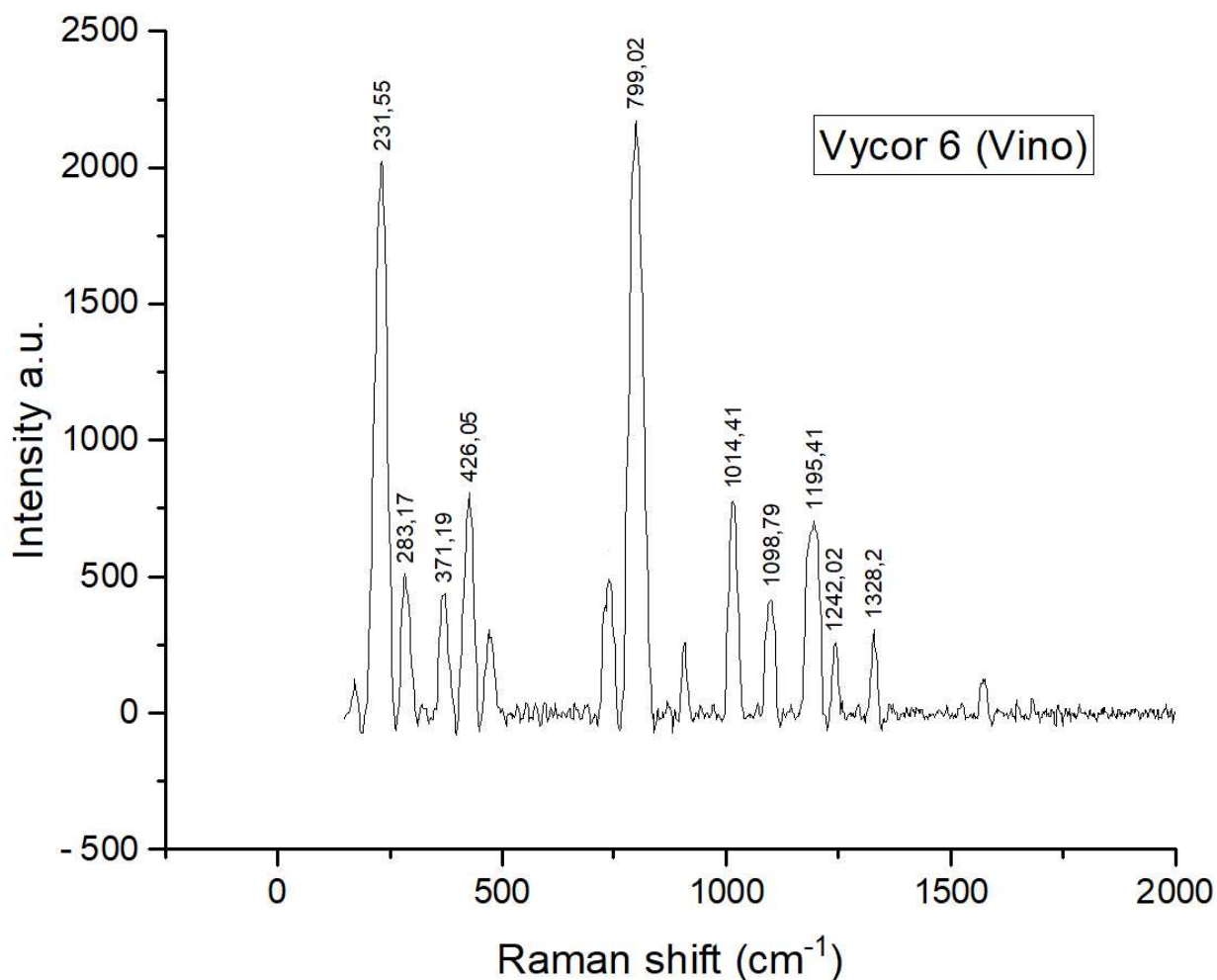


Figura 62 Spettro Raman portatile campione Vycor 6

Tabella 9 Picchi campione Vycor 6

Olío	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	1012	-		1313	Stretching O-P
	1096	Stretching C-O			
	1195	-			

L'analisi dei picchi rilevati nei campioni contenenti vino ha evidenziato una connessione tra alcune di queste vibrazioni e quelle riportate in letteratura, che sono comunemente associate alle caratteristiche chimiche del vino. Ciò suggerisce che questi picchi possano essere attribuiti al vino stesso (Cláudia A. Teixeira dos Santos, 2018). In questo caso, sebbene non abbiano una

corrispondenza esatta con quelli riportati nella letteratura, sono stati ancora associati al vino poiché si ripresentano coerentemente in tutti gli spettri analizzati dei campioni contenenti vino.

Come sempre, allo spettro si sovrappongono picchi dovuti ad artefatti strumentali, alcuni dei quali sovrapposti a picchi attribuiti al vino, che rendono molto difficile l'attribuzione certa dei segnali.

3.1.2.7 Campione Vycor 7 (Vino invecchiato) [80X 20% 2 sec. 20 acc.]

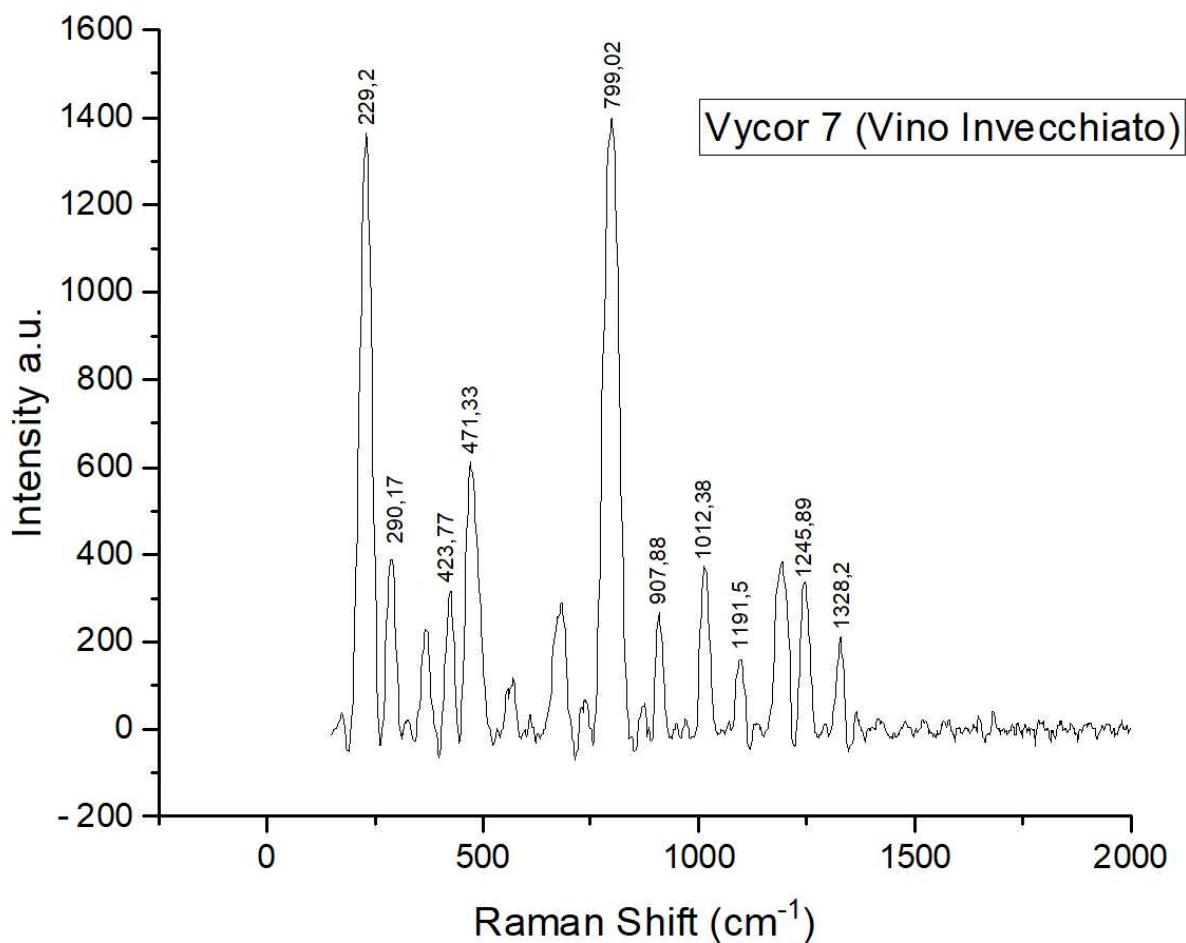


Figura 63 Spettro Raman portatile campione Vycor 7

Tabella 10 Picchi campione Vycor 7

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	480/471	Bending O-C-C		1313	Stretching O-P
	1012	-			
	1096	Stretching C-O			
	1195	-			

3.1.2.8 Campione Vycor 8 (Vino Invecchiato) [80X 20% 2 sec. 20 acc.]

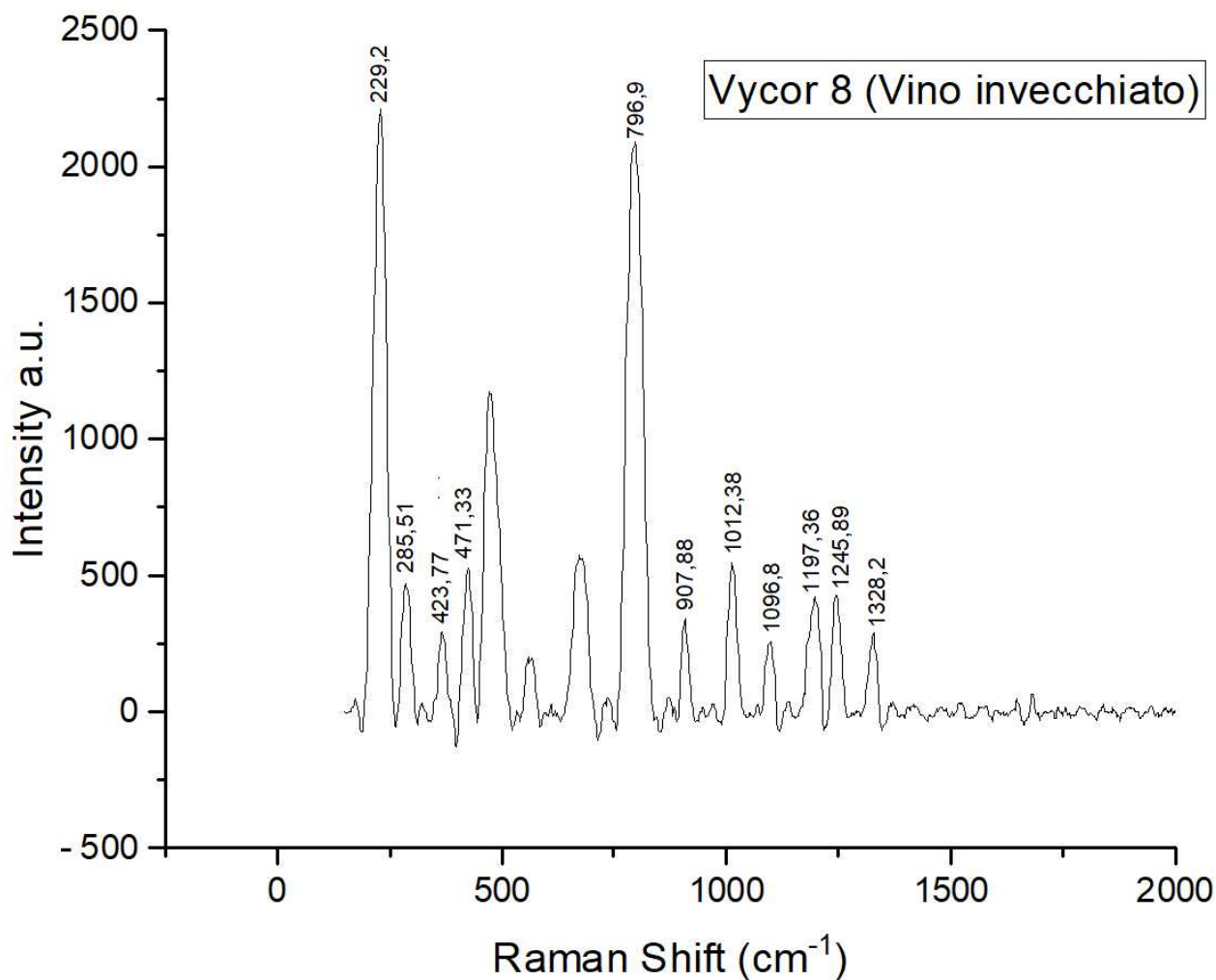


Figura 64 Spettro Raman portatile campione Vycor 8

Tabella 11 Picchi campione Vycor 8

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	480/471	Bending O-C-C		1313	Stretching O-P
	1012	-		1519	
	1096	Stretching C-O			
	1195	-			

Per quanto riguarda il confronto tra le Vycor contenenti vino e vino invecchiato, non sono state rilevate differenze sostanziali o caratteristiche che possano indicare un effetto di invecchiamento.

In conclusione, l'analisi dei campioni tramite lo strumento Raman portatile presenta alcune sfide che contribuiscono alla difficoltà nell'interpretazione dei risultati. Gli spettri ottenuti con questo strumento sono spesso affetti da un'elevata fluorescenza di fondo e da un rumore significativo, rendendo complicata la loro elaborazione e interpretazione. La fluorescenza presente negli spettri può derivare da diverse fonti, tra cui la presenza di molecole organiche complesse o impurità presenti nel campione. Questa fluorescenza può sovrapporsi alle vibrazioni molecolari di interesse, mascherando o distorcendo i picchi rilevanti. Pertanto, l'individuazione e l'attribuzione precisa dei picchi diventano un compito arduo. Inoltre, il rumore introdotto durante l'acquisizione degli spettri può influenzare la qualità dei dati e compromettere la precisione delle analisi. Il rumore può essere causato da diversi fattori, come le imperfezioni ottiche dello strumento, le fluttuazioni nella sorgente di luce o le interferenze ambientali. Questo rumore aggiuntivo può interferire con la corretta identificazione dei picchi e la quantificazione delle intensità.

Per affrontare questa problematica, è stato tentato un approccio diverso. Sono state eseguite ulteriori prove utilizzando l'estrazione con Acetone sul campione Vycor 1 e con Esano sul campione Vycor 2, entrambe contenenti olio. L'obiettivo era ridurre l'effetto della fluorescenza e ottenere segnali più chiari e affidabili.

Inizialmente, sono state condotte analisi direttamente sulla Vycor, cercando di eliminare o ridurre al minimo la presenza di sostanze che potessero causare fluorescenza indesiderata. Tuttavia, i risultati ottenuti non sono stati soddisfacenti. Gli spettri presentavano un alto livello di rumore e risultavano fortemente influenzati dalla fluorescenza di fondo. In ogni caso erano riscontrabili gli stessi picchi che erano osservabili precedentemente.

3.1.3 Trattamenti alternativi Vycor

3.1.3.1 Campione Vycor 1 (Olio + Acetone) [80X 80% 3 sec. 30 acc.]

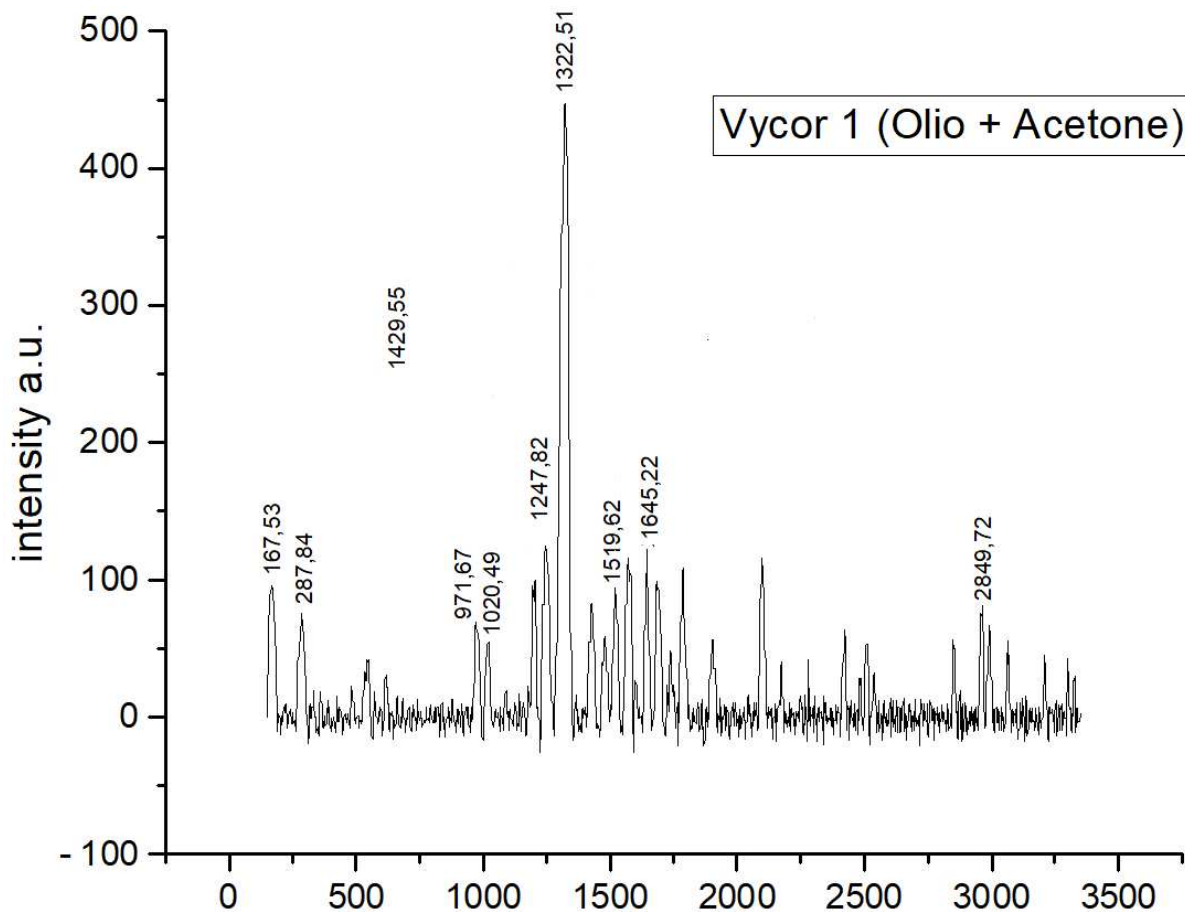


Figura 65 Spettro Raman portatile campione Vycor 1 trattata per estrazione con acetone

Tabella 12 Picchi campione Vycor 1 trattata con acetone

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
	971	-		1203	Stretching simmetrico Si-O
	1018	Bending C-C		1245	-
	1313	Bending CH ₂		1313	Stretching O-P
	1245	Deformation cis(R-HC=CH-R)		1519	-
	1654	C=C di cis(RCH=CHR)			
	2853	Bending C-CH ₃			

3.1.3.2 Polvere del campione Vycor 1 (Olio + Acetone) [80X 100% 3 sec. 30 acc.]

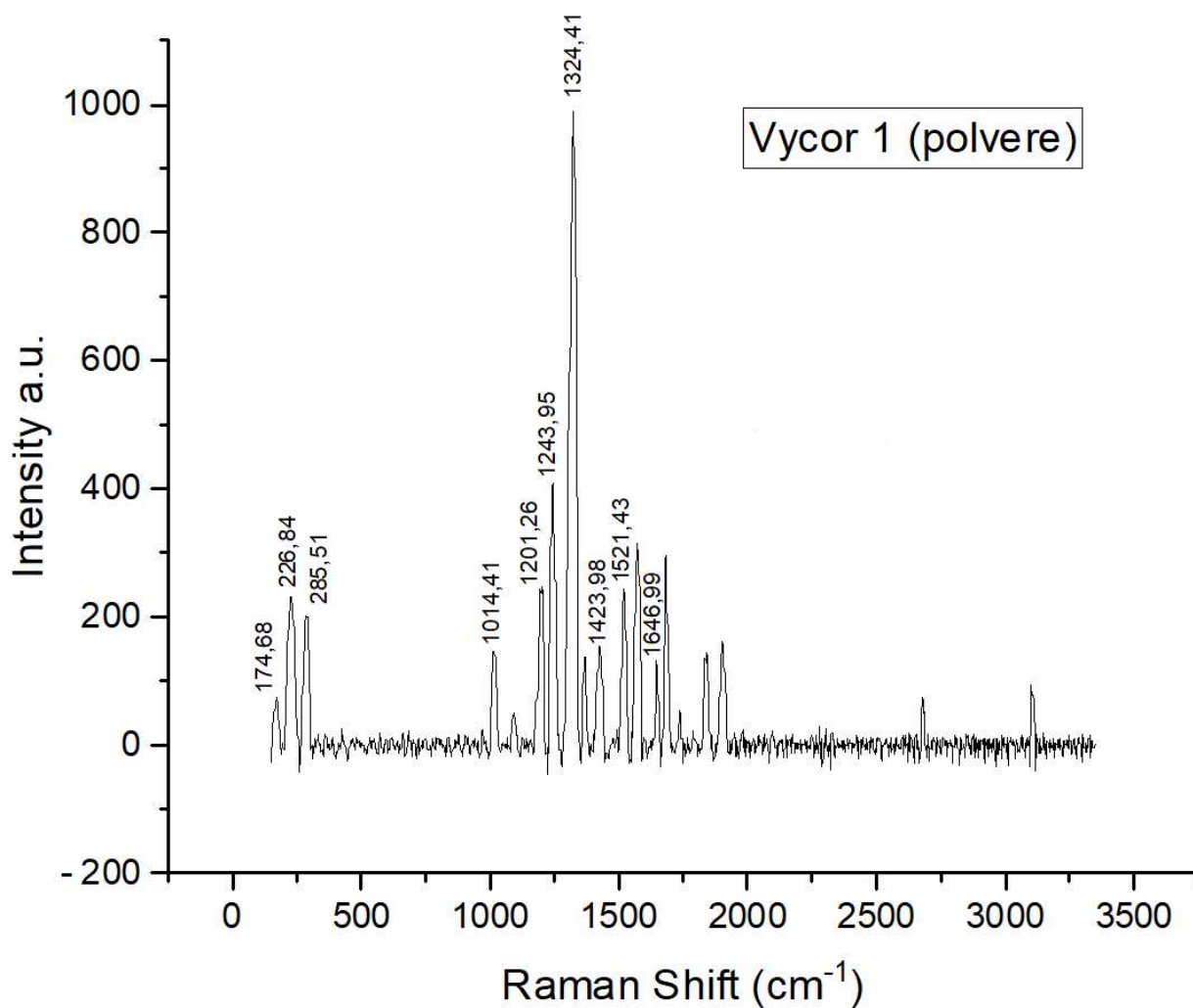


Figura 66 Spettro Raman portatile polvere campione Vycor 1 trattata per estrazione con acetone

Tabella 13 Picchi polvere campione Vycor 1 trattata con acetone

Olio	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni	Vycor	Picchi (cm ⁻¹)	Vibrazioni
				1203	Stretching simmetrico Si-O
1018		Bending C-C		1245	-
1313		Bending CH ₂		1313	Stretching O-P
1245		Deformation cis(R-HC=CH-R)		1519	-
1435		Scissoring CH ₂		1645	-
1654		C=C di cis(RCH=CHR)			

L'analisi dello spettro della polvere prelevata dal vetrino, relativa alla Vycor contenente olio, tramite l'utilizzo del microscopio ha prodotto risultati coerenti con le analisi precedenti. È stato possibile identificare i soliti picchi caratteristici riconducibili all'olio. Questi picchi confermano la presenza dell'olio nella Vycor e la riproducibilità delle vibrazioni specifiche associate ad esso durante le diverse misurazioni.

3.1.3.3 Campione Vycor 1 e 2 (Olio + Acetone e Olio + Esano) polvere su alluminio

[80X 80% 3 sec. 30 acc.]

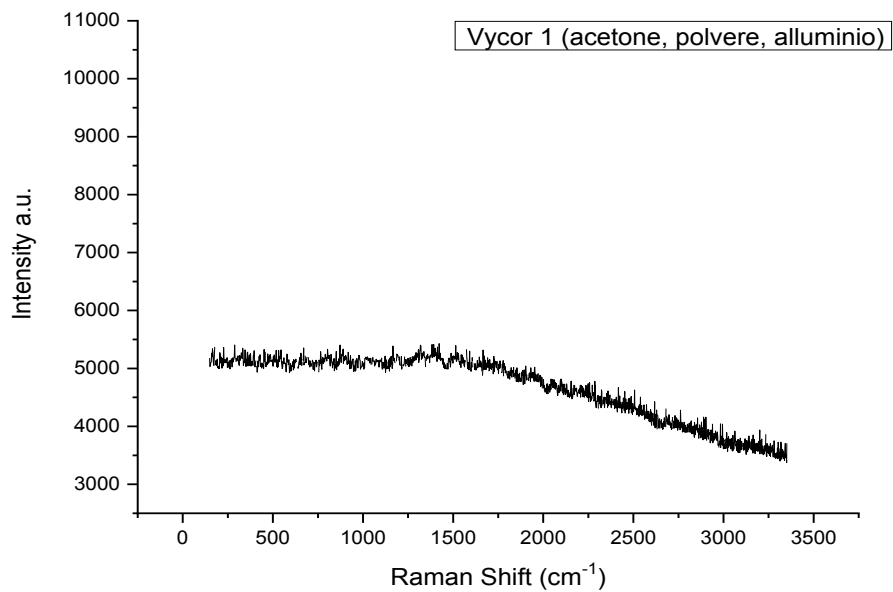


Figura 67 Spettro Raman portatile polvere su alluminio campione Vycor 1 trattata per estrazione con acetone

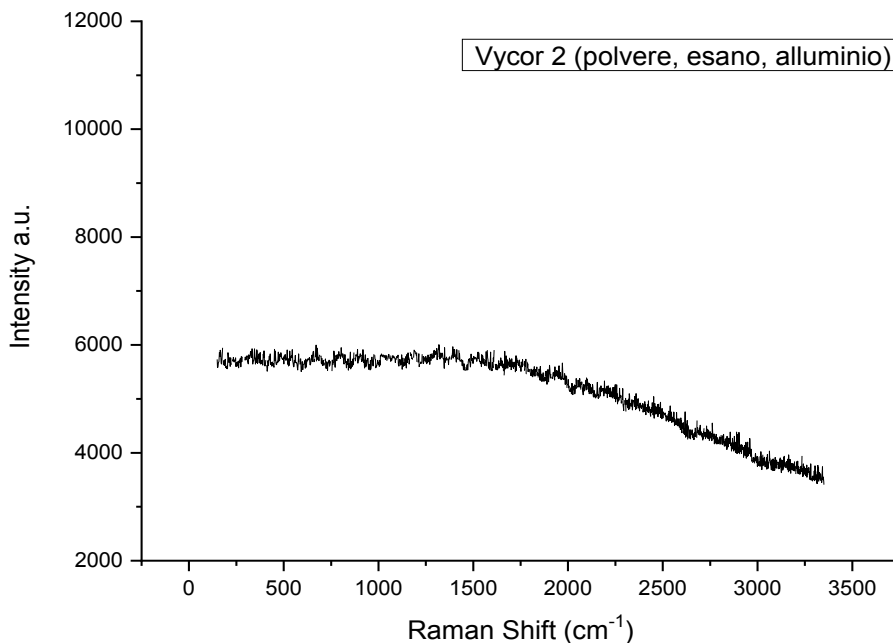


Figura 68 Spettro Raman portatile polvere su alluminio campione Vycor 2 trattata per estrazione con esano

Durante le analisi condotte utilizzando le polveri poste su carta d'alluminio, si è riscontrata una problematica di saturazione del segnale, legata presumibilmente ad un forte effetto di fluorescenza, che ha compromesso la chiara identificazione dei picchi. La forte fluorescenza, forse causata da un'interazione specifica tra le polveri e la superficie della carta d'alluminio, ha reso impossibile distinguere e attribuire correttamente i picchi spettrali. Di conseguenza, non è stato possibile ottenere informazioni significative riguardo alle vibrazioni molecolari presenti nelle polveri analizzate in questa configurazione sperimentale.

Alla luce di queste osservazioni e considerando i risultati precedentemente ottenuti con l'olio, si è deciso di interrompere ulteriori analisi utilizzando il vino come campione. La maggiore fluorescenza del vino rispetto all'olio avrebbe reso ancora più difficile ottenere risultati soddisfacenti e interpretazioni chiare. Di conseguenza, si è preferito concentrarsi sulle analisi precedenti che hanno fornito indicazioni utili senza procedere con ulteriori prove sperimentali con il vino.

3.1.4 Spettri “Cocci a perdere”

3.1.4.1 Sample 2

Macchia Rossa [80X 20% 2 sec. 10 acc.]

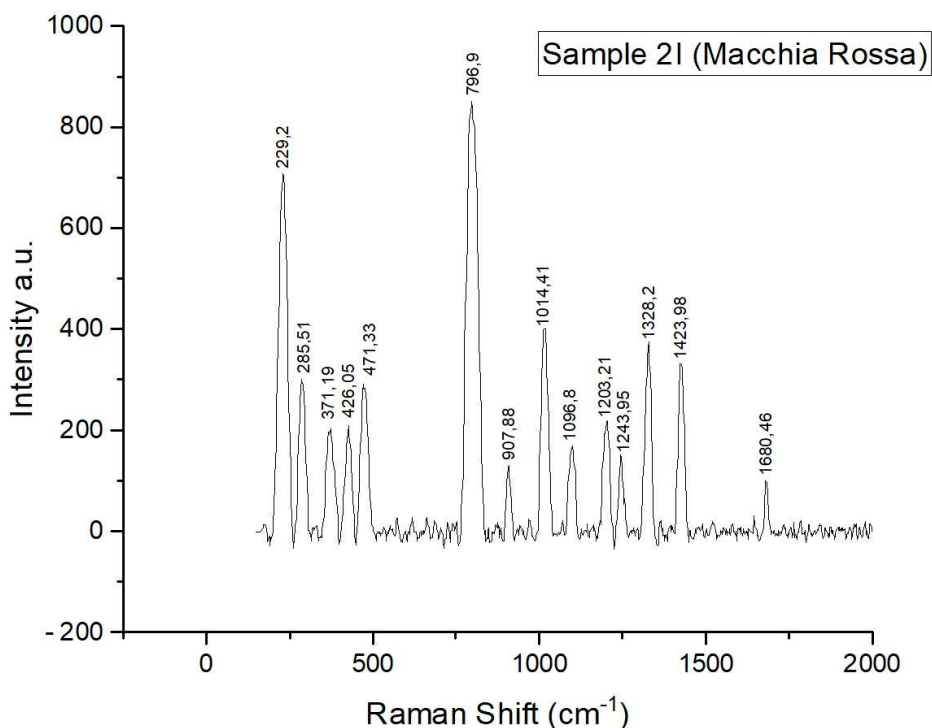


Figura 69 Spettro Raman portatile macchia rossa campione 21

Macchia Rossa 2 [80X 20% 3 sec. 10 acc.]

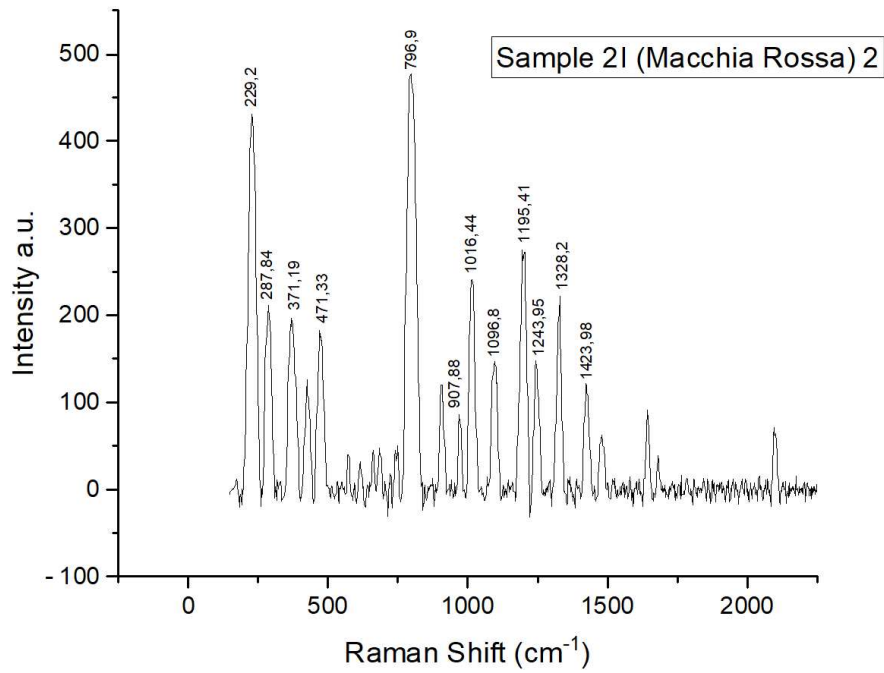


Figura 70 Spettro Raman portatile macchia rossa 2 campione 2I

3.1.4.2 Sample 5

Macchia Rossa 1 [80X 25% 30 sec. 10 acc.]

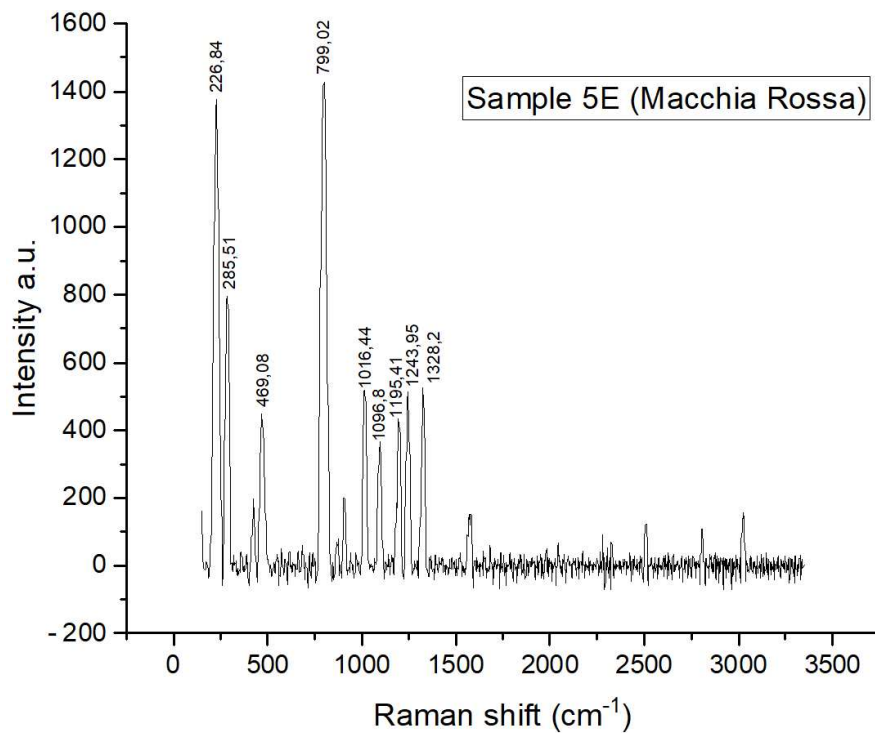


Figura 71 Spettro Raman portatile macchia rossa campione 5E

Macchia Rossa 2 [80X 25% 30 sec. 10 acc.]

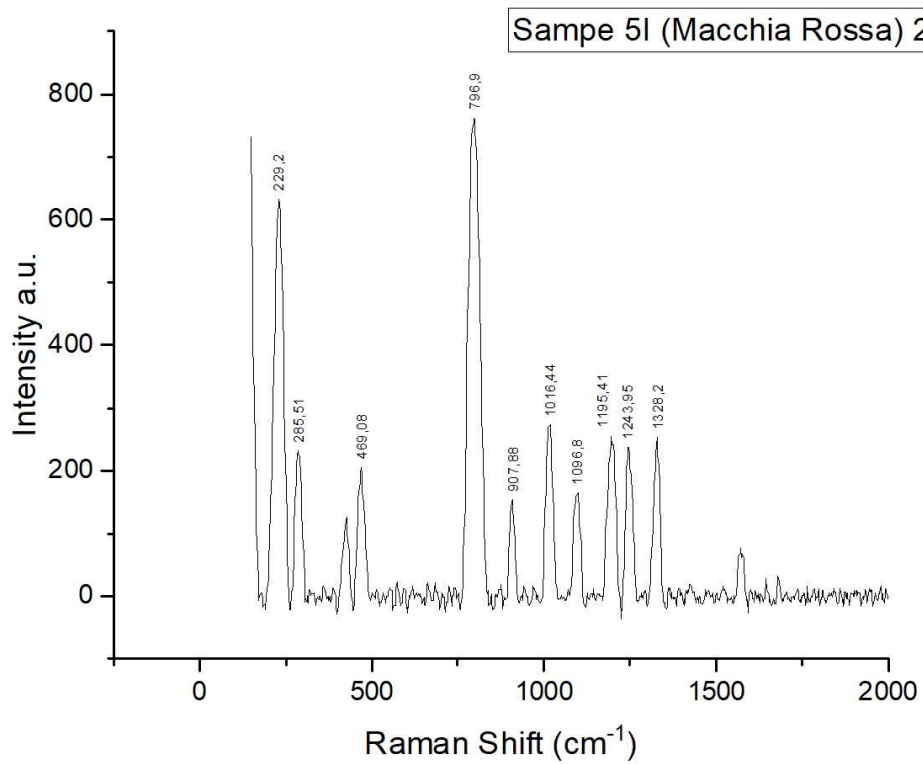


Figura 72 Spettro Raman portatile macchia rossa 2 campione 5I

Macchia Rossa 3 [80x 30% 5 sec. 10 acc.]

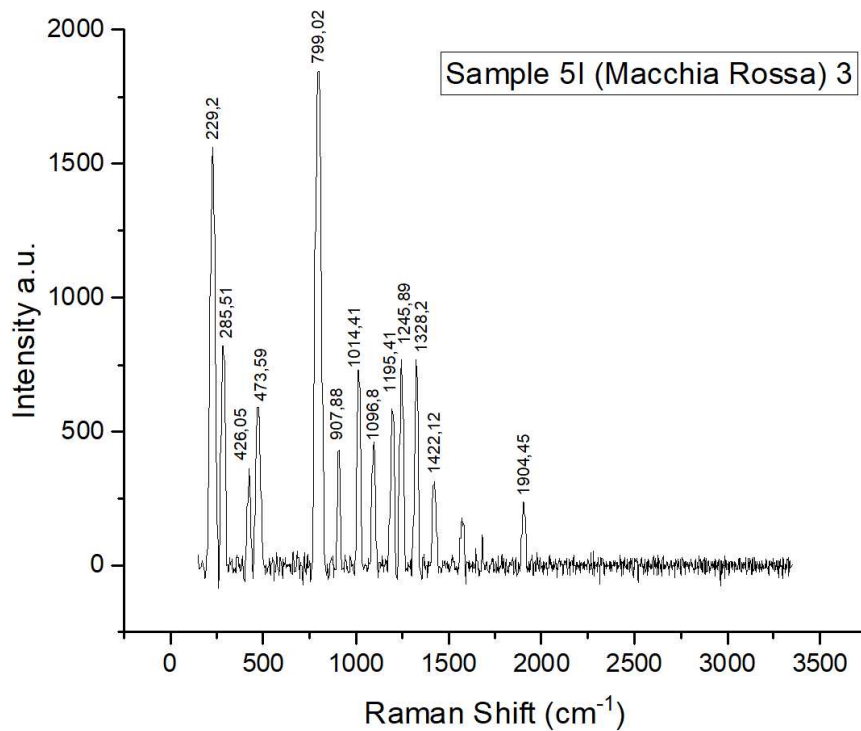


Figura 73 Spettro Raman portatile macchia rossa 3 campione 5I

Macchia Nera [80X 10% 5 sec. 10 acc.]

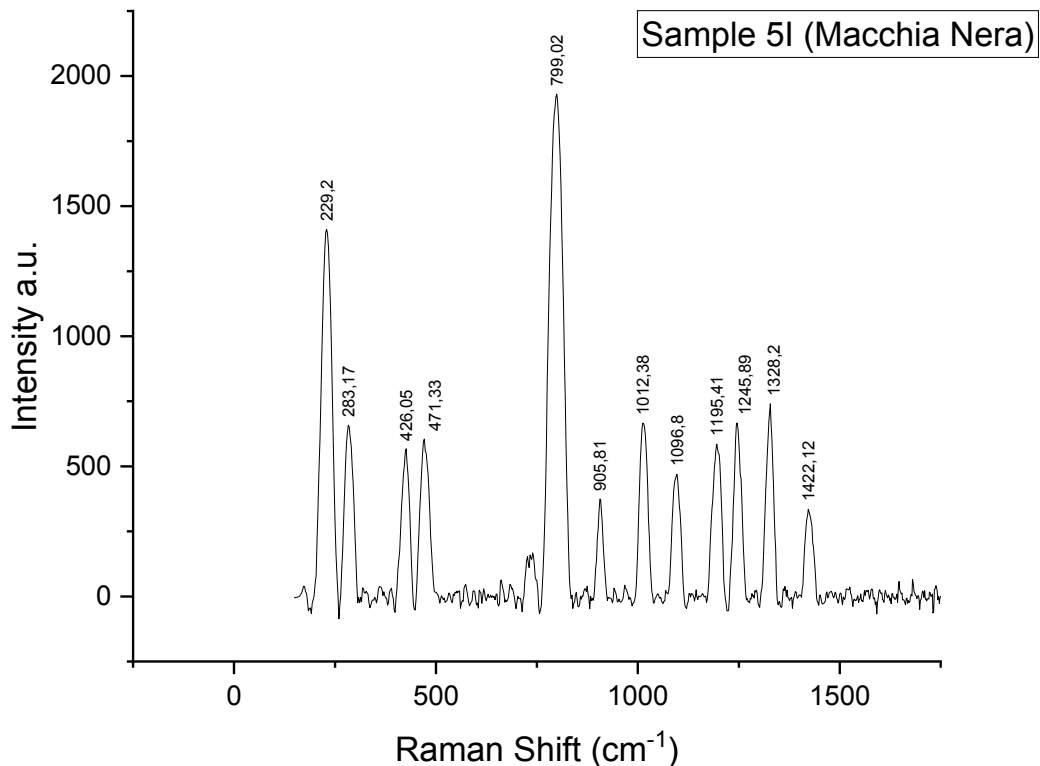


Figura 74 Spettro Raman portatile macchia nera campione 51

Nell'ambito dell'indagine condotta mediante l'utilizzo del Raman portatile sui cocci a perdere non trattati, sono stati ottenuti spettri che presentavano ricorrenti picchi distintivi. I picchi comuni a tutti i cocci includono le seguenti frequenze: 226 cm^{-1} , $283/285\text{ cm}^{-1}$, $460/470\text{ cm}^{-1}$, 799 cm^{-1} , 907 cm^{-1} , $1012/1016\text{ cm}^{-1}$, $1195/1200\text{ cm}^{-1}$, 1245 cm^{-1} , e 1328 cm^{-1} . Alcuni cocci, invece, mostravano esclusivamente i seguenti picchi: 1423 cm^{-1} e 1096 cm^{-1} . Nel caso del campione 2I, si è osservato che solo esso presentava un picco caratteristico nella parte interna a una frequenza di 371 cm^{-1} . L'ipotesi formulata è che i picchi identificati siano attribuibili alla presenza dei costituenti della matrice ceramica del coccio, che è composta, come precedentemente menzionato, da Feldspato di Potassio, Carbonato di Calcio e Quarzo.

Questa scoperta solleva un'importante questione, poiché la presenza dei medesimi picchi in altre analisi, quali quelle riguardanti l'olio, il vino e i campioni Vycor, potrebbe mettere in discussione l'associazione diretta tra tali picchi e la composizione specifica della matrice ceramica del coccio. È necessario approfondire ulteriormente la ricerca al fine di comprendere se questi picchi siano effettivamente indicativi della presenza dei costituenti ceramici desiderati o se possano essere influenzati da altri fattori. In particolare, potrebbe essere fondamentale condurre analisi

comparative tra i campioni di coccio e i campioni di riferimento noti per contenere specificamente Feldspato di Potassio, Carbonato di Calcio e Quarzo al fine di confermare o confutare l'ipotesi formulata.

Tabella 14 Picchi comuni ad altri campioni

Vino	Olio	Vycor
799 cm^{-1}	1018 cm^{-1}	283 cm^{-1}
1014 cm^{-1}	1438 cm^{-1}	1200 cm^{-1}
1195 cm^{-1}	1303 cm^{-1}	1240 cm^{-1}
1245 cm^{-1}		1324 cm^{-1}
1328 cm^{-1}		1423 cm^{-1}

Nell'ambito dell'analisi dettagliata, è rilevante notare che alcuni picchi sono stati osservati frequentemente in diversi esperimenti, sollevando l'ipotesi che possano essere influenzati da errori strumentali sistematici. In particolare, sono emersi segnali a 226 cm^{-1} , 285 cm^{-1} , 799 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} e 1245 cm^{-1} che si ripetevano con una certa regolarità. Allo stesso modo, sono stati osservati picchi a 426 cm^{-1} e 471 cm^{-1} che mostravano una frequente presenza nei dati raccolti.

3.2 Raman fisso

Nell'ambito delle analisi condotte tramite lo strumento di Raman fisso, è stata seguita la consueta procedura: inizialmente sono stati acquisiti riferimenti dell'olio, successivamente sono state eseguite le prime analisi sui campioni Vycor e infine sui campioni di cocci a perdere sottoposti a trattamento.

Tuttavia, si è riscontrato un ostacolo nella forma di un'abbondante fluorescenza, la quale ha impedito di ottenere riferimenti attendibili per le analisi correlate al vino. Di conseguenza, non è stato possibile procedere con ulteriori indagini, sia riguardo al materiale Vycor che ai cocci a perdere.

3.2.1 Riferimento Olio

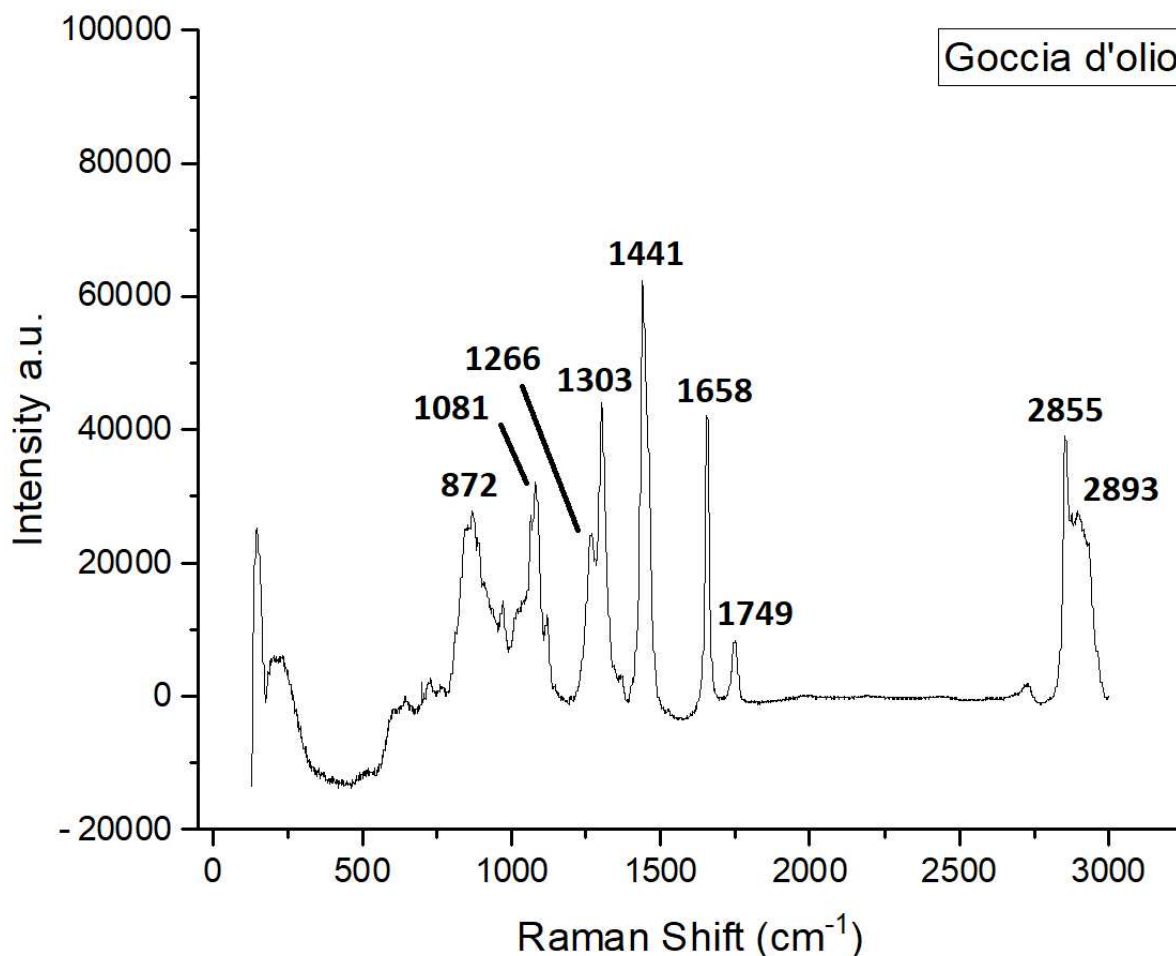


Figura 75 Spettro Raman fisso olio

In questa analisi con il Raman fisso, una goccia d'olio d'oliva è stata depositata su un vetrino, e l'analisi è stata condotta direttamente sull'olio. Tale analisi è stata utilizzata come riferimento per l'identificazione dei picchi principali dell'olio di oliva. I picchi individuati evidenziano alcune vibrazioni e gruppi funzionali presenti nell'olio. La banda a 872 cm⁻¹ è da attribuire allo *stretching* del gruppo C-C degli acidi grassi. Il picco a 1081 cm⁻¹ indica lo *stretching* C-C nella catena alchilica dell'olio (CH₂)_n. Altri picchi rilevanti includono quello a 1266 cm⁻¹, che rappresenta la deformazione del gruppo cis(R-HC=CH-R), e il picco a 1303 cm⁻¹, corrispondente al *bending* del gruppo (CH₂). Si è inoltre osservato un picco a 1440 cm⁻¹, che indica lo *scissoring* del gruppo (CH₂), e uno a 1655 cm⁻¹, attribuito alla vibrazione (C=C) del gruppo cis(RCH=CHR) nelle olefine disostituite. Ulteriori picchi rilevanti comprendono quello a 1749 (*stretching* C=O), a 2855 e 2893 cm⁻¹, *stretching* dei CH.

La presenza di questi picchi spettrali, come osservato in precedenza anche con la strumentazione del Raman portatile, conferma e rafforza la solidità delle informazioni ottenute riguardanti l'identificazione e la caratterizzazione delle vibrazioni e dei gruppi funzionali presenti nell'olio mediante la tecnica di Raman fisso.

3.2.2 Campioni preparati su filtri Vycor

Prima di procedere con le analisi approfondite sui cocci a perdere, è stato eseguito il consueto protocollo di indagine, il quale ha coinvolto l'effettuazione di analisi sui campioni di Vycor contenente olio, così come sul campione di Vycor contenente olio poi sottoposto al trattamento di invecchiamento.

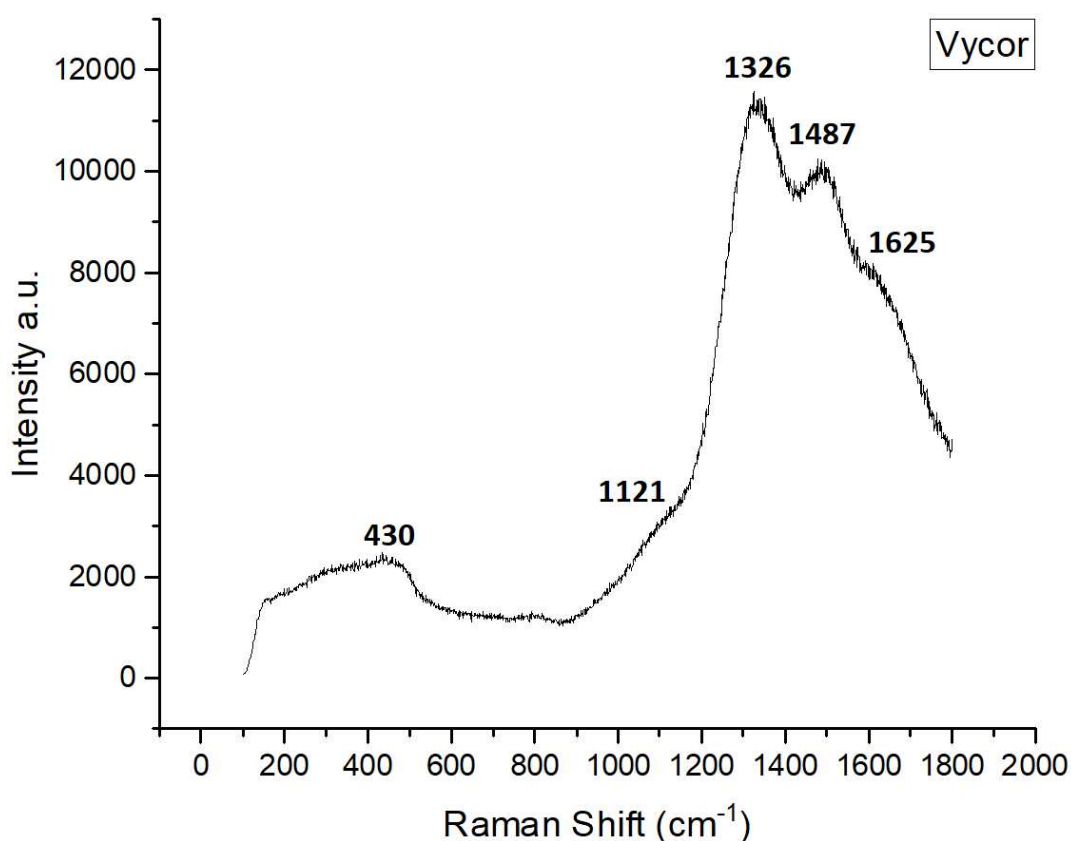


Figura 76 Spettro Raman fisso Vycor

Attraverso l'impiego del metodo di analisi Raman a configurazione fissa, è stato possibile ottenere una rappresentazione ottimizzata dello spettro di Vycor. Nell'intervallo spettrale compreso tra 300 e 500 cm⁻¹, si evidenziano bande distintive con un picco prominente a 430 cm⁻¹, le quali sono state ricondotte al processo di *bending* del legame Si-O-Si all'interno della struttura vetrificata.

L'osservazione di una sottile banda spalla a 1121 cm^{-1} è stata associata agli effetti di *stretching* delle unità di diborato, connessi sia alle interazioni B-O⁻ che B-O-B.

Un aspetto rilevante dell'analisi spettrale è la presenza di una banda intensa nell'intervallo $1300\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$, caratterizzata da un picco molto marcato a 1326 cm^{-1} , seguito da altre tre bande altrettanto intense, posizionate a 1487 , 1625 e 1768 cm^{-1} . Questi fenomeni spettrali sono stati attribuiti alle vibrazioni di *stretching* del legame B-O⁻ nelle configurazioni ad anello e catena presenti nelle unità di metaborato (C.R. Kesavulu, 2017).

Tuttavia, nonostante la dettagliata rappresentazione ottenuta da questo spettro, si è riscontrata una complessità che ha reso difficoltosa la definizione di una baseline ottimale per l'isolamento dei picchi di particolare rilevanza per la nostra analisi.

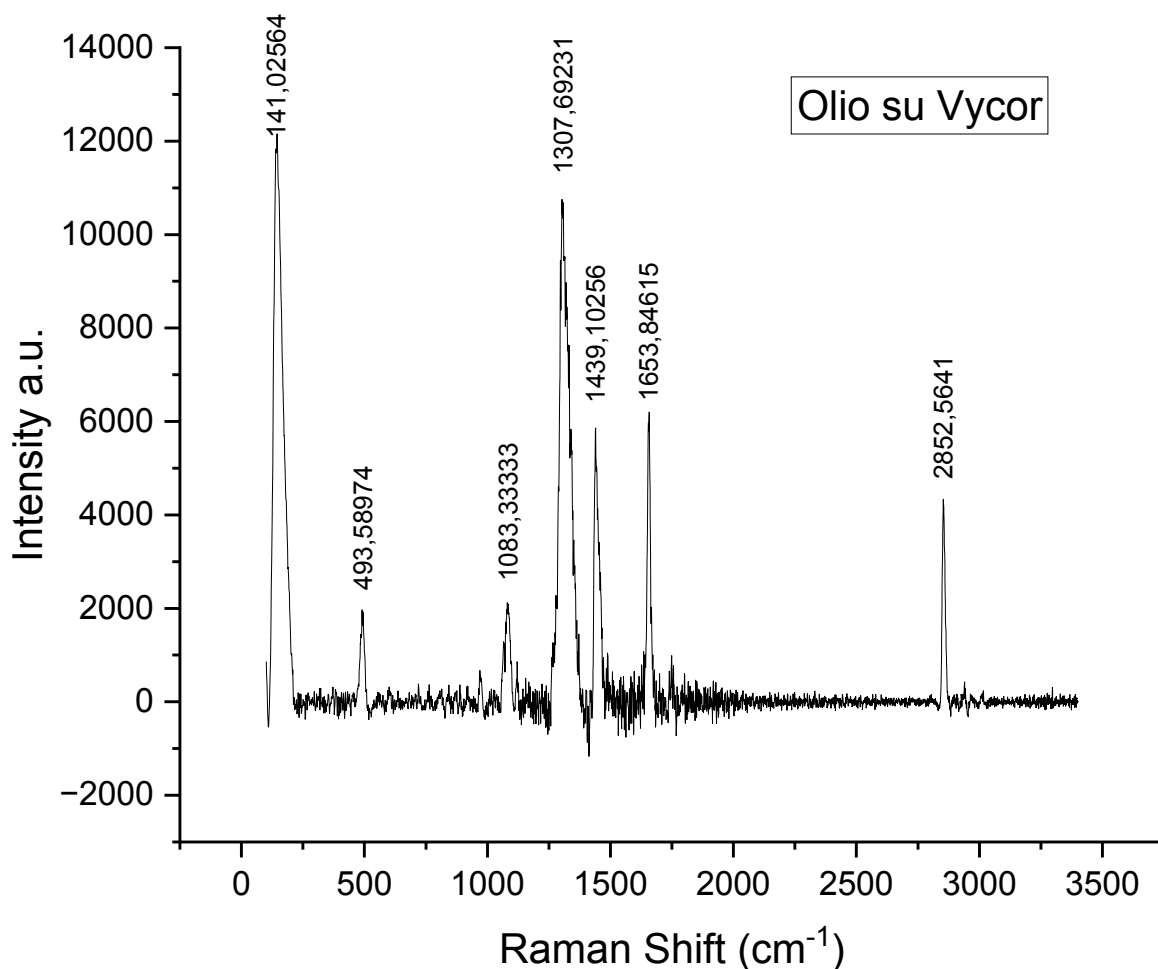


Figura 77 Spettro Raman fisso olio su Vycor

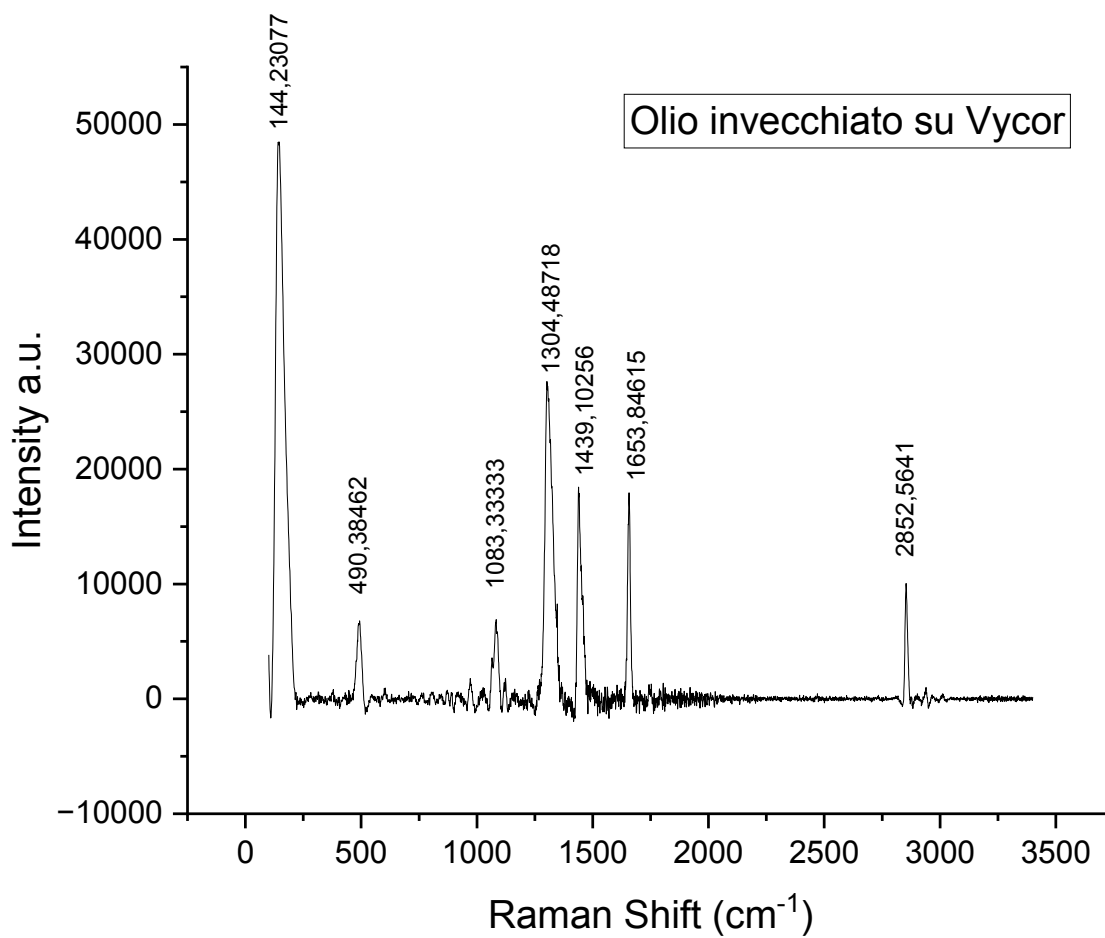


Figura 78 Spettro Raman fisso olio su Vycor sottoposta a trattamento d'invecchiamento

Attraverso l'analisi spettroscopica di questi campioni, sono emersi risultati di particolare rilievo. Nel contesto degli spettri ottenuti da tali campioni, sono stati individuati distinti picchi che possono essere correlati alla presenza dell'olio. Nel dettaglio, è stato osservato un picco evidente a 1081 cm^{-1} , il quale può essere attribuito allo *stretching* dei legami C-C nella catena alchilica dell'olio $(\text{CH}_2)_n$. Un ulteriore picco è emerso a 1303 cm^{-1} , che è in relazione al piegamento del gruppo (CH_2) . Inoltre, è stato possibile identificare un picco a 1440 cm^{-1} , indicativo della deformazione del gruppo (CH_2) , e un picco distinto a 1655 cm^{-1} , il quale è associato alla vibrazione del legame $(\text{C}=\text{C})$ presente nel gruppo $\text{cis}(\text{RCH}=\text{CHR})$ delle olefine disostituite. Un picco a 2855 cm^{-1} è stato rilevato, rappresentante l'estensione dei legami CH nella struttura dell'olio.

Tuttavia, è importante sottolineare che è emerso un picco a 141 cm^{-1} , risultante dalla fluorescenza strumentale e un picco a 493 cm^{-1} attribuibile alla matrice vetrosa del campione, ossia alla Vycor, inoltre, l'ambiguità sorge dalla stretta somiglianza tra i picchi di concentrazione della Vycor e i picchi di concentrazione dell'olio stesso. Tale congruenza avvalorerebbe ulteriormente l'asserzione che il

substrato Vycor costituisca una matrice sostegno intrinsecamente articolata su cui condurre le operazioni di indagine.

3.2.3 Cocci a perdere

Le misure sono state raccolte alla lunghezza d'onda di 785 nm con ingrandimento 50 X, potenza del laser pari a 10% e tempo di integrazione 10 secondi.

L'identificazione dei picchi dell'olio sui campioni di cocci impregnati è risultata essere più complessa. Le analisi del campione 1E, cocchio a perdere contenente olio, non hanno rivelato la presenza di alcun picco riconducibile all'olio. Successivamente, quando è stato applicato un processo di estrazione con cloroformio per verificare la formazione di un alone contenente olio, nessun segno di olio è stato osservato. Questo risultato potrebbe essere attribuito a diversi fattori, inclusa la bassa concentrazione d'olio nel campione, le caratteristiche della matrice o il fatto che il punto di prelievo del campione si trova sulla parte esterna del cocchio, che non è impermeabilizzata. Come dimostrato anche nei casi precedenti, tale configurazione non favorisce la deposizione di olio.

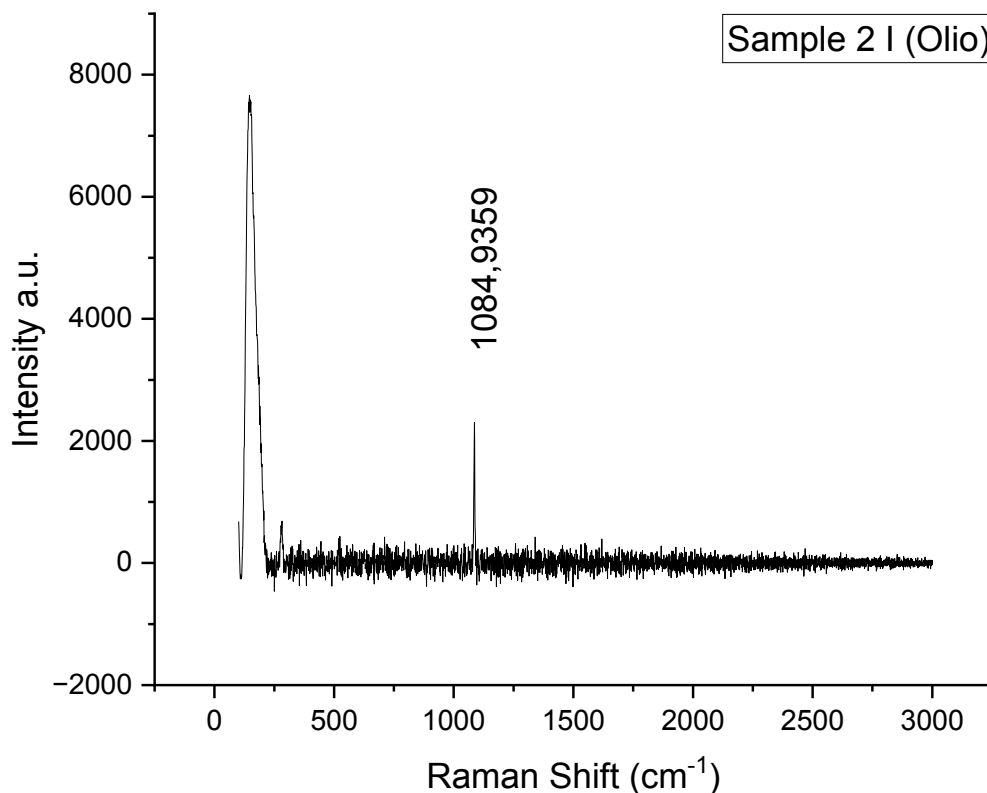


Figura 79 Spettro Raman fisso polvere campione 2I

Nel campione 2I, dove è stato possibile applicare una correzione della linea di base, è stato identificato un debole picco a 1084 cm^{-1} , il quale coincide, approssimativamente, per posizione con quello osservato sulla goccia d'olio e attribuito allo *stretching* C-C della catena alifatica dell'olio. Tuttavia, mancano i segnali ulteriori a 1441 , 1658 e 2855 cm^{-1} , e questo indica che il picco sia piuttosto attribuibile al tipico segnale isolato del carbonato di calcio, considerando in particolare la presenza dell'ulteriore picco più debole a 462 cm^{-1} . Questo assegnamento è ulteriormente confortato dall'analisi IR dei cocci, effettuata in precedenza, che evidenzia la presenza di carbonato di calcio in alcuni dei cocci esaminati.

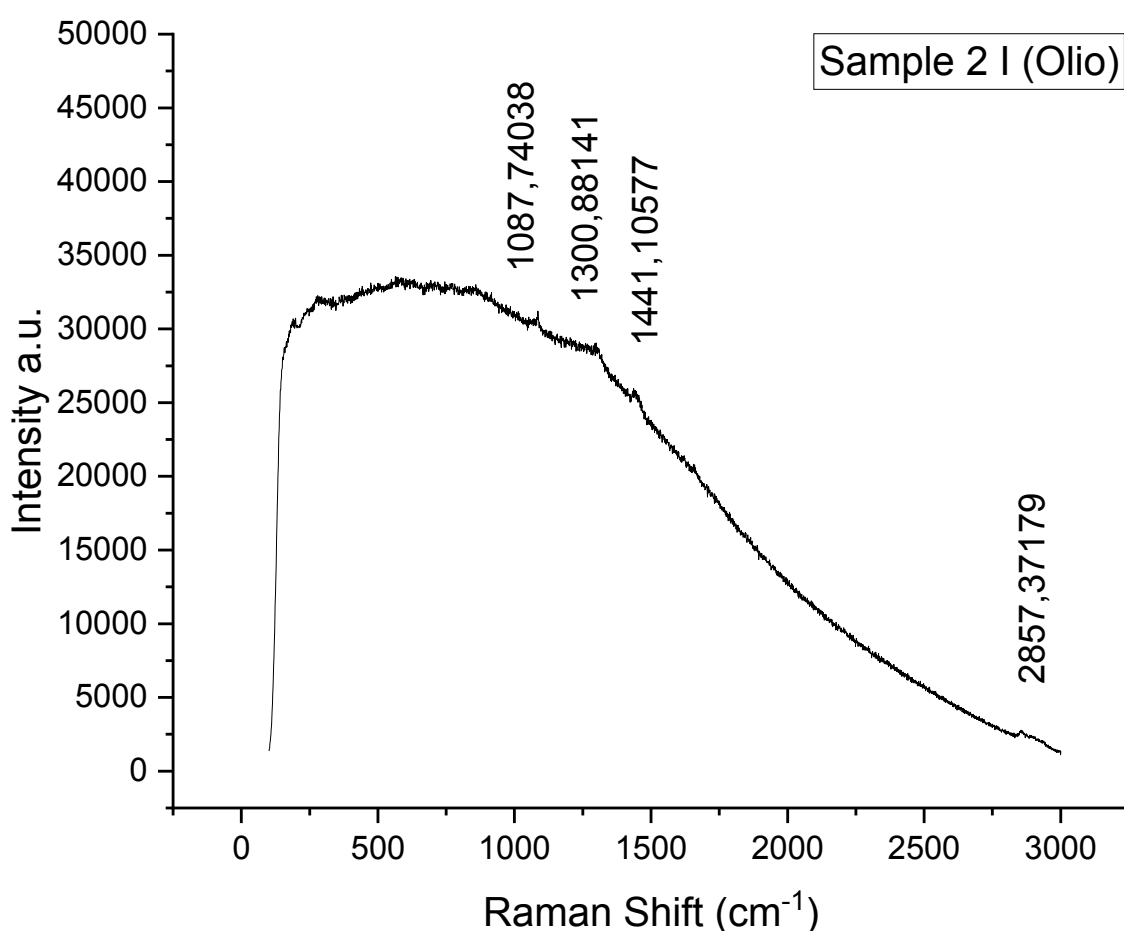


Figura 80 Spettro Raman fisso del campione 2I sottoposto a trattamento di estrazione con cloroformio

Mediante l'impiego della metodologia di estrazione con cloroformio e l'analisi degli aloni, è stato conseguentemente praticabile il recupero completo di tutte le bande ascrivibili all'olio (come illustrato in Fig.79), includendo le bande a 1087 , 1300 , 1441 e 2857 cm^{-1} . Tale risultato è stato ottenuto nonostante la presenza marcata di un intenso sfondo di fluorescenza.

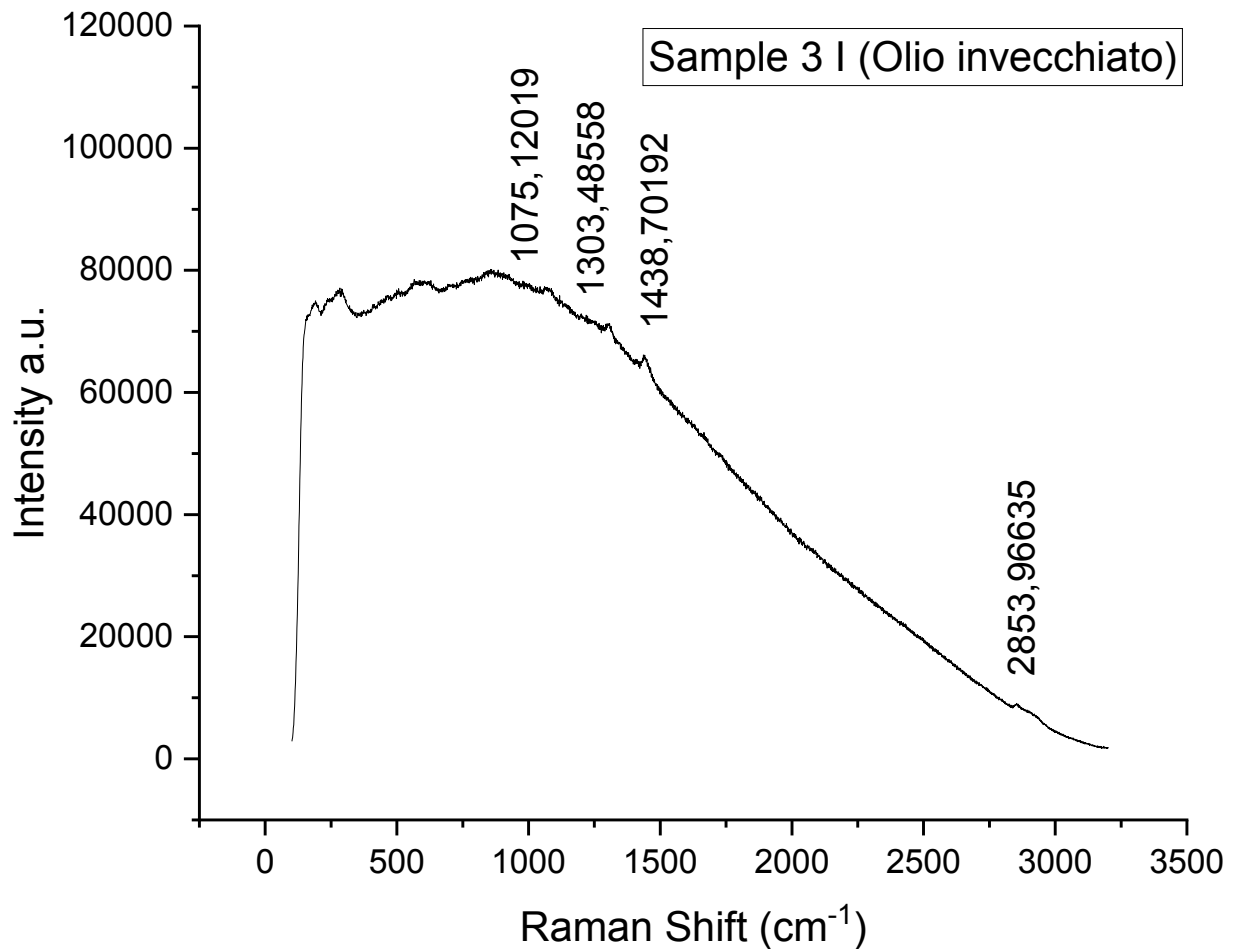


Figura 81 Spettro Raman fisso campione 3I sottoposto a estrazione con acetone

Nel contesto del campione 3I, riscontriamo una situazione analoga, in cui risulta difficile stabilire una baseline chiara. Nonostante ciò, è possibile osservare la presenza di piccole "bande" in prossimità dei picchi che possono essere attribuiti all'olio presente nel campione. Tale evidenza suggerisce che l'olio è effettivamente presente, tuttavia, l'intensità dei picchi potrebbe essere limitata dalla matrice ceramica in cui è inserito. È particolarmente interessante notare che l'olio è ancora osservabile anche in questo campione di coccio, nonostante sia stato sottoposto al trattamento d'invecchiamento. In questo specifico caso, il processo di estrazione è stato eseguito utilizzando acetone anziché cloroformio.

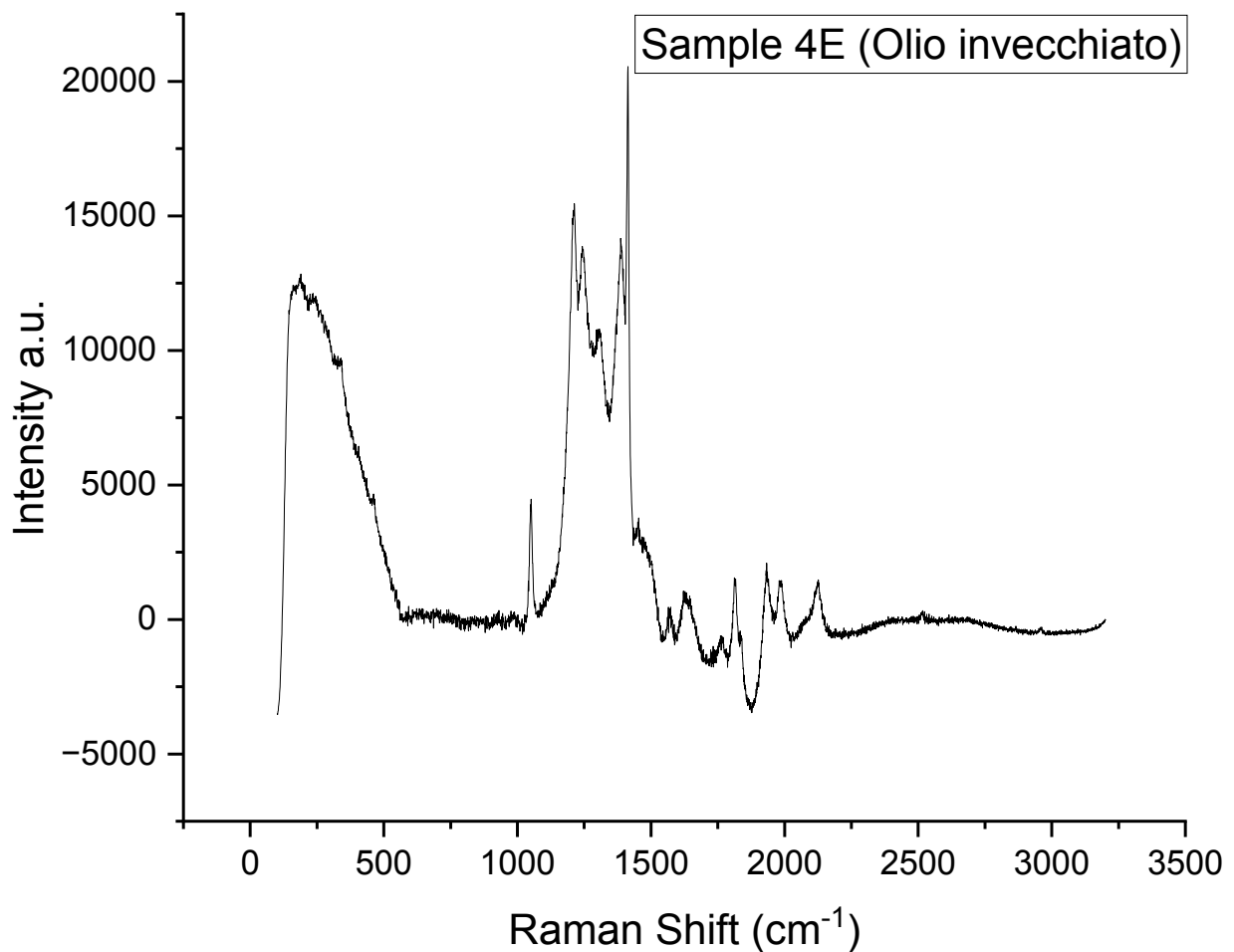


Figura 82 Spettro Raman fisso campione 4E sottoposto a estrazione con acetone

Nel campione 4E, il quale contiene olio invecchiato, è stata utilizzata la tecnica di estrazione con acetone. Tuttavia, durante l'analisi degli spettri ottenuti, non sono stati rilevati picchi riconducibili all'olio. Al contrario, si sono osservati picchi che sembrano essere attribuibili a materia organica, ma che non presentano alcuna correlazione con gli spettri tipici dell'olio.

Questa evidenza suggerisce la possibilità di contaminazioni esterne nel campione. È quindi plausibile ipotizzare che i picchi osservati siano dovuti a sostanze organiche presenti nell'ambiente circostante o introdotte durante la manipolazione del campione.

In conclusione, è possibile affermare che nonostante le sfide presenti, è stato possibile identificare picchi attribuibili alla presenza dell'olio sulla superficie ceramica. Tuttavia, tale identificazione risulta più pronunciata nella regione interna dei cocci, dove la ceramica risulta impermeabilizzata, consentendo un'osservazione più nitida dei segnali spettrali.

3.3 Indagine SERS

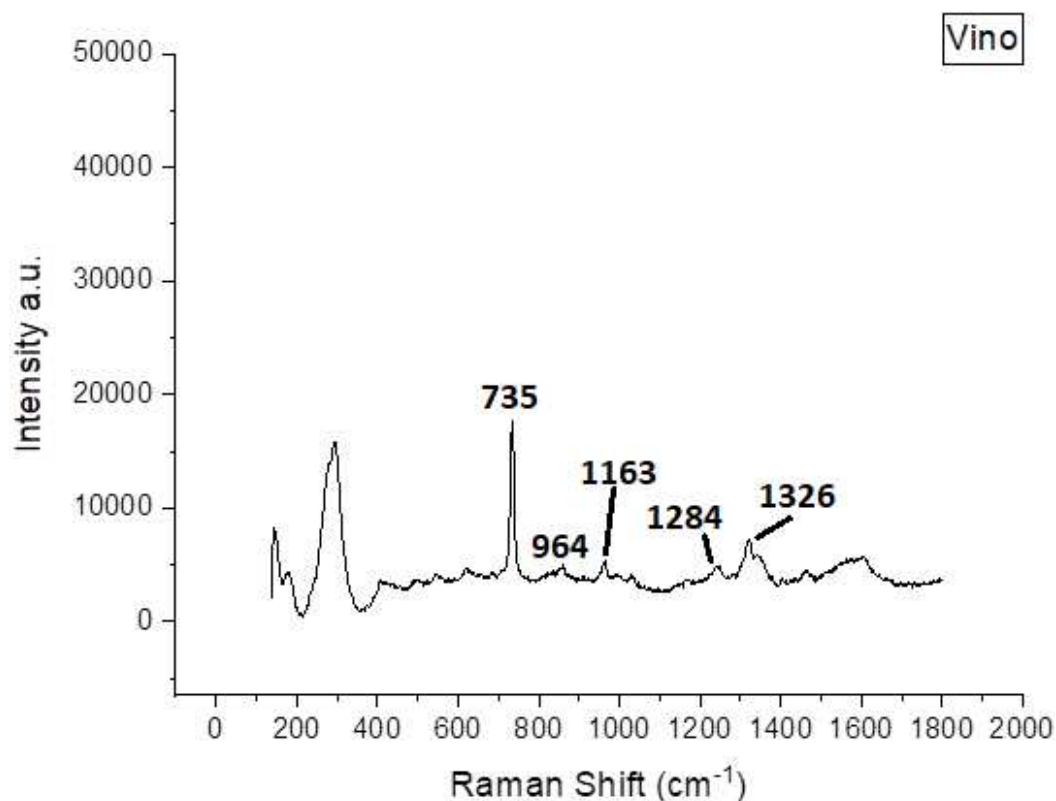


Figura 83 Spettro SERS vino

Il sistema SERS ha dimostrato una notevole stabilità del segnale Raman migliorato (SERS), indicando la formazione di un complesso altamente stabile tra le nanoparticelle d'oro (AuNPs) impiegate e i costituenti presenti nel campione di vino in analisi. Questo risultato è coerente con un'interazione persistente e ben definita tra le AuNPs e le molecole presenti nel vino. Questo aumento suggerisce un maggior coinvolgimento di processi di legame chimico tra le AuNPs e le specie chimiche presenti nel vino. I picchi identificati nei segnali registrati tramite spettroscopia Raman migliorata dalla superficie (SERS) si differenziano dai corrispettivi picchi presenti negli spettri acquisiti mediante la tecnica Raman convenzionale, sia per quanto riguarda la loro posizione che per l'intensità con cui si manifestano.

In particolare, sono state osservate diverse bande che trovano riscontro nella letteratura quali quella a 735 cm⁻¹ attribuibile allo *stretching* dei legami C-C nel fruttosio. La banda a 964 cm⁻¹ è stata associata al *bending* del gruppo estereo presente negli acidi malico, tartarico e succinico. Le bande a 1163 e 1284 cm⁻¹ corrispondono al *bending* dei gruppi CH₂ nel glicerolo. Inoltre, la banda a 1326 cm⁻¹ è stata identificata come lo *stretching* del legame C-C nella malvidina (Simona Cinta Pinzaru, 16 Ottobre 2017).

Nonostante la presenza di un riferimento sufficientemente valido, nell'indagine condotta sulle Vycor mediante l'applicazione di spot con diversi solventi d'estrazione, non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti. Tale situazione può essere attribuita alle problematiche legate alla fluorescenza intrinseca del vino, nonché alle caratteristiche non ottimali della matrice Vycor.

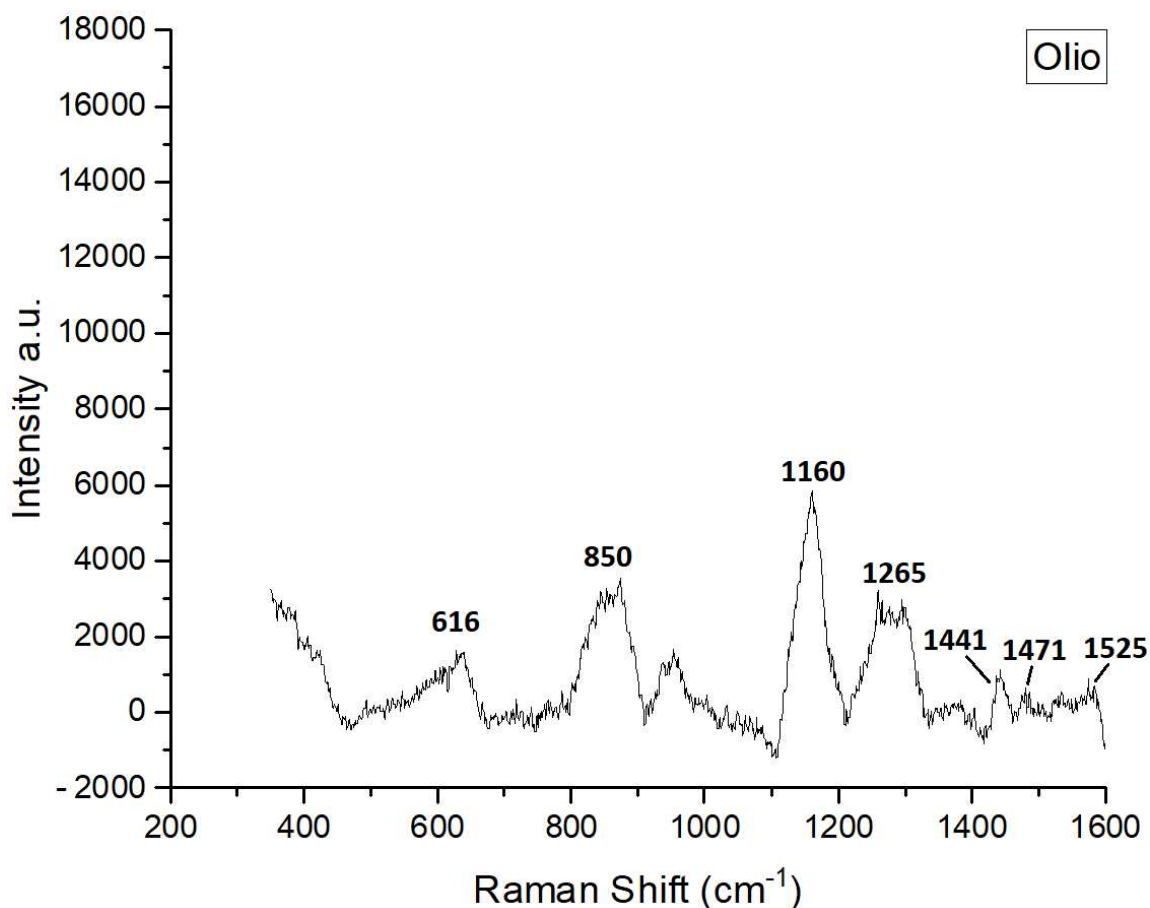


Figura 84 Spettro SERS olio

È stato possibile acquisire il profilo spettrale SERS dell'olio. L'analisi spettrale rappresentata in Fig.84 rivela diverse bande di assorbimento che possono essere collegate a specifici componenti molecolari dell'olio stesso. Queste bande di assorbimento hanno trovato conferma e corrispondenza in studi precedenti. In particolare, a una frequenza di 616 cm^{-1} , è evidente una banda associata alla deformazione dell'anello fenilico presente nei composti fenolici contenuti nell'olio. A 850 cm^{-1} , si osserva una vibrazione attribuita al α -anomero α -glicosidico della cellulosa. Tra 1150 e 1170 cm^{-1} , la banda spettrale riflette le vibrazioni caratteristiche del carotene presente nell'olio. La frequenza di 1265 cm^{-1} è associata al *rocking simmetrico* del doppio legame cis del gruppo C-H nei trigliceridi. Inoltre, a 1441 cm^{-1} si manifesta il *bending* del gruppo CH_2 nei trigliceridi, mentre a 1471 cm^{-1} le vibrazioni del gruppo O-H e dei gruppi CH_2 della cellulosa divengono evidenti

nello spettro. Infine, la frequenza di 1525 cm^{-1} corrisponde allo *stretching* del legame C-C presente nel carotene (C.Camerlingo, 2019).

Le sperimentazioni condotte sulle Vycor, che sono state precedentemente trattate con olio e vino, e successivamente sottoposte a cinque differenti solventi come descritto nel capitolo dedicato ai materiali e ai metodi (*Soluzione e solventi*) non hanno generato risultati di rilievo. Tuttavia, è emerso un risultato interessante nel campione Vycor 1, trattata con olio, nell'area specifica indicata come spot 4, dove è stata introdotta una piccola quantità di HCl. L'analisi spettroscopica ottenuta ha rivelato la presenza di materiale organico estratto; tuttavia, questo non può essere attribuito all'olio precedentemente utilizzato. Invece, è plausibile che sia originato da contaminazioni esterne.

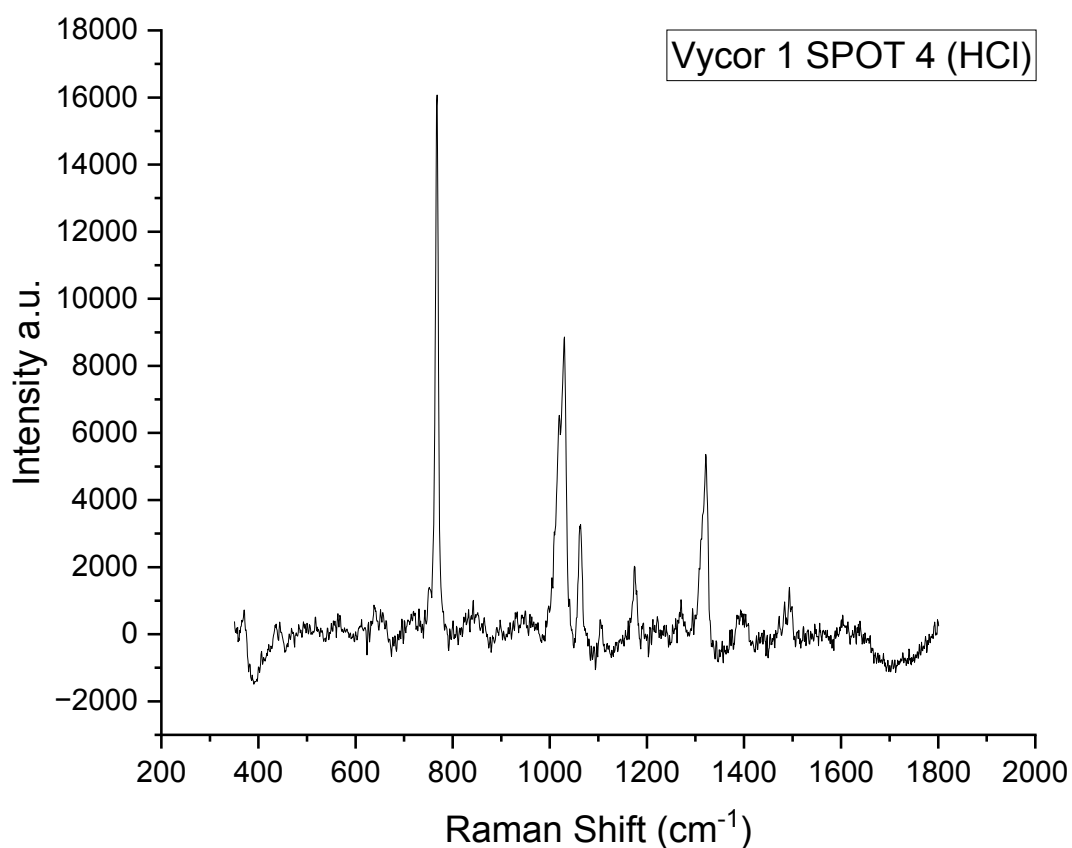


Figura 85 Spettro SERS campione Vycor 1 Spot 4

Discussione

Vasi e recipienti in terracotta o ceramica sono i principali reperti archeologici trovati in siti di sepoltura, religiosi o domestici. Comprendere la loro destinazione d'uso riveste grande interesse per la possibilità di ottenere informazioni sulle abitudini di vita dei popoli antichi, sovente le uniche informazioni per popolazioni che non hanno lasciato tracce documentali scritte. Un'informazione rilevante sulla destinazione d'uso può derivare dall'analisi dei residui organici adsorbiti sul fondo interno del recipiente: tali residui derivano dai processi di degrado ossidativo e idrolitico delle sostanze originariamente presenti, che potevano essere unguenti, alimenti (olio, vino, carne, cereali), cosmetici, etc.

La tipologia di residui è *in primis* caratteristica di una classe di composti (lipidi, proteine, carboidrati, etc.), ma l'analisi di alcuni sottoprodotti ("markers") mediante tecniche analitiche quali HPLC-MS o GC-MS permette di raggiungere un maggior dettaglio sul tipo di prodotto (unguento, alimento, etc.). Fondamentale è anche l'incrocio con altre conoscenze storiche e archeologiche, quali la forma del vaso (che spesso rifletteva il tipo di uso), il tipo di sito (religioso, di sepoltura, domestico), la presenza di scritte o indicazioni, tutti dati che concorrono a formulare un'ipotesi sull'impiego del vasellame reperito. Va sottolineato come il lungo periodo di giacenza nel sottosuolo del vasellame determina sempre processi di degrado e contaminazione che possono alterare in modo significativo il profilo lipidico o proteico (es., autossidazione degli oli, idrolisi, dimerizzazione, etc.) rendendo spesso complesso distinguere tra contaminazioni esterne e materiale originale presente nel vaso. Per questa ragione, l'incrocio e l'impiego di più tecniche analitiche è spesso un requisito essenziale per raccogliere la maggior quantità di dati possibile. Di norma, per ottenere una quantità di residuo organico sufficiente, da 1 a 10 mg di polvere sono raccolti grattando il fondo interno del recipiente, anche se non è raro l'utilizzo di maggiori quantitativi. L'esame di residui organici in vasellame funerario è un approccio frequente, perché si tratta di vasellame spesso non soggetto ad ulteriori contaminazioni, ma l'impiego di tecniche di analisi GC o HPLC richiede sempre una rilevante manipolazione del campione, con dispendio di tempo (e rischio di contaminazione accidentale), anche se tali tecniche offrono un'elevata capacità di riconoscimento. A titolo di esempio, in un recente lavoro, (F. Facchetti, 2012) del residuo organico bruno, presente sul fondo di un vaso cinerario rinvenuto nella necropoli di Tebe, in Egitto, è stato sottoposto ad analisi GC-MS: circa 3 mg di residuo sono stati trattati in soluzione metanolica KOH (KOH 10% in metanolo + KOH 10% in acqua, rapporto 2:3) per saponificare il residuo, e la soluzione è stata trattata con *n*-esano per estrarre i composti neutri. Quindi la soluzione rimanente è stata acidificata, e di nuovo trattata con

etere dietilico per estrarre gli acidi organici. I due estratti, portati a secchezza, sono stati derivatizzati con BSTFA in isoottano. L'analisi successiva della soluzione così ottenuta, mediante GC-MS, ha evidenziato derivati dell'acido abietico (indicativo di resine terpeniche), di acidi grassi saturi C12-C18 mono e dicarbossilici, con un'alta frazione di palmitico, che hanno condotto gli autori a supporre la presenza di una cera di api combinata con una resina, come era prassi nella fabbricazione di unguenti. D'altronde, in un lavoro più recente (F. Siano, 2022), alcuni ricercatori, applicando una metodica simile alla precedente per la caratterizzazione del profilo lipidico mediante GC-MS nell'analisi di residui organici in reperti funerari, pur rilevando la presenza di acidi grassi saturi, e di palmitico in particolare, non ritenevano che la presenza di questo componente fosse indicativa per l'attribuzione ad una cera. Invece, mediante analisi ATR-IR ("prescreening") gli autori furono in grado di identificare picchi caratteristici di idrossiapatite, insieme a chiari segnali di proteina, suggestivi di residui d'osso (matrice minerale + collagene), ed indirizzando la successiva analisi verso la caratterizzazione del residuo proteico mediante analisi proteomica tramite HPLC-MS-MS. Questi due esempi servono ad illustrare la complessità dell'analisi dei residui organici, da un lato, e l'utilità di tecniche di "prescreening" mediante analisi spettroscopica, dall'altro. Di norma, l'analisi IR rappresenta la tecnica di elezione nella caratterizzazione del residuo organico, ma spesso tale tecnica non è sfruttata nel pieno delle sue potenzialità.

Nell'ambito del più generale obiettivo di una caratterizzazione dei residui organici vasellame da corredi funerari della necropoli di Nora, in questo lavoro di tesi si è deciso di valutare metodiche di analisi IR e Raman come tecniche di "prescreening" per la caratterizzazione di residui organici, valutando l'efficacia di analisi ATR-IR e micro-FTIR in riflettanza esterna, con e senza estrazione mediante solvente, e di tecniche Raman e SERS.

Analisi ATR-IR dei campioni su Vycor

Come modelli, si sono scelti dapprima dei dischi porosi di vetro Vycor, sui quali sono stati depositi olio di oliva e vino (sulla base dei materiali che ci si attendeva di trovare nel vasellame di Nora), ed esaminati tal quali e dopo invecchiamento termico, come descritto nella parte dei risultati (sezioni 1.1.1-1.1.5). L'analisi mediante ATR, condotta sulle polveri, ha evidenziato che sia il campione Vycor 1 (campione con olio) sia il campione Vycor 3 (campione con olio invecchiato) mostravano chiari segnali IR relativi all'olio presente, mentre non si rilevavano differenze legate al processo di invecchiamento, che appariva quindi insufficiente ad indurre cambiamenti rilevanti nei limiti dell'analisi ATR-IR. L'analisi ATR comparativa sul campione Vycor 5 (campione con vino) e il

campione Vycor 7 (campione con vino invecchiato) mostrava invece differenze rilevanti: mentre il campione di vino “fresco”, campione Vycor 5, evidenziava segnali riconducibili ad acqua ed etanolo (ma non a tannini o altri componenti minori), il campione Vycor 7 non mostrava alcun segnale, indicativo del fatto che tutte le componenti volatili erano scomparse nel trattamento, mentre quelle fisse non erano rilevabili nei limiti dell’analisi ATR. Il risultato, non sorprendente, è in linea con la difficoltà che si riscontra anche in letteratura nella caratterizzazione di residui organici da vino su reperti archeologici, essendo il residuo non volatile presente in piccolo ammontare.

Analisi ATR-IR dei campioni su coccio

L’analisi ATR applicata a cocci a perdere, provenienti dalla stessa necropoli di Nora, e materialmente simili a quelli da repertare, è descritta nelle sezioni 1.3.1-1.3.4. In questo caso, i cocci furono trattati con olio e vino sia sulla parte interna (corrispondente, cioè, alla parte interna del vaso) che esterna del coccio, tal quali e invecchiati artificialmente. Anche in questo caso, l’analisi ATR ha evidenziato senza problemi la presenza dell’olio, sia deposto sulla parte interna che esterna, nel campione non invecchiato, mentre nel campione invecchiato lo spettro dell’olio si osservava quando esso era deposto nel lato interno, ma non sul lato esterno. Questa significativa differenza può essere verosimilmente attribuita a caratteristiche di diversa permeabilità fra parte interna ed esterna dei vasi da cui i cocci furono prelevati. In tal senso, il trattamento termico di invecchiamento ha favorito probabilmente una maggiore diffusione dell’olio nei pori della ceramica sulla parte esterna. Si può ipotizzare una diversa porosità fra parte interna ed esterna, oppure la parte interna è stata trattata con pece (o altra sostanza resinosa) atta a “chiudere” le porosità per migliorare l’impermeabilizzazione, un trattamento abbastanza comune nei vasi o anfore antichi utilizzati per contenere vino (F.C.Izzo, Gennaio 2013) .

Proprio per valutare la presenza di eventuali residui organici, prima dei trattamenti con olio e vino i cocci sono stati sottoposti a misure ATR sia sul lato interno che esterno (sezioni 1.2.1-1.2.3, e spettri in Appendice). Tuttavia, a parte i segnali della matrice argillosa, solo in un limitato numero di casi (es. campioni 3I e 3E) si sono osservati segnali attribuibili a non meglio identificabili residui organici (*stretching* CH intorno a 3000 cm^{-1} e debole banda a 1440 cm^{-1}). Ulteriori analisi più approfondite saranno necessarie per valutare la natura di tali residui, che potrebbero derivare anche da accidentali contaminazioni.

L’analisi ATR dei campioni 5I (interno coccio, vino) e 6E (esterno coccio, vino) ha evidenziato segnali riconducibili alle componenti più volatili e più abbondanti del vino, quali acqua ed etanolo (sezione

1.3.3), in analogia con quanto visto con le Vycor, mentre il confronto interno-esterno sembra confermare quanto osservato con l'olio: la superficie interna favorisce probabilmente il ristagno superficiale del liquido, che risulta in un segnale IR più evidente rispetto alla superficie esterna del coccio. Infine, per i campioni 7I (interno coccio, vino invecchiato) e 8E (esterno coccio, vino invecchiato), si osservano segnali riconducibili unicamente alla matrice ceramica, confermando che i componenti non volatili del vino sono dispersi in ammontare troppo basso per essere visibili in ATR.

Analisi micro-FTIR dei campioni su coccio

Come riportato nella sezione 2, le analisi micro-FTIR sono state condotte sugli aloni prodotti mediante estrazione con miscela cloroformio-etanolo da polveri dei cocci degli stessi campioni esaminati mediante ATR-IR (campioni 1E, 2I, 3I, 4E, 5I, 6E, 7I, 8E). La metodologia, che combinava l'efficacia dell'estrazione con solvente, in grado di produrre un alone di sola sostanza organica con rimozione della parte minerale, e l'efficacia dell'analisi microFTIR, che focalizza il fascio IR solo nella zona di interesse, ha permesso di osservare spettri ben evidenti del residuo organico, e ovviamente privi di segnali sovrapposti dovuti alle fasi minerali, ciò che è stato naturalmente di grande vantaggio nell'amplificare i segnali di interesse. In questo caso, anche il problema del differente adsorbimento esterno-interno sembra superato. Ad esempio, il campione 1E (olio, esterno), mostra uno spettro caratteristico con picchi stretti e ben definiti, ed in particolare, tutti i picchi dell'olio erano osservabili, ma anche il campione 2I esibiva uno spettro piuttosto evidente, anche se si potevano notare leggere differenze di intensità relativa tra i picchi negli spettri dei due campioni. Come osservato già nell'analisi ATR, il confronto con i campioni con olio invecchiato (3I, 4E) non mostrava sostanziali differenze, anche se piccole differenze nelle intensità relativa tra i picchi relativi agli *stretching* CH e il picco dei carbonili potrebbero riflettere dei modesti effetti legati all'invecchiamento dell'olio, non precedentemente osservati in modalità ATR, probabilmente per effetto della maggiore larghezza di riga dei picchi negli spettri ATR.

Di grande interesse è infine considerare i campioni 5I (Vino, interno), 6E (Vino, esterno), 7I (Vino invecchiato, interno) e 8E (Vino invecchiato, esterno). Innanzitutto, va sottolineato come l'estrazione con formazione dell'alone consente di osservare essenzialmente i componenti non volatili, in quanto si attendeva la completa evaporazione: in effetti, in questo caso, tutti i campioni esibivano uno spettro "pulito" che riportava tutti i principali segnali. In particolare, l'analisi microFTIR del campione 5I esibiva tutti i segnali caratteristici attesi a basso numero d'onda,

riconducibili a C-OH di polifenoli, segnali di *stretching* CH intorno a 3000 cm^{-1} , segnali intorno a 1720 cm^{-1} del carbonile di esteri e acidi carbossilici (si veda figura 49, sezione 2.3). Simile il campione 6E, anche se i segnali a basso numero d'onda erano più larghi e bassi. Ma il dato estremamente interessante, che si discostava dal risultato ottenuto in ATR su Vycor e cocci, è stata la possibilità di ottenere segnali IR evidenti anche dai campioni invecchiati 7I e 8E, che apparivano caratterizzati da più picchi rispetto ai segnali dei non invecchiati, coerentemente con probabili processi di degrado che hanno determinato la formazione di sottoprodotti (figure 51 e 52, sezione 2.4).

Analisi Raman fisso campioni Vycor e cocci a perdere

Nell'ambito delle analisi dei Beni Culturali, il Raman riveste una rilevanza particolare, per la sua elevata risoluzione spaziale, facilità di impiego e specificità: rispetto all'IR, il Raman consente di ottenere spettri i cui picchi sono più stretti e meglio risolti, e negli spettri Raman è accessibile anche la regione a basso numero d'onda, dove modi reticolari o modi normali complessivi della molecola permettono un riconoscimento specifico delle sostanze.

L'analisi mediante Raman fisso su Vycor e cocci è risultata particolarmente complessa, a causa della rilevante fluorescenza dei materiali organici, un problema purtroppo comune nell'analisi dei beni culturali, per effetto degli inevitabili sottoprodotti di degrado che sono sovente debolmente fluorescenti. In particolare, i campioni con il vino risultavano troppo fluorescenti per tale analisi, e non sono stati considerati. I campioni con l'olio, invece, hanno consentito, in taluni casi, l'acquisizione di spettri significativi. Prendendo come riferimento lo spettro Raman acquisito direttamente sulla goccia d'olio (*Fig. 75*), gli spettri Raman acquisiti sui campioni Vycor 1 (olio su Vycor) e Vycor 3 (olio invecchiato su Vycor), dopo correzione per la fluorescenza del vetro, mostravano alcuni dei segnali caratteristici attesi per l'olio (*Fig. 77-78*), con buona riproducibilità dei risultati. Tuttavia, la medesima analisi Raman condotta sui campioni su coccio non era così conclusiva: ad esempio, il campione 2I non esibiva segnali riconducibili all'olio, e solo applicando la procedura di analisi degli aloni formati mediante l'estrazione con cloroformio (la medesima metodica usata per il microFTIR) è stato possibile ottenere degli spettri Raman con deboli segnali riconducibili all'olio, sovrapposti tuttavia su un forte fondo di fluorescenza. La stessa procedura, applicata al campione di olio invecchiato, conduceva ad uno spettro simile (*Fig. 80-81*, sezione 3.2.3). L'analisi dei campioni con olio invecchiato è stata, nuovamente, inconclusiva per effetto della forte fluorescenza, sia nei campioni tal quale sia negli aloni estratti in cloroformio. Utilizzando

l'estrazione con acetone, in un solo caso (campione 4E, figura 82) è stato possibile rilevare la presenza di segnali Raman di residui organici, non dovuti tuttavia all'olio.

Analisi Raman portatile campioni Vycor e cocci a perdere

Si è tentata successivamente un'analisi Raman mediante Raman portatile. Il Raman portatile è meno efficiente del fisso, ma nell'ambito dei beni culturali è interessante, perché permette di effettuare misure in situ, un requisito base in molte applicazioni nei beni culturali. Come riportato nella sezione 3.1, tale analisi è stata complessa e poco fruttuosa. Il forte fondo di fluorescenza delle Vycor (*Fig. 53*) ha reso necessaria una correzione della linea di base, con l'introduzione di artefatti. Inoltre, i segnali Raman risultavano molto più deboli che negli spettri Raman acquisiti con il fisso. Complessivamente, come illustrato nella sezione 3.1.2, gli spettri, pur contenendo dei picchi riconducibili ad olio o vino, risultavano non ben riproducibili, pesantemente influenzati e in modo casuale da fluorescenza dei campioni, e in generale di difficile interpretazione con la possibile presenza di artefatti. Anche l'estrazione con solventi (sezione 3.1.3) non ha portato a risultati di rilievo (così come nel caso delle analisi con Raman fisso).

Più complicata ancora l'analisi con Raman portatile dei cocci, dove i principali picchi delle componenti organiche (vino e olio) risultavano spesso sovrapposte a segnali della matrice argillosa, rendendo pressoché impossibile un'identificazione certa dei residui organici (sezione 3.1.4).

Analisi SERS dei campioni Vycor

Infine, si è voluta valutare l'efficienza del metodo SERS per la caratterizzazione degli organici. Il SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*) è una metodologia basata sulla deposizione di nanoparticelle metalliche (nel nostro caso, nanoparticelle d'oro) che interagiscono con le molecole presenti nel substrato, contribuendo ad amplificarne il segnale Raman. In questo caso, si intendeva principalmente sfruttare due vantaggi del SERS: 1) solo le molecole "solubili" nel solvente possono aderire alle nanoparticelle, e quindi contribuire allo spettro Raman (consentendo così di liberarci della matrice inorganica rigida); 2) la fluorescenza, che crea disturbo, è fortemente abbattuta. In effetti, come descritto nella sezione 3.3, l'analisi SERS (eseguita tramite Raman fisso) e applicata alla caratterizzazione dei campioni Vycor con olio e vino (non invecchiati) ha permesso di ottenere alcuni risultati notevoli: 1) il campione di Vycor con vino esibiva segnali ben definiti, con fluorescenza completamente abbattuta, attribuibili certamente a componenti non volatili; 2) Il campione di Vycor

con olio mostrava segnali assegnati in letteratura allo spettro SERS dell'olio, anche se i segnali apparivano, in questo caso, piuttosto allargati.

Conclusioni

Nel corso delle analisi condotte, si è evidenziato un quadro chiaro delle prestazioni dei diversi metodi di analisi. L'utilizzo della tecnica ATR si è dimostrato efficace nell'identificazione dei picchi caratteristici dell'olio, e in misura meno precisa nel caso del vino. Tuttavia, l'approccio tramite micro-FTIR ha dimostrato di essere il metodo più efficace tra quelli esaminati. Non solo è stato in grado di identificare il vino con precisione anche sui "cocci a perdere", ma ha anche consentito una dettagliata analisi dei vari componenti del vino, mostrandosi particolarmente accurato. L'analisi tramite Raman portatile ha presentato risultati ambigui, con picchi associabili all'olio ma con difficoltà legate alla presenza di fluorescenza e a problemi strumentali. Tuttavia, è emerso che questa metodologia potrebbe rivelarsi molto promettente se impiegata in situ, magari attraverso l'uso di solventi specifici per migliorare l'estrazione dei residui organici. Nel caso del Raman fisso, sono stati ottenuti risultati incoraggianti per l'olio, con l'individuazione dei picchi caratteristici sia nei campioni Vycor trattati con determinati solventi che nelle ceramiche. Tuttavia, queste matrici "ingombranti" hanno reso difficile l'analisi del vino a causa della fluorescenza di fondo. La tecnologia SERS si è rivelata promettente, consentendo l'osservazione separata dell'olio e del vino: infatti, anche se è stato difficile ottenere risultati soddisfacenti sia sui campioni Vycor che sui cocci, l'abbattimento della fluorescenza ha consentito di rilevare la presenza di picchi riconducibili alle componenti non volatili del vino. Qui, l'ottimizzazione dei solventi o l'adozione di altre tecniche di estrazione potrebbero aprire nuove strade di ricerca.

In sintesi, questo studio ha evidenziato l'efficacia differenziata dei vari metodi di analisi. Il micro-FTIR si è dimostrato il più accurato nel complesso, mentre il Raman portatile e il Raman fisso offrono opportunità interessanti con l'adeguata ottimizzazione delle condizioni sperimentali. La tecnica SERS, nonostante le sfide incontrate, ha dimostrato il suo potenziale nell'affrontare la fluorescenza e nello spingere verso ulteriori sviluppi nel futuro.

APPENDICE

Campione Vycor 2 (filtro Vycor con Olio)

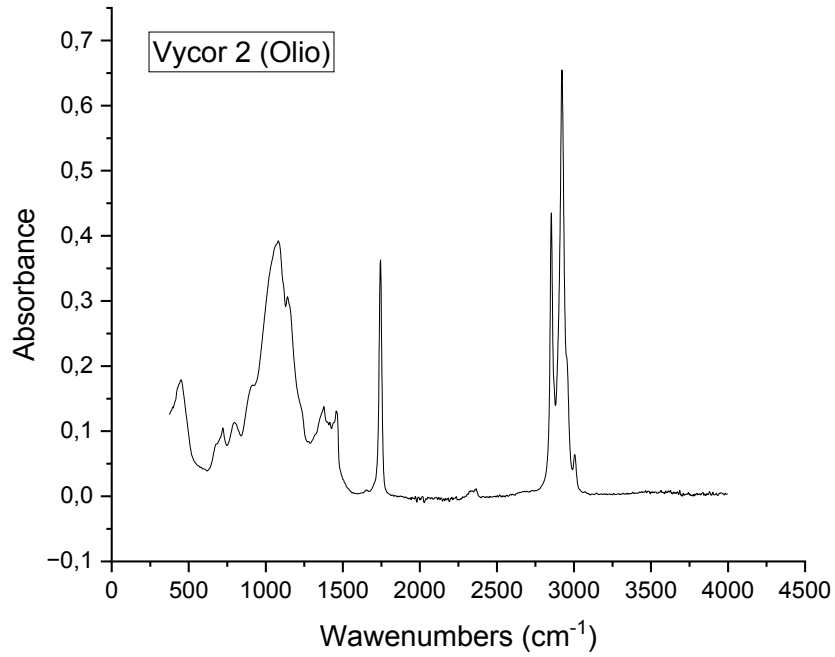


Figura 86 Spettro IR campione Vycor 2

Campione Vycor 4 (filtro Vycor con Olio invecchiato)

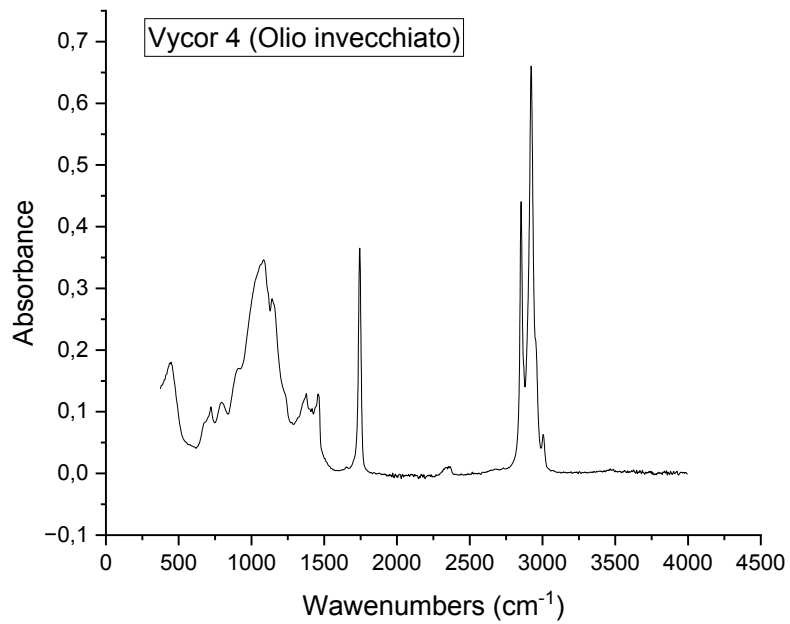


Figura 87 Spettro IR campione Vycor 4

Campione Vycor 6 (filtro Vycor con Vino)

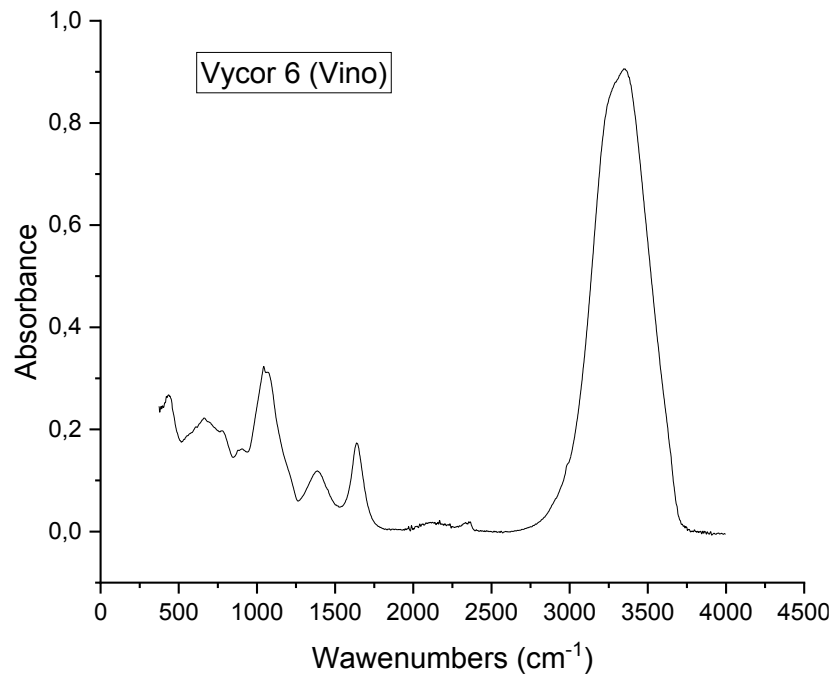


Figura 88 Spettro IR campione Vycor 6

Campione Vycor 8 (filtro Vycor con vino invecchiato)

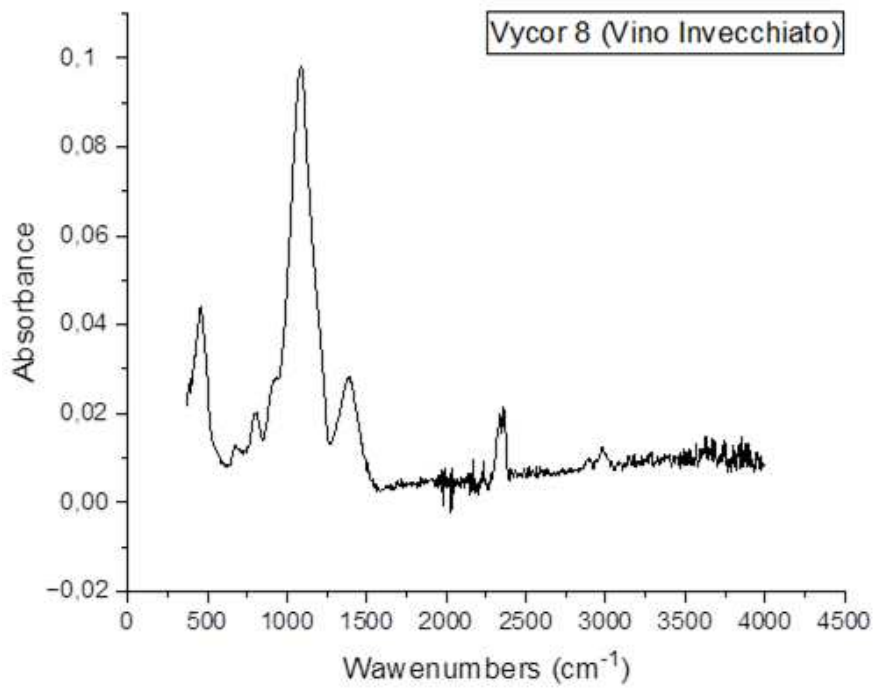


Figura 89 Spettro IR campione Vycor 8

Sample 4. I ed E

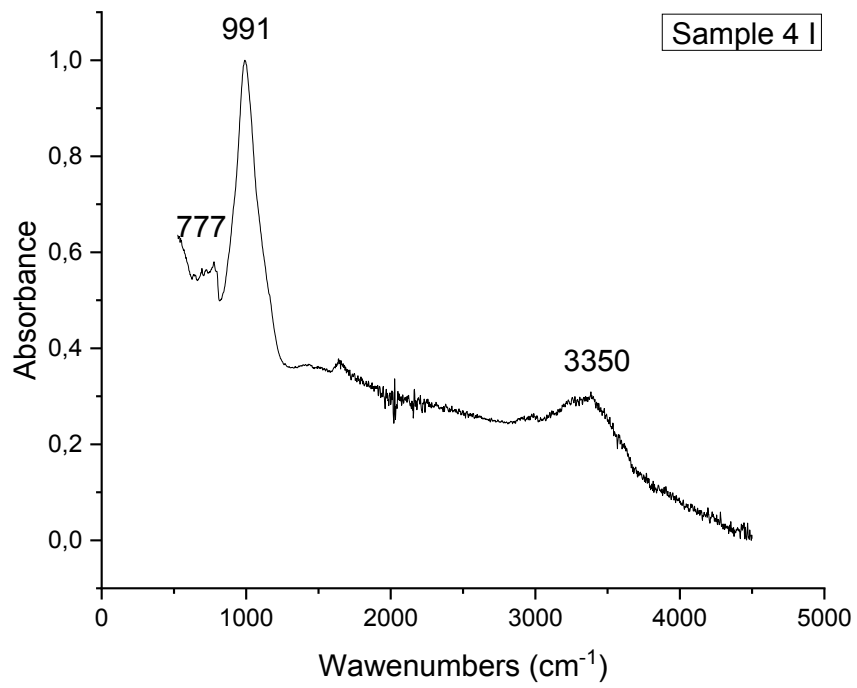


Figura 90 Spettro IR Campione 4 I

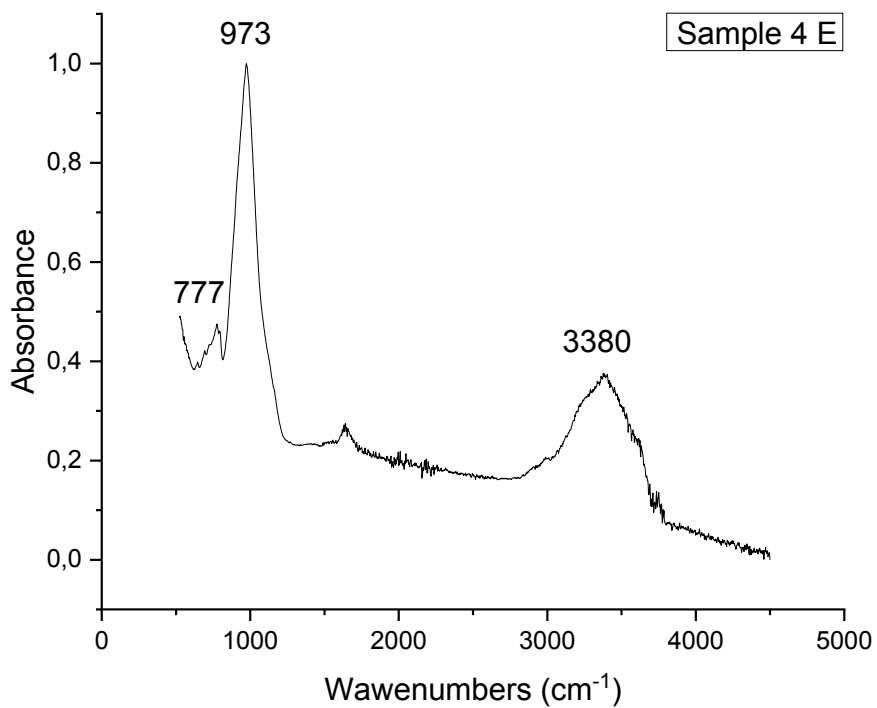


Figura 91 Spettro IR campione 4 E

Sample 5. I ed E

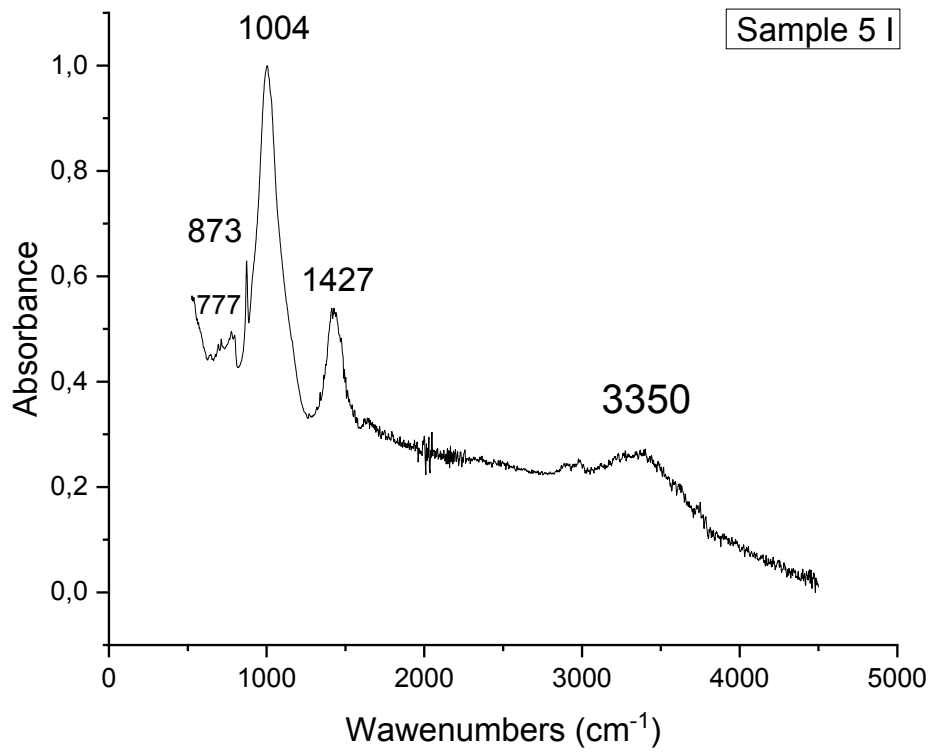


Figura 92 Spettro IR campione 5 I

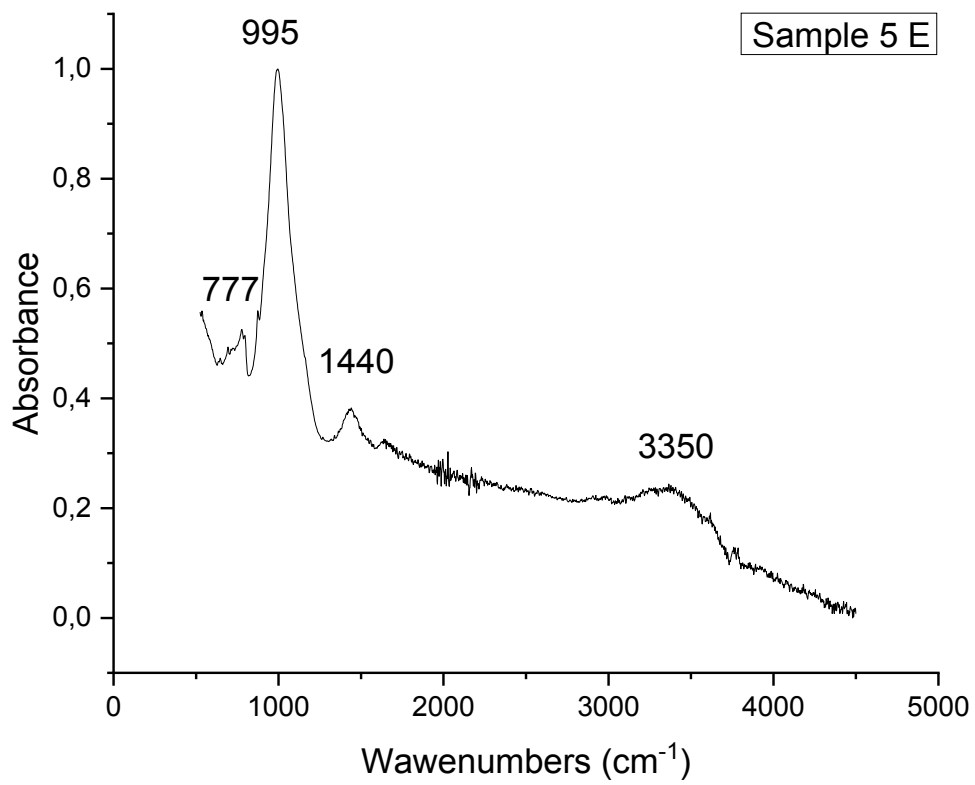


Figura 93 Spettro IR campione 5E

Sample 6. I ed E

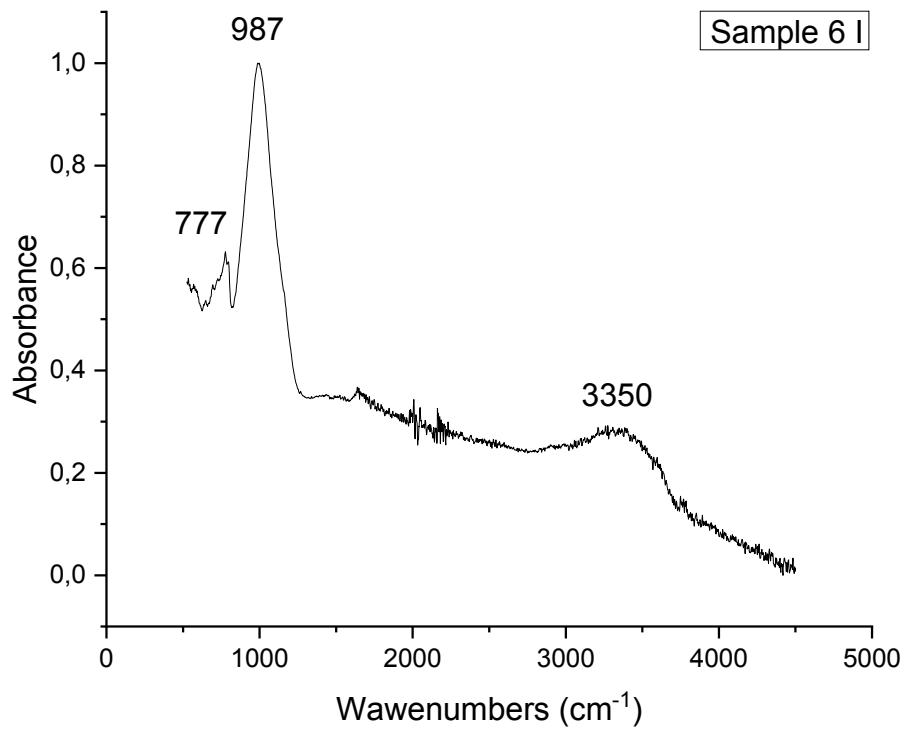


Figura 94 Spettro IR campione 6 I

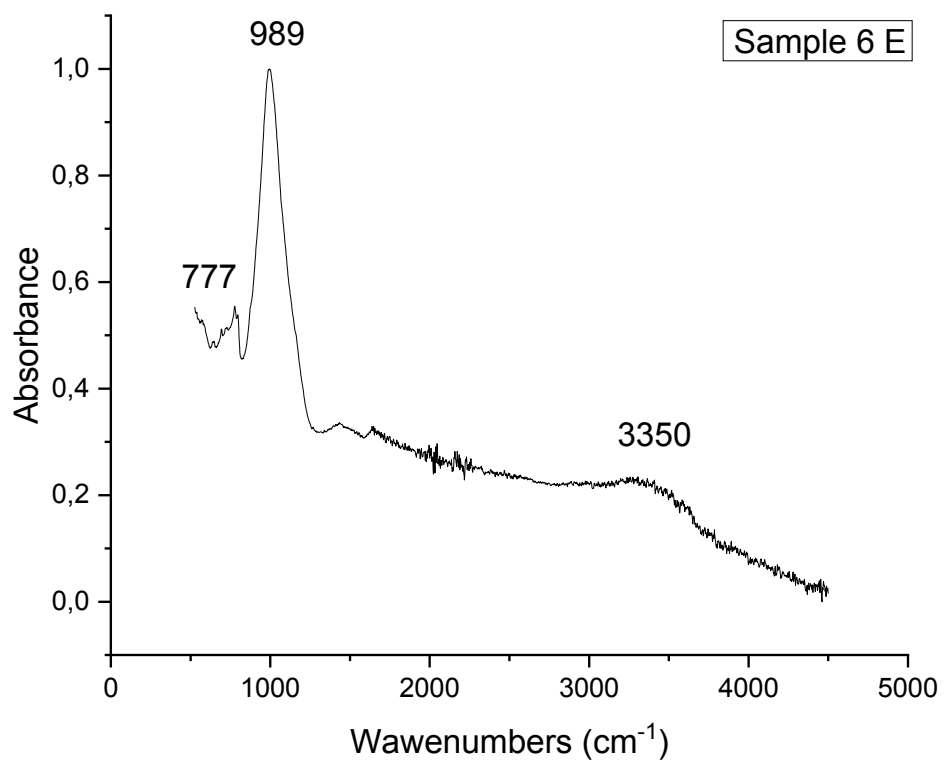


Figura 95 Spettro IR campione 6E

Sample 7. I ed E

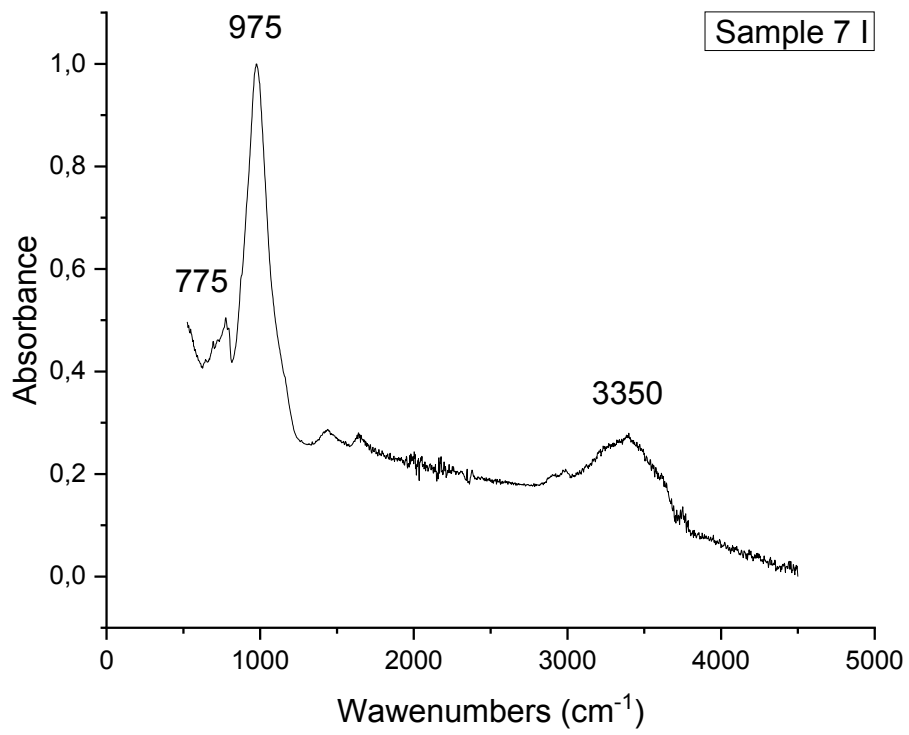


Figura 96 Spettro IR campione 7 I

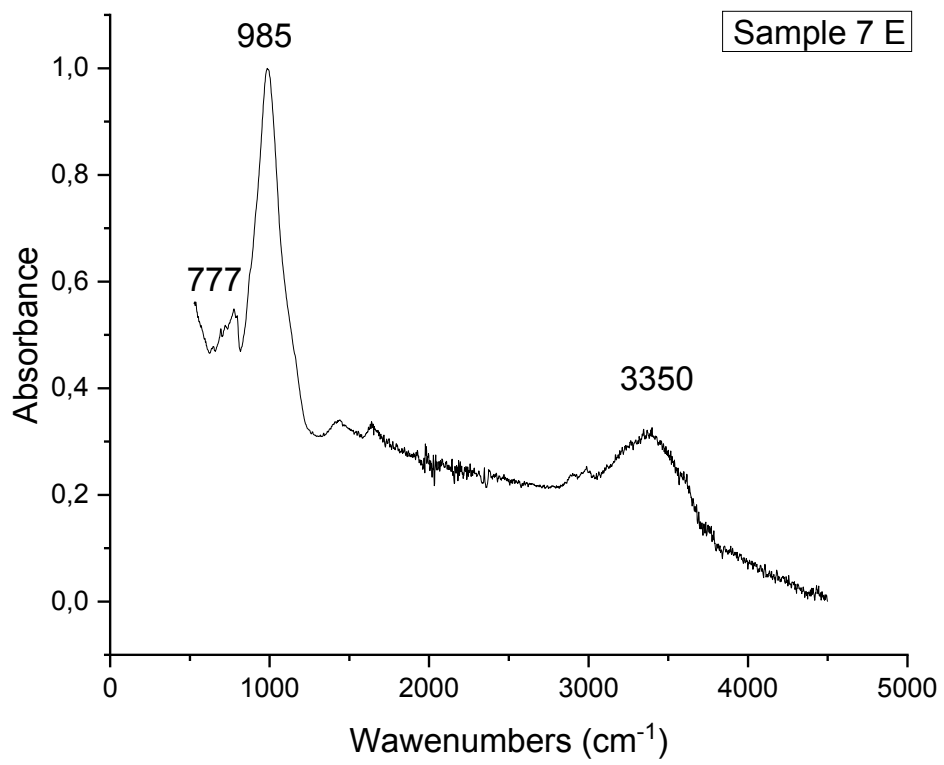


Figura 97 Spettro IR campione 7 E

Bibliografia

- Alexandru Mihai Grumezescu, C. D.-S.-H. (2014). *New silica nanostructure for the improved delivery of topical antibiotics used in the treatment of staphylococcal cutaneous infections*. ELSEVIER.
- Artioli, G. (2010). *Scientific Methods and Cultural Heritage: An introduction to the application of materials science to archaeometry and conservation science*. OUP Oxford.
- C.Camerlingo, M. I. (2019). Raman Spectroscopy for Monitoring Extravirgin Olive Oil Bioactive Components. *Journal of Chemistry*.
- C.R. Kesavulu, H. K. (2017). Physical, vibrational, optical and luminescence investigations of Dy³⁺-doped yttrium. *Journal of Alloys and Compounds*.
- Cláudia A. Teixeira dos Santos, R. N.-S. (2018). Raman spectroscopy for wine analyses: a comparison with near and mid infrared spectroscopy. *talanta*.
- Dimitrios Boskou, G. B. (2006). Olive Oil Composition. *Dimitrios Boskou, Georgios Blekas, and Maria Tsimidou*, 41-72.
- F. Facchetti, E. R. (2012). "Organic residues analysis: the case of a beaker found in Theban necropolis, Egypt". *IJCS*, 3(4), 259-264.
- F. Siano, E. P. (2022). "Proteomics and Integrated Techniques to Characterize Organic Residues in Funerary Findings from Italic Populations of the First Millennium BC". *Journal of Proteome Research*, 21, 1330-1339.
- F.C.Izzo, E. A. (Gennaio 2013). "The study of pitch via gas chromatography-mass spectrometry and Fourier-transformed infrared spectroscopy: the case of the Roman amphoras from Monte Poro, Calabria (Italy)". *Journal of Archaeological Science*, Volume 40, Capitolo 1, Pag. 595-600.
- Frankel, E. (2010). Chemistry of extra virgin oliveoil: adulteration, oxidative stability, and antioxidants. In E. Frankel, *Chemistry of extra virgin oliveoil: adulteration, oxidative stability, and antioxidants*. (p. 58, 5991-6006).
- G.E. De Benedetto, R. L. (2002). *Infrared spectroscopy in the mineralogical characterization of ancient pottery*. *Journal of Cultural Heritage*.
- Haoquan Jin, H. L. (2021). Application of Raman spectroscopy in the rapid detection of waste cooking oil. *Food Chemistry*.

- J. Bonetto, G. B. (2018). *Sardegna Archeologica*. Carlo Delfino Editore.
- Lombardi, J. a. (2009). A unified view of surface-enhanced Raman scattering. In J. a. Lombardi, A *unified view of surface-enhanced Raman scattering*. (p. 42(6):p. 734-74). Accounts of chemical research.
- Mari´a D Guillén, N. C. (2000). *Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions*. SCI.
- McNay, G. e. (2011). Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS): a review of applications. In G. e. McNay, *Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS): a review of applications*. (p. 65(8):p. 825-837). Applied spectroscopy.
- Michele R. Derrick, D. S. (1999). *Scientific Tools for Conservation, Infrared Spectroscopy in Conservation Science*. Los Angeles: The Getty Conservation Institute.
- Monica B., A. B. (2019). *QUALITATIVE AND QUANTITATIVE CHEMICAL COMPOSITION OF WINE*. Academic Press.
- Scano, P. (2021). *Caratterizzazione degli spettri infrarossi medi dei polifenoli dei vini rossi e bianchi mediante l'integrazione di dati spettrali FT IR e UV-Vis*. LWT.
- Simona Cinta Pinzaru, D. A. (16 Ottobre 2017). Ag nanoparticles meet Wines: SERS for wine analysis. *Food Analytical Methods*.
- Tuschel, D. (2016). Selecting an Excitation Wavelength for Raman Spectroscopy. *Spectroscopy solutions for materials analysis*.
- V. Amendola, S. M. (2006). J. Phys. Chem. B. In S. M. V. Amendola, *J. Phys. Chem. B* (p. 110(14), 7232).
- White, J. S. (1987). *La chimica Organica degli oggetti museali*. Elsevier Ltd.