

NUOVE ESCHE PER PESCARE NEL *MARE MAGNUM DELL'EREDITÀ CULTURALE*

PIER GIORGIO RIGHETTI (*) e GLEB ZILBERSTEIN (**)

Nota presentata dal m.e. Claudio Fuganti
(Adunanza del 22 ottobre 2020)

SUNTO. – Viene qui descritto un nuovo strumento per esplorare documenti relativi al patrimonio culturale mondiale evitando la loro contaminazione o danno. Conosciuto con l'acronimo EVA, è costituito da un foglio di plastica di Etilene Vinil Acetato caricato di resine cationiche e anioniche forti con aggiunta di sferette idrofobiche C₈ e C₁₈. Quando sono applicati a qualsiasi superficie, tali fogli possono raccogliere qualsiasi tipo di materiale di superficie, che viene quindi eluito e analizzato tramite mezzi standard, come GS/MS (tipicamente per metaboliti), MS/MS (per analisi di peptidi e proteine), raggi X (per analisi elementare). Esaminiamo brevemente qui una serie di dati di alcuni anni fa, come lo screening di documenti originali di Bulgakov, Chekov, Casanova, Keplero, mentre tratteremo in estenso dati più recenti, relativi a Orwell e Stalin e all'analisi della pelle di una mummia egiziana. La tecnica è stata applicata con successo anche a dipinti, come la Donna Nuda all'Ermitage di San Pietroburgo, attribuita a Leonardo e alla sua scuola. Questa nuova metodologia rappresenta uno strumento formidabile per esplorare la vita passata di famosi autori, scienziati e letterati in quanto può rilevare tracce delle loro patologie e persino il consumo di droghe lasciate da tracce di saliva e sudore sui loro documenti originali scritti a mano.

ABSTRACT. – We describe here a novel tool for exploring documents pertaining to the world Cultural Heritage while avoiding their contamination or damage. Known under the acronym EVA, it consists of a plastic foil of Ethylene Vinyl Acetate studded with strong cation and anion resins admixed with C₈ and C₁₈ hydrophobic beads.

(*) Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica "Giulio Natta", Politecnico di Milano, Italy. E-mail: piorgio.righetti@polimi.it

(**) Spectrophon Ltd, Oppenheimer 7, Rehovot, Israel

When applied to any surface such foils can harvest any type of surface material, which is then eluted and analysed via standard means, such as GS/MS (typically for metabolites), MS/MS (for peptide and protein analysis), X-ray (for elemental analysis). We briefly review here a number of past data, such as screening of original documents by Bulgakov, Chekov, Casanova, Kepler, while dealing in extenso with very recent data, pertaining to Orwell and Stalin and analysis of the skin of an Egyptian mummy. The technique was also successfully applied to paintings, such as the *Donna Nuda* at the Hermitage in St. Petersburg, attributed to Leonardo and his school. This novel methodology represents a formidable tool for exploring the past life of famous authors, scientist and literates in that it can detect traces of their pathologies and even drug consumption left by saliva and sweat traces on their original hand-written documents.

1. INTRODUZIONE

L'interesse per il Patrimonio Culturale Mondiale (PCM) è cresciuto dall'inizio del nuovo millennio. L'analisi, la conservazione e il restauro di PCM richiede la collaborazione interdisciplinare tra una serie di professionisti con diversi background educativi, quali i conservatori, restauratori, archeologi, storici dell'arte, architetti e soprattutto chimici analitici. Quest'ultima categoria, infatti, è stata coinvolta nello sviluppo di una varietà di moderni strumenti che consentono studi diagnostici approfonditi volti non solo a decodificare la composizione chimica dei materiali utilizzati in tutti i tipi di manufatti di PCM, ma anche a sviluppare nuovi materiali e trattamenti di conservazione. Sarebbe impossibile in questa mini-rassegna coprire la vastissima mole di pubblicazioni in questo campo, quindi siamo costretti a rimandare i lettori a un'analisi approfondita della grande varietà di metodi di esplorazione del Patrimonio Culturale, proposti già nel 2016 di Dallongeville *et al.* [1]. Questa rassegna è straordinaria non solo perché è lunga 77 pagine, ma anche perché cita non meno di 603 pubblicazioni, una lista bibliografica che si vede raramente in qualsiasi articolo di recensione. Oltre a questo, citiamo qui un libro pubblicato nel 2017, con Rocco Mazzeo come Editore, composto da undici capitoli che coprono in profondità i più importanti strumenti moderni di analisi di PCM [2].

Tuttavia tratteremo qui alcuni importanti sviluppi avvenuti nel corso dei quattro anni (dal 2017 al 2020) non rilevati nelle due bibliografie sopra citate. Questa sezione è divisa in due parti: metodi strumentali, non invasivi, che non consentono l'analisi chimica diretta poi-

ché non vi è materiale raccolto, e metodi minimamente invasivi, che consentono l'identificazione diretta del materiale raccolto tramite, ad esempio, spettrometria di massa (MS) o altre apparecchiature. Per brevità, invece di descrivere in dettaglio ogni metodo, si rimanda il lettore a una serie di lavori pubblicati, vuoi per i metodi strumentali non-invasivi [2-9], vuoi per le metodiche minimamente invasive [10-18]. A questi affianchiamo qui alcune analisi pubblicate di recente, il cui contenuto si può trovare nei riferimenti bibliografici qui riportati [19-23].

Prima di introdurre la nostra tecnica, che al momento sembra essere l'unica che consente l'esplorazione completa di qualsiasi documento nell'ambito del patrimonio culturale senza produrre alcun danno o contaminazione, vorremmo discutere brevemente l'arte precedente che era stata utilizzata per l'analisi del PCM, in assenza di danneggiamenti. È il metodo di sfregamento di Collins *et al.* [24, 25] basato sull'estrazione triboelettrica, cioè la raccolta molecolare elettrostatica provocata dallo sfregamento della superficie di un documento con un polimero di PVC (poli vinil cloruro). Sebbene si debba dare credito al gruppo di Collins per aver ideato per la prima volta un metodo non invasivo nell'analisi dei Beni Culturali, la loro tecnica soffre di alcune limitazioni. Per cominciare, si basa su un'azione meccanica, regolata da principi fisici. Inoltre, il loro metodo è monocorde, poiché non può essere adattato né modulato secondo diversi scopi e ambiti in diversi campi di ricerca. Come discusso di seguito, il nostro metodo qui presentato e valutato è veramente rivoluzionario e offre alcuni vantaggi distinti rispetto a tutte le altre tecniche trattate sopra.

2. LA METODOLOGIA EVA: CHIMICA E MECCANISMO D'AZIONE

La *Fig. 1A* mostra schematicamente una porzione di un film EVA e il suo meccanismo di adsorbimento (qui sono evidenziate solo resine con cariche forti sia positive sia negative): i due tipi di cariche agiscono interagendo con proteine a carica opposta sulla superficie di un campione in analisi, quindi catturandole. La *Fig. 1B* mostra infatti strisce di EVA circondate da una nuvola di proteine adsorbite. Fondamentalmente, quindi, EVA è una particolare tecnica cromatografica che potrebbe essere classificata come una colonna a letto misto. La cromatografia a letto misto si basa su una miscela di assorbenti che supportano vari ligandi impaccati in una singola colonna e dove ognuno di essi svolge un ruolo per adsor-

bire e rilasciare singole proteine, gruppi proteici o metaboliti. Quindi il nostro film EVA può essere assimilato a queste colonne impaccate a letto misto tranne che è sotto forma di una cartuccia a stato solido (in effetti, pellicola). I meccanismi di cattura sono quindi puramente cromatografici e seguono le stesse regole di base.

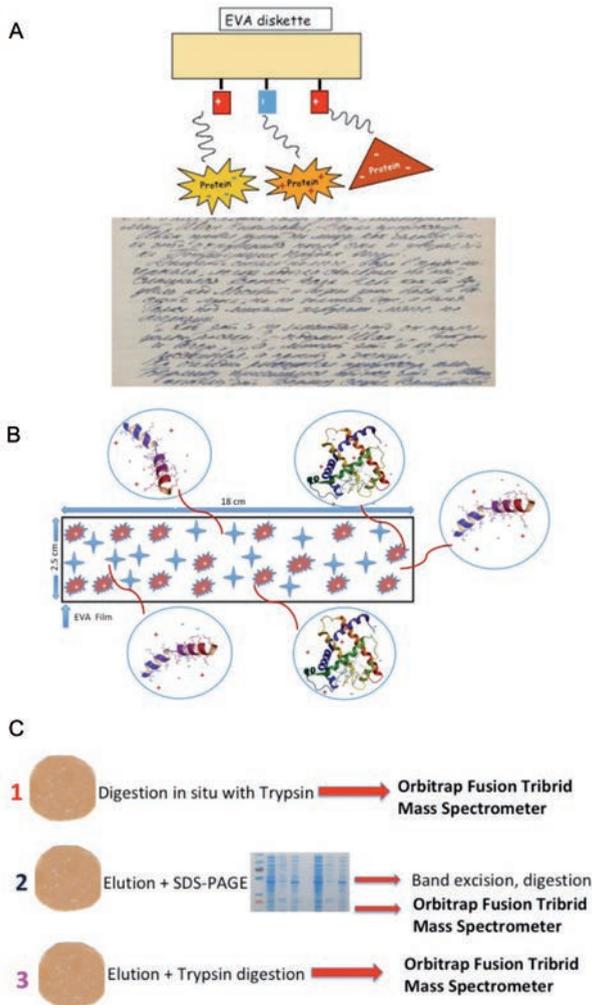


Fig. 1. A: rappresentazione del meccanismo di un dischetto EVA nella cattura di proteine dalla superficie di un documento. B: un film EVA circondato da una nuvola di proteine adsorbite. C: tre protocolli differenti per l'analisi di proteine catturate.

La *Fig. 1C* mostra una serie di modi in cui il materiale proteico catturato può essere analizzato. Potrebbe essere digerito in situ con tripsina e i peptidi così generati, dopo purificazione su Zip-tip, sequenziati tramite spettrometria di massa (MS). Se fosse stato raccolto un numero molto elevato di proteine, queste potrebbero essere eluite e ulteriormente separate tramite SDS-PAGE (sodio dodecil solfato, poliacrilamide gel elettroforesi). A loro volta, singole bande possono essere asportate, digerite, i peptidi purificati e nuovamente inviati a uno spettrometro di massa per il sequenziamento. In una terza variante, tutte le proteine possono essere eluite, digerite e i peptidi finali inviati per l'identificazione in MS. In quest'ultimo caso sono applicati due diversi protocolli di eluizione: i dischetti EVA vengono prima trattati con acido formico, in modo da raccogliere proteine caricate positivamente, seguito da trattamento con ammoniaca, per raccogliere specie caricate negativamente. Questi due solventi, essendo volatili, possono essere facilmente eliminati prima dell'analisi MS. Descriveremo ora, in modo succinto, i nostri primi risultati.

3. ANALISI DI MANOSCRITTI E ABITI DI FAMOSI PERSONAGGI STORICI

3.1. *Michail Bulgakov*

Le nostre incursioni nel campo dei Beni Culturali sono iniziate nel 2015, quando siamo andati a Mosca per esplorare il manoscritto originale di Michail Bulgakov, *Master i Margarita*. Bulgakov iniziò a scrivere il romanzo nel 1928, ma bruciò il primo manoscritto nel 1930. Il lavoro fu riavviato nel 1931 e questa seconda bozza fu completata nel 1936, a quel punto tutte le principali linee di trama della versione finale erano definite. Tra il 1936 e il 1940, anno della sua morte, seguirono altre quattro versioni. Abbiamo avuto accesso a 110 pagine dell'ultimo manoscritto e abbiamo potuto esplorare i margini di 12 di esse. Sappiamo che negli ultimi quattro anni della sua vita, quando continuava a rivedere il suo capolavoro, soffrì di una malattia renale che alla fine lo portò alla tomba. Poiché si sapeva che si era laureato in medicina e aveva persino prestato servizio nell'esercito come medico durante la rivoluzione dell'ottobre 1918, abbiamo ipotizzato che in questo periodo critico avrebbe potuto usare la morfina per alleviare il dolore e mantenere la mente concentrata sul romanzo. Difatto, quando abbiamo analizzato l'eluato tramite GS /

MS, abbiamo trovato in tutti i margini livelli di morfina che vanno da un minimo di 5 fino a 100 ng/cm². Inoltre, abbiamo eseguito la scansione 2-D in situ dei margini di due pagine e abbiamo potuto mappare un'impronta digitale con diversi livelli di morfina sulla superficie del pollice [26]. Dopo la pubblicazione di questi dati, sono piovute critiche da esperti di letteratura russa, che sostenevano che non c'erano documenti storici sull'utilizzo di morfina da parte di Bulgakov, quindi hanno attribuito le impronte digitali non a lui, ma agli agenti segreti dell'NKVD, che avevano sequestrato il manoscritto per ordine di Stalin e per rinchiuderlo nel quartier generale della Lubjanka. Un'obiezione legittima, tra l'altro, considerando che, in assenza d'impronte digitali archiviate e autentiche nei registri di polizia, attribuirle a una persona specifica potrebbe essere un grave errore. Tornati a Mosca, abbiamo analizzato i margini di parte delle pagine precedenti e di nuove, questa volta alla ricerca non più di metaboliti ma di proteine. Tra le proteine salivari identificate, tre di loro ci hanno fornito un indizio unico: peristina, N-acetil-beta-glucosaminidasi e nefrina, noti bio-marcatore di patologie renali, hanno suggerito che le impronte digitali analizzate fossero quelle di Bulgakov e non degli agenti della polizia segreta [27]. Sarebbe abbastanza strano pensare che tutti gli agenti segreti soffrissero della stessa patologia di Bulgakov! Inoltre, è dubbio che questi agenti appartenessero alla classe degli intellettuali e passassero il loro tempo libero a sfogliare in gran segreto le pagine di questo superbo romanzo.

3.2. *Anton Chekhov*

Chekhov è considerato uno dei poeti, romanzieri e drammaturghi più brillanti non solo tra i russi ma anche tra l'intelligenza mondiale. È ampiamente accettato oggi che, insieme a Henrik Ibsen e August Strindberg, Chekhov sia una delle tre figure seminali nella nascita del primo modernismo nel teatro. Le sue quattro opere classiche, *The Seagull*, scritto nel 1896, seguito da *Uncle Vanya* e dalle sue ultime due opere teatrali, *Three Sisters* e *The Cherry Orchard* sono ancora tra le più rappresentate nei maggiori teatri del mondo. Melikhovo è un piccolo villaggio a 60 miglia a sud di Mosca; ospita lo *State Literary and Memorial Museum-Reserve A.P. Chekhov*. Ci è stato gentilmente concesso l'accesso al museo e ci è stato permesso di analizzare alcuni oggetti appartenenti al drammaturgo, tra cui cinque diverse lettere e cartoline, nonché la camicia indossata da lui sul letto di morte. Stavamo cercando tracce del

Mycobacterium tuberculosis poiché era noto che questo agente patogeno aveva causato la sua morte (Koch aveva identificato il batterio nel 1882 e Chekhov, anche lui medico, sapeva che era affetto da questo agente). Purtroppo nessuna traccia del *M. tuberculosis* fu da noi trovata nei suoi scritti. Il museo ha anche conservato in una teca sigillata la camicia che indossava nel letto di morte e, dopo aver posizionato la pellicola EVA sul colletto ed eluito il materiale catturato, sono state rilevate tracce evidenti di otto proteine di *M. tuberculosis*, insieme ad altre 108 proteine umane (principalmente salivari) e 20 cheratine [28]. Abbiamo ipotizzato che Chekhov avesse toccato il colletto con le dita bagnate di saliva. Di per sé tali risultati non sono eccezionali, poiché confermano fatti storici. Ciò che è unico è che tracce di batteri (in termini di proteine sopravvissute, non di un batterio integrale ancora infettivo!) fossero ancora presenti in un indumento di 115 anni.

3.3. I registri di morte dell'epidemia di peste del 1630 a Milano

Un'epidemia di peste nel 1630 spazzò via metà della popolazione della Lombardia e della città di Milano (le statistiche dell'epoca suggerivano un bilancio delle vittime tra 200 e 300mila). Abbiamo appreso che i registri dei decessi compilati all'interno del lazzaretto (un'enorme struttura, 370x375 m alla periferia della città che durante i mesi di punta, da giugno a ottobre, ospitava fino a 12000 persone infette) erano conservati nell'Archivio di Stato di via Senato a Milano. Solo una dozzina di tali registri erano sopravvissuti, forse su alcune centinaia, considerando l'enorme numero di vittime. Li abbiamo esaminati tutti e abbiamo applicato i dischetti EVA ai margini di >20 pagine. I risultati sono stati piuttosto straordinari: abbiamo potuto identificare >600 proteine, tra cui >25 proteine di *Yersinia pestis*, due di antrace, diverse proteine vegetali che rappresentavano i magri pasti degli scribi e persino cheratine da ratti che probabilmente scorrazzavano sulle pagine di notte in ricerca di briciole di cibo [29]. I risultati delle due proteine dell'antrace sono davvero unici e inaspettati. Sostengono fortemente l'ipotesi che alcune persone non siano morte di peste (*Yersinia pestis*) ma a causa di altre infezioni opportunistiche concomitanti, come l'antrace, che hanno mostrato sintomi diversi seguiti da una sepsi molto rapida e morte. È evidente dai registri delle morti che non tutte le persone erano morte a causa della peste (come annotato nella diagnosi per ogni paziente) ma che ca. il 2% morì per febbre molto alta senza bubboni visibili, come tipico dell'infe-

zione polmonare da antrace, quindi i nostri risultati concordano e supportano questi dati. Questo rapporto, dopo la pubblicazione, ha avuto una risonanza mondiale ed è stato riportato da molti quotidiani in tutto il mondo, nonché in programmi televisivi e siti Internet. Ne siamo rimasti sorpresi, ma va sottolineato che la peste ha spaventato l'umanità da millenni, considerando che anche i versi iniziali dell'Iliade di Omero riportano un attacco di peste nel campo greco, inviata da Apollo!

3.4. *Johannes Kepler*

Gli archivi dell'Accademia delle Scienze russa nella filiale di San Pietroburgo ospitano una vasta collezione di scritti di Keplero (>3500 pagine, probabilmente la più grande del mondo). Abbiamo analizzato diverse pagine di un libro da lui scritto dedicato all'astronomo greco Hipparchus, in realtà uno studio dell'orbita della luna intorno alla terra. Qui la strategia era diversa: il film EVA era impregnato con diversi chelanti di metalli (sodio 2,3-dimercapto-1-propansolfonato, acido meso-2,3-dimercaptosuccinico e acido etilen-diammino-tetra-acetico), per la raccolta di potenziali tracce di metalli, se presenti, depositati sulla superficie delle pagine. Fummo in grado di rilevare quantità molto significative (fino a 20 volte superiori rispetto all'ambiente) di metalli diversi, vale a dire: Au, Ag, Hg, As, Pb, suggerendo che Keplero, noto come astronomo, astrologo, matematico e teologo luterano, potrebbe aver anche praticato l'alchimia [30]. Sebbene i nostri risultati siano stati confermati da tre diversi metodi, vale a dire la spettroscopia fotoelettronica a raggi X, seguita dalla spettrometria di massa a tempo di volo di ioni secondari e dalla spettrometria di massa ad analizzatore al plasma accoppiato induttivamente, abbiamo avuto forti difficoltà nel pubblicare il manoscritto, poiché non esistevano documenti storici su fatto che Keplero avesse mai praticato l'alchimia. Tuttavia il suo amico astronomo, Tycho Brahe, era un devoto praticante di quest'arte e nel 1599 si era trasferito a Praga alla corte dell'imperatore Rodolfo II. Il primo gennaio 1600 Tycho invitò Keplero a unirsi a lui nello stesso luogo, dove Keplero fu assunto come matematico imperiale. I due vissero insieme per undici mesi a Praga, fino alla morte di Tycho nell'ottobre 1601, quando Keplero fu nominato astronomo di corte. Abbiamo quindi ipotizzato che Brahe avesse trasmesso la sua passione a Keplero, che avrebbe potuto iniziare a praticare l'arte dell'alchimia (almeno al momento della stesura della storia d'Ipparco) per poi abbandonarla più tardi nella vita.

Inutile dire che, vivendo nel Sacro Romano Impero, Keplero non aveva alcun interesse a rivelare quest'attività, poiché avrebbe potuto avere seri guai con l'Inquisizione!

3.5. *Giacomo Casanova*

La Biblioteca Nazionale di Francia a Parigi (un magnifico edificio del XIX secolo in Rue Richelieu) ospita l'intera collezione di libri delle famose Memorie di Giacomo Casanova (anche qui una collezione gigantesca: 12 libri, >4600 pagine) che ha firmato anche con il titolo nobiliare di "*Chevalier de Seingalt*". Stavamo cercando possibili tracce del batterio della gonorrea, poiché Casanova ha ammesso di aver sofferto fino a nove recidive di questa malattia venerea durante la sua vita. Non siamo riusciti a rilevare nemmeno la più debole traccia. Si è scoperto che eravamo abbastanza ingenui, considerando che nella vita reale i laboratori di chimica clinica hanno forti difficoltà a rilevarlo nei pazienti affetti e devono ricorrere a test immunologici complessi e ad alta sensibilità. Tuttavia abbiamo notato parecchie macchioline rosse nelle pagine analizzate, in cui abbiamo potuto misurare livelli di HgS fino a 0,04 mg/Kg (di grammatura carta), cioè 20 volte superiori ai livelli di fondo. L'HgS (solfuro di mercurio, noto come cinabro) era stato ampiamente utilizzato dai pittori medievali per colorare di rosso le vesti di apostoli e santi, ignari della tossicità di questo pigmento [31]. Verso la fine del XV secolo HgS era stato adottato anche negli esseri umani, quando i marinai di Cristoforo Colombo erano tornati dal Nuovo Mondo, per curare la sifilide di cui erano stati infettati dai nativi. A quei tempi ne erano somministrati per via orale grammi ai pazienti, uccidendo il batterio oltre che i pazienti. Successivamente è stato utilizzato come farmaco sulla pelle per curare la gonorrea. Abbiamo quindi ipotizzato che al momento della stesura delle Memorie Casanova avesse avuto una ricaduta della sua patologia e stesse usando HgS come rimedio. Non è stato un progetto facile, però. Abbiamo dovuto bussare alle porte della biblioteca per circa un anno e, quando siamo stati ammessi, ci è stata concessa appena un'ora per visionare poche pagine dei capitoli 1 e 2. Eppure è stata un'esperienza quasi mistica che ci ha portato a studiare a fondo e a rivalutare la figura di Casanova. Storicamente è stato raffigurato come un libertino e come un Don Giovanni, ma questa è una rappresentazione totalmente sbagliata. All'età di 12 anni entrò all'Università di Padova e nel 1742, all'età di 17 anni, si laureò in giuri-

sprudenza. Studiò anche filosofia morale, chimica e matematica ed era molto interessato alla medicina. Durante la sua vita fu associato a re, papi e cardinali europei, insieme a luminari come Voltaire, Goethe e Mozart. I ruoli che svolse nella sua vita sono variegati: a sua volta è stato avvocato, sacerdote, ufficiale militare, violinista, uomo d'affari, diplomatico, spia, politico, medico, matematico, filosofo sociale e scrittore. Era anche un accorto esperto finanziario: sapendo che il tesoro dello stato francese era in pessime condizioni, creò una lotteria di stato (il Lotto come praticato oggi!) e fu il primo amministratore di questo progetto di raccolta fondi e uno dei suoi migliori venditori di biglietti. Il tesoro della Francia fu notevolmente migliorato e lui stesso guadagnò una grande fortuna. Anche nelle sue galanti avventure, il suo "harem" era in qualche modo limitato, poiché ammetteva di aver avuto relazioni amorose con "solo" 122 donne, che trattava in modo galante. È paradossale, in un certo senso, quello che Leporello canta a Donna Elvira nel celebre Don Giovanni di Mozart sul numero delle sue conquiste: in Italia, 640; in Germania, 231; in Francia 100; in Turchia 91 ma in Spagna sono già 1003! Probabilmente, questa parodia era un'esagerazione delle imprese e delle relazioni amorose di Casanova. Giacomo conosceva Lorenzo Da Ponte, librettista di Mozart e, nell'ottobre 1787 a Praga, assistette alla prima esecuzione dell'opera di Mozart e crediamo che si sia divertito a riconoscersi nella parodia del Don Giovanni e delle sue stesse relazioni sessuali.

3.6. *Leonardo da Vinci*

Il Museo dell'Ermitage di San Pietroburgo ospita una serie di dipinti di Leonardo da Vinci. Ci fu dato accesso a uno di loro, la Donna Nuda, acquistato da Catherine II (la Grande) dalla collezione R. Walpole, Houghton Hall, Inghilterra, nel 1779. In realtà oggi questo dipinto è attribuito in parte a Leonardo e in parte alla sua scuola. Eppure è importante perché si crede che sia un precursore della più famosa Gioconda al Louvre. Abbiamo applicato cinque dischetti EVA al corpo e al paesaggio per sessanta minuti. Dopo l'eluizione dai dischetti recuperati, il materiale raccolto è stato analizzato mediante gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) nonché mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa (LC/MS). La "tempera grassa" (composta di olio di lino additivato con tuorlo d'uovo) è stata utilizzata in tutto il dipinto. La superficie è stata poi protetta da uno strato di resina di

conifere. Ipotizziamo che l'accesso allo strato sottostante lo strato protettivo sia stato ottenuto tramite micro-fessure nella resina di conifera stessa. L'olio di rosmarino è stato utilizzato come diluente per rallentare il processo di essiccazione e quindi per eseguire la tecnica di smaltatura, ottenendo così la "prospettiva aerea" in corrispondenza del paesaggio [32]. A nostro giudizio, questa è la prima volta in cui un dipinto di Leonardo è analizzato in profondità ma anche in cui la sua tecnica artistica viene decifrata attraverso moderne tecniche di esplorazione dei Beni Culturali. Alcuni di questi dati meritano di essere sottolineati: per cominciare, la presenza dell'essenza di rosmarino non era mai stata segnalata prima, sebbene già nel 1560 Vasari affermasse nel suo celebre libro (*Le Vite de 'più Eccellenti Architetti, Pittori, et Scultori Italiani, Cimabue Insino a 'Tempi Nostri*) che Leonardo utilizzasse oli di composizione sconosciuta. Curiosamente, rimuovendo i dischetti dalla superficie della tela, si respiravano aromi di rosmarino e di pineta, quest'ultima dovuta ai mono-terpeni volatili presenti nella resina di conifere. Ci si potrebbe chiedere perché tali composti volatili fossero ancora presenti sulla superficie della tela dopo alcuni secoli dalla sua creazione. Abbiamo ipotizzato che i terpeni avessero formato complessi con sali metallici e pigmenti sulla tela e che i dischetti EVA li avessero rimossi competendo con tali legami non covalenti.

Sebbene non siano direttamente correlati all'uso di dischetti EVA, abbiamo eseguito altri studi sulle tele di Leonardo tramite nuovi strumenti software che abbiamo sviluppato. In un caso, abbiamo potuto valutare la presenza della Sezione Aurea (meglio ancora, la Spirale Aurea) in alcuni suoi dipinti, come Madonna Litta, Madonna Benois, Madonna del Garofano e La Belle Ferronnière. Inoltre, il nostro software potrebbe valutare il potenziale decadimento dei pigmenti nelle tele nel corso dei secoli. Nel dipinto della Madonna Litta, infatti, abbiamo riscontrato che il colorante azzurrite si è lentamente trasformato nel pigmento verde malachite [33]. In un altro manoscritto, abbiamo valutato una disposizione peculiare delle figure in alcuni dei suoi dipinti (specialmente quelli raffiguranti la Madonna con il Bambino) che chiamiamo "distribuzione radiale". Nei dipinti di Leonardo (Madonna Litta, Madonna Benois), Botticelli (Madonna del Libro) e Raffaello (Madonna della Seggiola) abbiamo rilevato che la testa del Bambino è compresa in un cerchio interno che poi si allarga fino a inglobare anche la testa della Madonna. Questa distribuzione radiale delle figure conferisce a questi dipinti un'armonia e uno splendore unici che è assente nelle icone bizan-

tine che rappresentano gli stessi soggetti nel corso dei secoli, da circa il III secolo d.C. fino alla caduta di Bisanzio (Costantinopoli) [34].

Dopo aver brevemente riassunto le ricerche del passato che sono state già riportate e commentate in editoriali, procediamo ora a presentare in modo approfondito alcune delle indagini più recenti.

4. IL CODICE ALEPPO E I ROTOLI DEL MAR MORTO

Si doveva dimostrare che la tecnica EVA potesse essere utilizzata senza arrecare danni ai documenti scritti su pergamena, poiché questo supporto è sensibile all'umidità e ha migliaia di anni. Uno di questi è il codice di Aleppo, un manoscritto rilegato medievale dell'Antico Testamento ebraico. Il codice fu scritto nella città di Tiberiade, nell'attuale Israele settentrionale, nel X secolo a.C. La comunità ebraica di Gerusalemme acquistò il codice circa cento anni dopo che era stato realizzato. Durante la prima crociata, la sinagoga fu saccheggiata e il codice fu trasferito in Egitto, dove fu conservato in una sinagoga nel vecchio Cairo. Pare che nel 1375 uno dei discendenti di Maimonide lo portò ad Aleppo, in Siria, che gli dette il nome attuale. È ora (2019) in mostra nel Santuario del Libro presso il Museo di Israele. Abbiamo notato, in diverse pagine che abbiamo analizzato, che i margini sono corrosi e contaminati da macule diffuse. Per capire l'origine di questo decadimento questi margini sono stati studiati applicando i dischetti EVA per la raccolta del materiale di superficie. I composti catturati sono stati eluiti, digeriti con tripsina e analizzati mediante nano-HPLC-MS. Tre principali ceppi di *Aspergillus* sono stati identificati tramite una serie di proteine specifiche, vale a dire *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus pseudoglaucus*, *Aspergillus amstelodami*, insieme a un ceppo di *Lactobacillus* e a cheratine umane. La novità di questa indagine è che per la prima volta la tecnologia EVA è stata applicata su pergamene antiche in assenza di deformazioni meccaniche o distorsioni che potrebbero essere indotte se ci fosse stato scambio d'acqua tra i dischetti EVA e la pergamena. Inoltre, al fine di accertare l'origine della sfumatura nera nelle aree contaminate, abbiamo purificato e concentrato il materiale eluito. L'analisi mediante spettri UV-Vis nella regione da 200 a 800 nm ha fornito uno spettro coincidente con quello della melanina di due diversi produttori chimici. Abbiamo inoltre sviluppato tecniche che danno la possibilità di prelevare estratti da singole fibre di pergamena al microscopio. Questo metodo offrirebbe

la possibilità di campionare direttamente dalle singole fibre su qualsiasi componente microscopico dei fogli di pergamena [35].

In un'altra linea d'indagine, abbiamo analizzato alcuni frammenti dei Rotoli del Mar Morto (DSS), ritenuti la biblioteca di un gruppo ebraico vissuto a Qumran tra il I secolo a.C. e il 68 d.C. Nel 1947, un beduino che allevava capre sulle colline a ovest del Mar Morto entrò in una grotta vicino al Wadi Qumran in Cisgiordania e inciampò in barattoli di argilla pieni di rotoli di cuoio. Nel decennio successivo furono scoperte altre dieci grotte che contenevano decine di migliaia di frammenti appartenenti a oltre 900 rotoli. La maggior parte dei rotoli è passata sotto il controllo della Israel Antiquities Authority nel 1967. Il DSS include oltre 225 copie di libri biblici che vanno da piccoli frammenti a un rotolo completo del profeta Isaia e ogni libro della Bibbia ebraica. Ci è stato dato accesso ad alcuni frammenti dai curatori dell'Israel Antiquities Authority per indagare su un mistero ancora irrisolto: come possono le lettere aderire al substrato di pergamena, visto che l'"inchiostro" utilizzato non è un pigmento ma è fuliggine, cioè polvere di carbone? Si disperderebbe nel vento o semplicemente alitandoci sopra. Per cominciare, abbiamo dovuto svelare un'altra potenziale forma di decadimento, ovvero la presenza di macchie scure nella maggior parte dei documenti che abbiamo ispezionato. Come sospettato, dopo aver eluito il materiale raccolto dai dischetti EVA e analizzato mediante LC/MS, abbiamo scoperto che queste macchie scure erano composte da melanina suggerendo anche qui la presenza di Aspergilli, in particolare il ceppo *niger*. I risultati più interessanti, però, sono venuti dall'analisi del materiale catturato dalla lettera "lamed" (lambda in greco) in uno dei frammenti: il legante che incolla la lettera alla pergamena è risultato essere una complessa miscela di proteine vegetali (ribulosio bifosfato carbossilasi, ramnogalatturonato liasi, α -galattosidasi A, calmodulina, tra quelle identificate) nonché di alcune glicoproteine con diverse combinazioni di unità pentosiche ed esosiche. Queste proteine sono mescolate con acidi vegetali (acido stearico, palmitico, oleico, linoleico e linolenico) e terpeni (triacontanolo, catechina, lupeolo). Una volta asciugata, questa complessa miscela (che lega la fuliggine alla pergamena ma forma anche uno strato ultrasottile sulla superficie delle lettere) garantisce un'adesione duratura [36]. Si tratta quindi del primo esempio di "colla biologica", ben prima della "colla animale" (ovoalbumina, collagene, caseina) che fu ampiamente utilizzata nella pittura medievale.

5. GEORGE ORWELL

Orwell è noto come autore di libri fondamentali (*Nineteen Eighty Four*, *Animal Farm*) che, camuffati da favole, denunciano crimini sociali e distorsioni implementati da governi totalitari e stati autoritari, quali inganni ufficiali, sorveglianza segreta, terminologia sfacciatamente fuorviante e manipolazione di storia registrata. Tra questi governi antidemocratici identifica non solo il fascismo di Mussolini e il nazismo di Hitler, ma anche il comunismo di Stalin, visto come il traditore delle teorie originali di Marx-Engels. Tuttavia, prima di scrivere questi capolavori, era arrivato a Barcellona nel dicembre 1936 e si era arruolato nelle Brigate internazionali per combattere la conquista fascista della repubblica spagnola. Servì nell'esercito repubblicano come caporale per 115 giorni, fino alla fine di maggio 1937, quando fu colpito alla gola da un cecchino e quasi ucciso. Dopo aver ricevuto solo un trattamento esterno sommario, il 29 maggio fu curato in un ospedale di Barcellona, dove fu infettato dal bacillo di Koch. Dopo essere fuggito dalla Spagna il 23 giugno 1937, si rifugiò nel suo cottage a Wallington, nell'Hertfordshire, da dove scrisse una lettera a Sergey Dynamov, direttore della rivista sovietica "Letteratura straniera". Siamo venuti a sapere che questa lettera è conservata nell'Archivio Statale russo di Letteratura e Arti (RGALI) a Mosca, registrata come "l'unica e sola lettera di Orwell all'Unione Sovietica". Abbiamo quindi deciso di analizzare i margini di questa lettera e il sito della sua firma alla ricerca di potenziali tracce del bacillo di Koch. Avevamo poche speranze che in questo difficile caso ci saremmo riusciti, visto che la lettera era dattiloscritta (vedi Fig. 2), quindi non erano presenti tante tracce biologiche su questa singola pagina! Eppure abbiamo applicato cinque dischetti EVA sulla superficie della pagina, quattro agli angoli e uno sulla sua firma, alla ricerca di tracce biologiche. Dopo l'eluizione del materiale catturato e le analisi di spettrometria di massa, tre delle cinque strisce hanno prodotto chiare tracce di sei proteine del batterio *M. tuberculosis* (vedi Fig. 3) [37]. Potrebbe sembrare un miracolo, considerando che il documento è stato scritto a macchina. Tuttavia, tracce del batterio sono state trovate nei due angoli superiori e nella firma, ma non nei due angoli inferiori della lettera, che servivano da controlli negativi. L'unica spiegazione possibile è che Orwell abbia toccato la parte superiore del documento, mentre lo rilasciava dalla macchina da scrivere, con le dita umide di saliva.

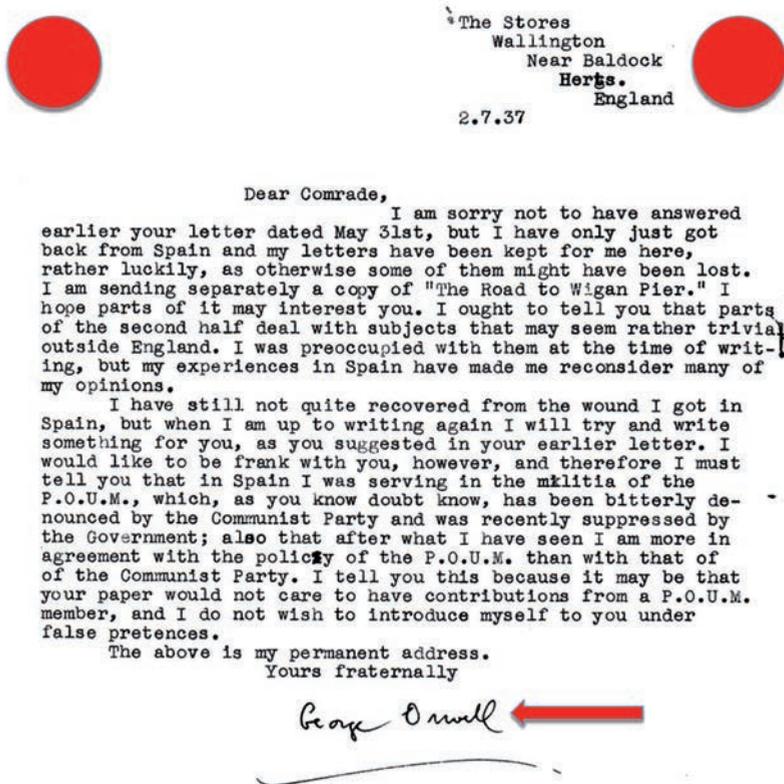


Fig. 2. Foto della lettera originale di Orwell reperita nel Russian Government Archive of Literature and Arts (RGALA) a Mosca. I due cerchi rossi mostrano la posizione dei due dischetti EVA applicati negli angoli superiori della pagina, mentre la freccia indica la posizione del disco EVA sulla firma di Orwell.

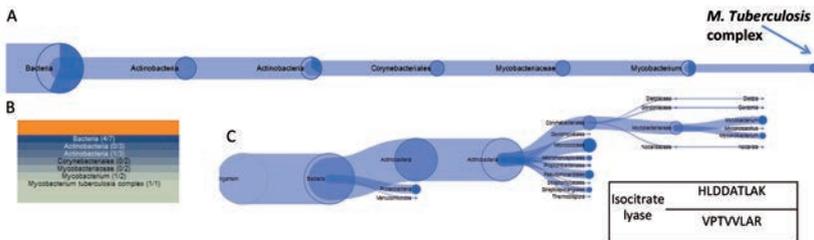


Fig. 3. Risultato finale dell'approccio di meta-proteomica che mostra l'identificazione corretta di M. tuberculosis.

6. JOSEPH VISSARIONOVICH STALIN

I due leaders che furono sotto enormi pressioni durante la seconda guerra mondiale erano Winston Churchill e Joseph Stalin poiché i loro rispettivi paesi dovevano sostenere la maggior parte del peso della guerra, almeno in Europa. Lord Moran ha raccontato nel suo libro di memorie *Winston Churchill: The Struggle for Survival*, che aveva diagnosticato un disturbo bipolare a un Churchill di mezza età. Lo stesso Churchill si riferiva spesso ai suoi periodi di depressione intensa e prolungata come al suo “cane nero”. Al contrario, non si sa molto sulle condizioni mentali di Stalin, anche se nel 1927 il neurologo V. M. Bekhterev, il giorno prima della sua morte improvvisa, dopo un lungo esame dello stato mentale del leader, dichiarò di averlo trovato affetto da paranoia. Tuttavia, dei due leaders non è stata fornita alcuna prova diretta tramite analisi di chimica clinica. Abbiamo avuto accesso alla collezione di libri (conservati nell'Archivio di Storia Sociale e Politica del governo russo, RGASPI, dell'ex Istituto di Marxismo e Leninismo sotto il Comitato centrale del Partito comunista dell'URSS) che Stalin stava leggendo durante la seconda guerra mondiale, con pagine contenenti annotazioni personali ai margini. In particolare, ci siamo concentrati sul romanzo *Ivan Grozny* (Ivan il Terribile) pubblicato da Aleksey Nikolaevich Tolstoy nel 1937. Questa è la copia personale di Stalin, con abbondanti annotazioni scarabocchiate da lui nella prima pagina vuota dopo la copertina. Parte del testo quivi scarabocchiato indica le sue continue preoccupazioni sugli eventi bellici, considerando che nel 1942 la Russia era sotto un secondo, devastante attacco dell'esercito nazista. Abbiamo applicato diversi dischetti EVA sulla superficie di questa pagina vuota e su altre quattro pagine del libro annotate da Stalin ai margini. Dopo l'eluizione del materiale catturato e l'analisi spettroscopica con fotoelettroni a raggi X, Li è stato identificato come il metallo principale catturato nelle diverse pagine con livelli di $\sim 100 \pm 8 \text{ ng/cm}^2$ [38]. Notiamo qui che questi livelli sono quelli tipici che circolano nei fluidi corporei (inclusi sudore e saliva) dei pazienti trattati con sali di litio per curare bipolarità e paranoia. Nonostante che tali informazioni non possono essere trovate in nessun libro di storia, questi dati sono la prima chiara indicazione che Stalin era sotto cura per questa patologia. Inutile dire che i nostri dati sono stati attaccati ferocemente dai revisori, alcuni dei quali hanno chiesto il rigetto immediato sulla base del fatto che la cura con sali di Li per la bipolarità era stata segnalata per la prima volta solo nel 1949 da un medico australiano. Questa è una gros-

solana falsificazione dei fatti storici, infatti, poiché questa cura era stata proposta già nel 1871 da William Hammond, professore di Malattie della mente e del sistema nervoso al Bellevue Hospital Medical College di New York. La Fig. 4 mostra la copertina del romanzo (a sinistra), la casella del litio nella tabella di Mendeleev (centro) e un'immagine di Stalin.

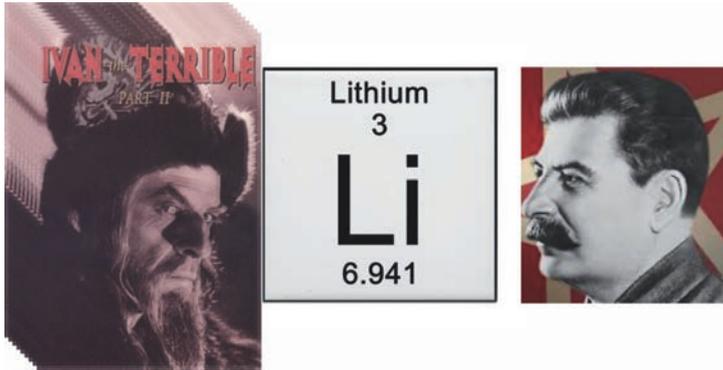


Fig. 4. Sinistra: copertina del romanzo *Ivan il Terribile*; centro: casella del litio nella tabella di Mendeleev; destra: immagine di Stalin.

7. UNA MUMMIA EGIZIANA

Sembra opportuno terminare questo excursus con l'analisi di una mummia egizia, considerando che si tratterebbe del più antico articolo storico analizzato (di circa 4500 anni) finora con lo strumento EVA. L'analisi scientifica degli individui mummificati può rivelare dettagli importanti sul modo in cui le persone vivevano e morivano in passato. Gli approcci paleo-proteomici sono in linea di principio adatti per ottenere informazioni sull'entità della conservazione dei tessuti, sull'uso di "balsami" a base di proteine, sulla presenza di patogeni e/o sulla risposta immunitaria dell'organismo. Tuttavia, queste analisi richiedono solitamente la distruzione di un campione di tessuto, una pratica oggi scoraggiata dalla maggior parte dei musei. Qui la tecnologia EVA si è rivelata ottimale per estrarre le proteine dalla pelle (in questo caso il cuoio capelluto) di una mummia dell'antico Egitto. La mummia in questione è stata denominata "la Ragazza con l'abito plissettato" (Fig. 5) (Supp. 16747 del Museo di Antropologia ed Etnografia dell'Università di Torino) che visse e morì tra il 2400 e il 2200 a.C., durante il Regno d'Egitto. Tramite dischetti EVA

applicati al cuoio capelluto della mummia abbiamo potuto recuperare e autenticare diversi tipi di catene di collagene [α -2 (I), α -1 (I), α -1 (III), α -2 (V), α -1 (V)], cheratine (tipi I e II) nonché proteina 9-9 associata alla cheratina, proteina 3-2 associata alla cheratina, proteina 4-6 associata alla cheratina e proteina 4-3 associata alla cheratina. Oltre a questo abbiamo trovato un vasto arsenale di meta-proteomi sulla superficie del corpo mummificato, che probabilmente rappresentano inquinanti ambientali (funghi, batteri) la cui origine, però, non può essere adeguatamente accertata. Fondamentalmente, è abbastanza difficile, se non impossibile, discriminare funghi e/o batteri presenti sulla superficie del corpo o al momento della sua mummificazione, o da contaminanti recenti. Questa mummia è arrivata al Museo di Torino nel 1920 in seguito alla Missione Archeologica di Giovanni Marro ed Ernesto Schiaparelli in Egitto (Gebelein), e ha quindi trascorso gli ultimi 100 anni in varie condizioni di conservazione.



Fig. 5. La ragazza dalla veste pieggettata. In alto: vista dal retro del teschio, che mostra una ciocca di capelli ondulati; in basso: dettaglio del cranio, dello scalpo e del punto di applicazione del dischetto EVA.

8. CONCLUSIONI

Nunc est bibendum
Nunc pede libero pulsanda tellus
[Ora è il momento di festeggiare (bere),
ora è il momento di ballare a piedi nudi].

Celebreremo la nascita di questa nuova metodologia per lo screening delicato dei beni culturali (in assenza, ripetiamo, di danni e contaminazioni) con questi famosi versi di Orazio (Quinto Orazio Flacco) o no? Diremmo di essere cauti! Per cominciare, non siamo d'accordo con questi versi che Orazio compose per celebrare la morte di Cleopatra, la regina egiziana, che odiava in quanto nemica del popolo romano. In realtà Cleopatra era una "combattente per la libertà" che voleva liberare l'Egitto dalla schiavitù dell'Impero Romano ed è così che la celebriamo oggi. In secondo luogo, bisognerebbe vedere molti altri laboratori che raccolgano la tecnica e producano dati, cosa che sicuramente accadrà non appena i dischetti EVA appariranno sul mercato (al momento, comunque, abbiamo molte richieste di collaborazioni da tutto il mondo). In un certo senso, però, abbiamo motivo di rallegrarci poiché di recente è apparso un documento che descrive una tecnica di campionamento molto simile alla nostra metodologia EVA, il che suggerisce che gli scienziati stanno cercando di trovare modi alternativi, ma basati su ciò che abbiamo pubblicato finora. Ci riferiamo al lavoro di Calvano *et al.* [40] che hanno descritto un metodo semplice per un'analisi quasi non invasiva dei leganti nelle opere d'arte, basato sull'uso di un idrogel di poli (2-idrossietil metacrilato)/poli (vinilpirrolidone) molto piccolo (3 mm x 3 mm) precedentemente imbevuto di tripsina per la digestione in situ di proteine e applicato sulla superficie degli oggetti. Il metodo è stato convalidato su strati pittorici di modelli freschi e invecchiati; le immagini al microscopio ottico e la spettrofotocolorimetria hanno confermato che non si sono verificati né danni né alterazioni del colore dello strato pittorico e che non sono rimasti residui d'idrogel. La spettroscopia fotoelettronica a raggi X eseguita su modelli di vernice ha confermato che il trattamento con gels impregnati di tripsina non ha modificato la composizione del pigmento, anche su campioni invecchiati. Le cose si stanno muovendo, dopotutto!

Al momento di terminare, i lettori potrebbero obiettare che, sebbene abbiamo presentato molte applicazioni della tecnica EVA, non

abbiamo fornito alcuna prova della sua “innocenza”, vale a dire l’assenza di danni o contaminazione di qualsiasi oggetto in esame. Obiezione giusta, quindi citiamo qui due articoli di Manfredi *et al.* [41] e Barberis *et al.* [42] che effettivamente provano con approfondite analisi che tutti gli oggetti analizzati (compresi dipinti su tela e affreschi) sono stati lasciati intatti. Nelle stesse due relazioni, le proprietà fisico-chimiche dei fogli EVA sono descritte accuratamente.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo i tanti colleghi che hanno collaborato a tutti i progetti qui presentati, i cui nomi possono essere trovati in tutti i nostri articoli pubblicati presentati di seguito. Il loro contributo è stato fondamentale per il successo di tutti questi progetti. In particolare, i ringraziamenti sono dovuti alla Dr.ssa Alfonsina D’Amato, Università Statale di Milano, alla Prof. Beatrice Demarchi (Università di Torino) e al gruppo del Prof. Emilio Marengo (Università del Piemonte Orientale in Alessandria).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Dallongeville, S., Garnier, N., Rolando, C., Tokarski, C., Proteins in art, archaeology, and paleontology: from detection to identification, *Chem. Rev.* 116, 2–79 (2016).
- (2) Mazzeo, R. (Ed.) Analytical Chemistry for Cultural Heritage, in *Topics in Current Chemistry Collections*, vol. 374 (2016).
- (3) Sendrea C, Carsote C, Badea E, Adams A, Niculescu M, Iovu H. Non-Invasive characterization of collagen based materials by NMR-MOUSE and ATR-FTIR. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 78, 1-12 (2016).
- (4) Rehorn C, Blgmich B. Cultural Heritage Studies with Mobile NMR. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 7304 – 7312 (2018).
- (5) Nodari L, Ricciardi P. Non invasive identification of paint binders in illuminated manuscripts by ER FTIR spectroscopy: a systematic study of the influence of different pigments on the binders’ characteristic spectral features. *Herit. Sci.* 7, 1-13 (2019).
- (6) Nabais P, Oliveira J, Pina F, Teixeira N, de Freitas V, Brás NF, Clemente A, Rangel M, Silva AMS, Melo MJ, A 1000-year-old mystery solved: Unlocking the molecular structure for the medieval blue from *Chrozophora tinctoria*, also known as folium. *Sci. Adv.* 6, eaaz7772 (2020).

- (7) Albertin F, Bettuzzi M, Brancaccio R, Morigi MP, Casali F, X-Ray Computed Tomography In Situ: An Opportunity for Museums and Restoration Laboratories. *Heritage* 2, 2028–2038 (2019).
- (8) Busse F, Rehorn C, Küppers M, Ruiz N, Stege H, Blümich B, NMR relaxometry of oil paint binders. *Magn. Reson. Chem.* doi.org/10.1002/mrc.5020 (2020).
- (9) Abbott A, Venice Time Machine. *Nature* 546, 341-344 (2017).
- (10) Vinciguerra R, De Chiaro A, Pucci P, Marino G, Birolo L, Proteomic strategies for cultural heritage: From bones to paintings. *Microchem. J.* 126, 341-348 (2016).
- (11) Ren F, Atlasevich N, Baade B, Loike, J., Arslanoglu J, Influence of pigments and protein aging on protein identification in historically representative casein-based paints using enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 203–215 (2016).
- (12) Granzotto C, Sutherland K, Arslanoglu J, Ferguson GA, Discrimination of Acacia gums by MALDI-TOF MS: applications to micro-samples from works of art. *Microchem. J.* 144, 229-241 (2019).
- (13) Giuffrida MG, Mazzoli R, Pessione E, Appl. Back to the past: deciphering cultural heritage secrets by protein identification. *Microbiol. Biotechnol.* 102, 5445–5455 (2018).
- (14) Di Gianvincenzo F, Granzotto C, Cappellini E, Thirteen - Artificially Aged Silk Degradation Mechanism of Historic Degradation Mechanism of Historic, and Textiles: Mass Spectrometry-based Analysis of Ancient Protein Residues, in *The Textile Revolution in Bronze Age Europe: Production, Specialisation, Consumption*, Sabatini S, Bergerbrant S. (Eds.) Cambridge University Press, pp. 304-316 (2019).
- (15) Presslee S, Wilson J, Woolley J, Best J, Russell D, Radini A, Fischer R, Kessler B, Boano R, Collins M, Demarchi B, The identification of archaeological egg-shell using peptide markers. *Star Sci. Technol. Archaeol. Res.* 3, 89–99 (2017).
- (16) McCoy VE, Gabbott SE, Penkman K, Collins MJ, Presslee S, Holt J, Grossman H, Wang B, Solórzano Kraemer MM, Delclòs X, Peñalver E, Ancient amino acids from fossil feathers in amber. *Sci. Reports* 9:6420 (2019).
- (17) Welker F, Ramos-Madrigràl J, Gutenbrunner P, Mackie M, Tiwary S, Rakownikow Jersie-Christensen R, Chiva C, Dickinson MR, Kuhlwillm M, de Manuel M, Gelabert P, Martínón-Torres M, Margvelashvili A, Luis Arsuaga J, Carbonell E, Marques-Bonet T, Penkman K, Sabidó E, Cox J, Olsen JV, Lordkipanidze D, Racimo F, Lalueza-Fox C, Bermúdez de Castro JM, Willerslev E, Cappellini E, The dental proteome of Homo antecessor. *Nature* 580, 235 (2020).
- (18) Chen R, Hu M, Zheng H, Yang H, Zhou L, Zhou Y, Peng Z, Hu Z, Wang B, Proteomics and immunology provide insight into the degradation mechanism of historic and artificially aged silk. *Anal. Chem.* 92, 2435-2442 (2020).
- (19) De Caro L, Giannini C, Lassandro R, Scattarella F, Sibillano T, Matricciani E, Fanti G. X-Ray Dating of Ancient Linen Fabrics. *Heritage* 2, 2763–2783 (2019).
- (20) Paiva de Carvalho H, Oliveira Sequeira S, Pinho D, Trovão J, Fernandes da

- Costa RM, Egas C, Macedo MF, Portugal A. Combining an innovative non-invasive sampling method and highthroughput sequencing to characterize fungal communities on a canvas painting. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 145, 104816 (2019).
- (21) Fu Y, Chen Z, Zhou S, Wei S. Comparative study of the materials and lacquering techniques of the lacquer objects from Warring States Period China. *J. Archaeological Sci.* 114, 105060 (2020).
- (22) Fiddymont S, Goodison NJ, Brenner E, Signorello S, Price K, Collins MJ. Girding the loins? Direct evidence of the use of a medieval parchment birthing girdle from biomolecular analysis. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.21.348698>.
- (23) Su X, Li X, Kang Y. A Bibliometric Analysis of Research on Intangible Cultural Heritage Using CiteSpace. *SAGE Open* April-June 2019: 1–18; doi.org/10.1177/2158244019840.
- (24) Fiddymont S, Holsinger B, Ruzzier C, Devine A, Binois A, Albarella U, Fischer R, Nichols E, Curtis A, Cheese E, Teasdale MD, Checkley-Scott C, Milner SJ, Rudy KM, Johnson EJ, Vnou ek J, Garrison M, McGrory S, Bradley DG, Collins MJ. Animal origin of 13th-century uterine vellum revealed using noninvasive peptide fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci* 112:15066-15071 (2015).
- (25) Welker F, Collins MJ, Thomas JA, Wadsley M, Brace S., Cappellini, E, Turvey ST, Reguero M, Gelfo JN, Kramarz A, Burger J, Thomas-Oates J, Ashford DA, Ashton PD, Rowsell K, Porter DM, Kessler B, Fischer R, Baessmann C, Kaspar S, *et al.* Ancient proteins resolve the evolutionary history of Darwin's South American ungulates. *Nature* 522:81-84 (2015).
- (26) Zilberstein G, Maor U, Baskin E, Righetti PG. Maestro, Marguerite, morphine: The last years in the life of Mikhail Bulgakov. *J Proteomics* 131, 199-204 (2016).
- (27) Zilberstein G, Maor U, Baskin E, D'Amato A, Righetti PG. Unearthing Bulgakov's trace proteome from the Master i Margarita manuscript. *J Proteomics* 152, 102-108 (2017).
- (28) D'Amato A, Zilberstein G, Zilberstein S, Golovan MI, Zhuravleva AA, Righetti PG. Anton Chekhov and Robert Koch cheek to cheek: a proteomic study. *Proteomics* 2018 Mar 9. doi: 10.1002/pmic.201700447.
- (29) D'Amato A, Zilberstein G, Zilberstein S, Compagnoni BL, Righetti PG. Of mice and men: Traces of life in the death registries of the 1630 plague in Milano. *J. Proteomics* 180, 128-137 (2018).
- (30) Zilberstein G, Zilberstein S, Maor U, Baskin E, D'Amato A, Righetti PG. De re metallica. Johannes Kepler and alchemy. *Talanta* 204, 82-88 (2019).
- (31) Zilberstein G, Zilberstein R, Zilberstein S, Fau G, D'Amato A, Righetti PG. Il n'y a pas d'amour heureux pour Casanova: Chemical- and bio-analysis of his Memoirs. *Electrophoresis*. 2019 Apr 8. doi: 10.1002/elps.201800505.
- (32) Barberis E, Manfredi M, Marengo E, Zilberstein G, Zilberstein S, Kossolapov A, Righetti PG. Leonardo's Donna Nuda unveiled. *J Proteomics* Jul 16;207:103450 (2019).
- (33) Zilberstein G, Zilberstein R, Zilberstein S, Maor U, Righetti, PG. A new mining tool for assessing use of Golden Section and pigment decay in Leonardo's paintings. *Molecules*, submitted (2020).

- (34) Zilberstein G, Zilberstein R, Zilberstein S, Righetti, PG. Radial distribution of figures in Leonardo's and renaissance painting. *J. Computing Cultural Heritage*, submitted (2020).
- (35) Zilberstein G, Zilberstein S, Maor U, Righetti PG. Surface analysis of ancient parchments via the EVA film: the Aleppo Codex. *Anal. Biochem.* 604:113824 (2020).
- (36) Zilberstein G, Zilberstein S, Maor U, Cohen-Ofri I, Shor P, Bitler T, Riestra B, Righetti PG. Proteomics and metabolomics composition of a "lamed" letter in one fragment of a Dead Sea Scroll from Cave 11. *Anal. Biochem.* Submitted (2020).
- (37) Saravayskaya Y., Zilberstein G., Zilberstein R., Zilberstein S., Maor U., D'Amato A., Righetti P.G. "1984": What Orwell could not predict. Proteomic analysis of his scripts. *Electrophoresis* 2020;41, DOI 10.1002/elps.202000063.
- (38) Zilberstein G, Zilberstein S, Righetti PG. Stalin's "black dog": a postmortem diagnosis. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 7701–7708 (2020).
- (39) Demarchi B, Boano R, Ceron A, Dal Bello F, Favero-Longo SE, Fiddymont S, Fiore Marochetti E, Mangiapane G, Mattonai M, Pennacini C, Ribechini E, Woolley J, Zilberstein G, Righetti PG. Never boring: Non-invasive palaeo-proteomics of mummified human skin. *J. Archaeological Science* 119, 105145 (2020).
- (40) Calvano CD, Rigante E, Picca RA, Cataldi TRI, Sabbatini L. An easily transferable protocol for in-situ *quasi*-non-invasive analysis of protein binders in works of art. *Talanta* 215, 120882 (2020).
- (41) Manfredi M, Barberis E, Gosetti F, Conte E, Gatti G, Mattu C, Robotti E, Zilberstein G, Koman I, Zilberstein S, Marengo E, Righetti PG. Method for Non-invasive Analysis of Proteins and Small Molecules from Ancient Objects. *Anal Chem.* 89, 3310-3317 (2017).
- (42) Barberis E, Baiocco S, Conte E, Gosetti F, Rava A, Zilberstein G, Righetti PG, Marengo E, Manfredi M. Towards the non-invasive proteomic analysis of cultural heritage objects. *Microchem. J.* 139, 450-460 (2018).

