

MATERIALES Y MÉTODOS

No se puede desatar un nudo sin saber cómo está hecho

Aristóteles

I MATERIALES

Antes de presentar los diferentes experimentos y ensayos realizados a lo largo de esta Tesis, así como los resultados y discusiones, en este capítulo se recopilan y se exponen las muestras, los productos y materiales, la instrumentación y, los métodos y normas de trabajos utilizados en la experimentación de esta memoria.

Todo el estudio ha estado centrado en la búsqueda de un sistema de consolidación de la celulosa a partir de la acción de enzimas tipo celulasa. Para ello, se han empleado diferentes tipos de papeles con y sin técnicas pictóricas, que han sido envejecidos por diferentes procedimientos para luego poder tratarlos y compararlos. De esta manera se ha averiguado si los tratamientos han funcionado.

En este capítulo se describe los diferentes soportes celulósicos así como su tipo de envejecimiento. Se enumeran los materiales de las técnicas pictóricas y los productos usados para cada experimento. Durante la investigación se han empleado diferentes técnicas para conocer el estado del papel. Se puso a punto un sistema enzimático para la evaluación del estado de degradación del papel. Este test ayudó a optimizar el efecto del consolidante.

En el apartado de Métodos, se especifican los detalles de la preparación de cada experimento, de la preparación de los geles empleados para la consolidación del papel, así como de todos los procedimientos y normas de análisis utilizados.

I.1 Papel

El papel ha sido el elemento fundamental de todas las pruebas. A continuación se describirán los diferentes papeles utilizados en las diferentes etapas de la memoria:

- 1- Puesta a punto del método de envejecimiento y de la medida de la degradación con el sistema enzimático glucosa oxidasa y el electrodo de Clark -explicado más adelante-.
- 2- Desarrollo de un nuevo método enzimático (en cámara CCD), para la medición de la degradación del papel.
- 3- Desarrollo de un sistema enzimático de consolidación de la celulosa.

A continuación se detalla el papel usado en cada una de las anteriores etapas:

- Para la primera fase de la investigación, realizada en el laboratorio de química de la Universidad de la Sapienza en Roma, se ha utilizado el papel “extra-strong” DINA A4 con un gramaje de 80 g/m^2 . Estos papeles de uso corriente y sin gran valor económico han servido para realizar diversas pruebas sin un gasto económico excesivo.
- En la segunda fase, realizada en el departamento de “Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS-CNRS 5246)” de la Universidad de Lyon1, se han usado papeles “Claire Fontaine” A4, de 80 g/m^2 y de 110 g/m^2 , el papel “Joseph” de 25 g/m^2 , un papel envejecido de forma natural de gramaje 80 g/m^2 y el papel “Extra-Strong” también de gramaje 80 g/m^2 .
- En la tercera fase, se ha comprado papel hecho a mano en la empresa Paperki de Hondarribia (Guipúzcoa), fabricados con 100% fibras de algodón o con 100% fibras de lino. También se han usado hojas ($56 \text{ cm} \times 76 \text{ cm}$) de un papel artístico marca “Arches” fabricado con fibras 100% algodón, de grano fino y con un gramaje de 300 g/m^2 . Se decidió emplear papeles con diferentes fibras para observar la respuesta de nuestros geles enzimáticos con otro tipo de fibras.

- En la cuarta y última parte, se han comprado dos tipos de papeles artísticos (56 x 76 cm), fabricados industrialmente por Fabriano y Arches con fibras 100% algodón, de grano fino y con un gramaje de 300g/m² que se cortaron posteriormente en fragmentos de 36 x 19 cm. Y, en esta fase también se han empleado papeles de un libro antiguo, que no posee ningún valor artístico, histórico o sentimental. Se han aplicado diferentes técnicas artísticas a los papeles para observar cómo reaccionan los pigmentos y el papel con el tratamiento enzimático.

I.2 Materiales artísticos

A continuación se enumeran los materiales empleados para la realización de los dibujos sobre los diferentes tipos de papeles usados a lo largo de nuestra investigación. Durante el estudio, se utilizaron las siguientes técnicas pictóricas, por ser las más empleadas por los artistas y, de esta manera, se ha comprobado si el sistema de consolidación es efectivo.

No se ha realizado una descripción y un estudio muy exhaustivos de cada técnica porque lo que se ha buscado es conocer si en su composición existían elementos químicos que pudieran inhibir el efecto de las enzimas.

- Acrílicos

Se denomina pintura acrílica a cualquier pintura compuesta por pigmentos contenidos en una resina sintética^[364] o una emulsión de un polímero acrílico como la cola de acetato de polivinilo (PVA)^[365]. Se mezclan en agua pero una vez seca es insoluble en agua. Fue usada por primera vez en el ámbito artístico, por los artistas hispanoamericanos Orozco, Siqueiros y Rivera, en los años 20. Querían pintar murales a la intemperie, pero por problemas de conservación, se vieron obligados a

³⁶⁴ HAYES, C., *Guía completa de pintura y dibujo. Técnicas y Materiales*, Ed. H. Blume, 1980, Madrid, p. 68.

³⁶⁵ SMITH, S., TEN HOLT, H.F., *Manual del Artista. Equipo, materiales, técnicas*, Ed. H. Blume, 1982, Madrid, p. 50.

experimentar con este material que ya existía desde hacía muchos años en la industria.

La marca usada para la realización de las muestras es Louvre Acrylic.

- **Acuarelas**

La acuarela está compuesta por un aglutinante, la goma arábiga (goma vegetal, resina de acacia^[366]) y pigmentos finamente molidos. La goma soluble en agua actúa como un barniz, dotando más brillo a los pigmentos. A las acuarelas se le suele añadir sustancias como la miel o el almíbar de azúcar, para dotarles de plasticidad y mayor fluidez a la pintura y, la glicerina para absorber mejor el agua y añadir brillo^[367].

Hasta el siglo XVIII no aparece el término de la acuarela, aunque la sepia, técnica de la miniatura medieval, se basa en el mismo principio y se cree que la acuarela y el guache desciendan de ésta.

La marca de las acuarelas utilizadas para la realización de las muestras es Van Gogh.

- **Bolígrafos**

La composición de la tinta de los bolígrafos varía según la época y el modelo. Al principio de su invención estaba compuesta por negro humo con barniz o aceite de linaza hervido y actualmente son similares a las tintas de imprenta. Estas tintas contienen vehículos y barnices, pigmentos y aditivos (secantes y ceras)^[368].

La tinta de los bolígrafos que son fáciles de eliminar, está compuesta por colorantes, elastómeros (poli(vinil-metil-éter) y un vehículo (disolventes volátiles)^[369].

El bolígrafo fue inventado por los hermanos Biro en 1938 pero hasta los años 50 no tuvo realmente éxito. Su uso se expandió a todas las clases sociales.

³⁶⁶ MALTESE, C., *Las técnicas artísticas*, Ed. Manuales arte Cátedra, 12ª edición, Madrid, 2003, pp. 317-322.

³⁶⁷ SMITH, S., TEN HOLT, H.F., *Manual del Artista. Equipo, materiales, técnicas*, Ed. H. Blume, Madrid, 1982, p. 68.

³⁶⁸ http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:4s3RHuv4LuMJ:www.masqueideas.com/imprenta_tintas.php+composici%C3%B3n+tinta+imprenta&cd=4&hl=es&ct=clnk&gl=es

³⁶⁹ http://www.espatentes.com/pdf/8307276_A1.pdf

La marca usada para las muestras de papel es Pilot BPS-GP (M) ^[370] y los colores utilizados son el rojo, verde, azul y negro.

Desconocemos la composición exacta de los bolígrafos Pilot, no obstante en la página web de Pilot ^[371], presentan los bolígrafos empleados para nuestra Tesis, con tinta a base de aceite y después de ponernos en contacto con ellos sabemos que en su composición llevan cromo y cobre. La fórmula de las tintas de los bolígrafos está patentada y es un secreto de fábrica.

- **Carboncillo**

El carboncillo se crea carbonizando madera blanda sin resinas (ramas de sauce, vid (las más finas), romero, brezo...), y poseen diferentes diámetros.

El carbón es el material de dibujo más antiguo. Los prehistóricos ya lo empleaban para dibujar figuras de animales en las cavernas.

El carboncillo empleado para nuestros dibujos no tiene marca.

- **Ceras**

La cera es una técnica grasa compuesta por pigmentos minerales, aceite vegetal principalmente de palma y carbonato de calcio ^[372].

Las ceras utilizadas para la preparación de las muestras son las ceras Manley.

- **Grabados**

El grabado es una técnica de impresión. Para su realización es necesaria una matriz con un dibujo grabado mediante incisiones sobre la superficie de ésta. La matriz puede ser de madera, piedra, soporte acrílico, cobre o aluminio. Las incisiones son realizadas por medio de instrumentos punzantes, cortantes o, procesos químicos. La impresión se produce al presionar la matriz con tinta sobre un papel. Las tintas de

³⁷⁰ <http://www.pilot-es.es/listado.asp?fam=3>

³⁷¹ <http://www.pilot-es.es/listado.asp?fam=2>

³⁷² <http://www.manley.es/fabric.swf>

impresión^[373,374] poseen un aglutinante graso con diferentes viscosidades; se obtiene normalmente por la cocción del aceite de linaza y se le añade pigmento y/o negro de carbón. A veces se incluyen aditivos como secativos o espesante para dar un mayor cuerpo a la tinta. Cronológicamente existen las de carbón, sepia, ferrotánicas, anilina y coloreadas.

- **Gouache o guache**

El guache o aguazo es un temple de goma arábiga. Es más cubriente que la acuarela porque se añade una carga con el fin de otorgarle más opacidad. Se utiliza menos diluido que la acuarela.

Su descubrimiento se produjo en la Edad Media (s. XIV), cuando un monje añadió blanco a las acuarelas usadas para iluminar manuscritos, obteniendo una acuarela opaca^[375].

La marca empleada para el guache es Titán al agua.

- **Lápices**

El lápiz (*lapis*, en latín ‘piedra’), está compuesto por barritas de grafito muy finas mezcladas con arcilla que le confiere la dureza y el color a cada lápiz.

El primer lápiz de grafito se creó en Alemania hacia 1662 pero no tuvo éxito hasta el siglo XIX.

El lápiz fue denominado en un principio “lápiz de plomo”, porque en 1504, descubrieron en Inglaterra un yacimiento de plomo con diferentes características.

³⁷³ VERGARA, J., *Conservación y restauración de material*, Ed. Cultural en archivos y bibliotecas, Valencia, 2002, p. 31.

³⁷⁴ VAILLANT CALLOT, M., VALENTIN RODRIGO, N., *Principios básicos de la conservación documental y causas de su deterioro*, Ed. Ministerio de Educación y Cultura IPHE, Madrid, 1996, p. 29.

³⁷⁵ SMITH, S., TEN HOLT, H.F., *Manual del Artista. Equipo, materiales, técnicas*, Ed. H. Blume, Madrid, 1982, p. 86.

Posteriormente se dieron cuenta que era otro tipo de mineral, grafito puro. Sin embargo, hasta 1789 no recibió ningún nombre^[376].

Existen diferentes grados de dureza. En nuestro estudio hemos empleado una amplia gama que va desde el los H (más duros) a los B (más blandos).

La marca de los lapiceros empleada es Faber-Catell.

- **Lápices de colores**

Los lápices de colores están compuestos por una mezcla de colorante, cera y caolín. Algunos lápices están hechos con aparejo, aglutinante, lubricante y pigmento obteniendo una mina blanda cuyos trazos sólo pueden ser eliminados con una cuchilla^[377].

Para la realización de las muestras se han empleado los lápices Faber-Catell Policromos.

- **Óleos**

El óleo está compuesto por aceite de linaza y/o de adormidera y pigmentos.

La invención del óleo fue atribuida durante bastante tiempo al pintor flamenco Han Van Ec, a principios del siglo XV. No obstante, hoy se sabe que su empleo es anterior a este artista. Su uso se extendió en Venecia en el siglo XV, siendo Tiziano quien desarrollase esta nueva técnica. Posteriormente a finales del siglo XVI y principios de XVII, Rubens proporcionó otro avance a esta técnica, al pintar sobre una base blanca.

La marca usada para pintar los papeles es Van Gogh súper fine quality serie 2.

³⁷⁶ SMITH, S., TEN HOLT, H.F., *Manual del Artista. Equipo, materiales , técnicas*, Ed. H. Blume, Madrid, 1982, pp. 106-7.

³⁷⁷ SMITH, S., TEN HOLT, H.F., *Manual del Artista. Equipo, materiales , técnicas*, Ed. H. Blume, Madrid, 1982, pp. 106-7.

- **Pasteles**

El pastel está compuesto por goma de tragacanto muy rebajada y pigmentos. La goma tiene como función mantener el pigmento en barritas con diferentes durezas (según la cantidad de aglutinante que se le haya añadido) y conservar la luminosidad y pureza del pigmento.

Empezaron a utilizarse en el siglo XVIII^[378]. Es la técnica más pura químicamente, pero la menos duradera.

Para las muestras se han utilizado los pasteles STABILO CarbOthello.

- **Tinta china**

La tinta china o de carbón estaba compuesta antiguamente por goma arábiga o pegamento de pescado y carbón proveniente de lámparas o de hollín. Su invención es atribuida al filósofo chino Tien-Lcheu (2697 a.C.) y fue empleada tanto en China como Egipto desde aproximadamente el año 2500 a.C.

En la actualidad el carbón es suspendido en agua por la adición de cola. Es una tinta estable, duradera a través del tiempo pero se desprende al frotar y sus tonos cambian a tostados con los años.

La tinta china usada es de STAEDTLER marsmatic.

I.3 Sustancias

Durante la investigación se han aplicado diferentes sustancias en los diferentes experimentos. A continuación se enumeran todas ellas para tenerlas presentes más adelante cuando se expliquen los métodos empleados en los estudios.

³⁷⁸ SMITH, S., TEN HOLT, H.F., *Manual del Artista. Equipo, materiales , técnicas*, Ed. H. Blume, Madrid, 1982, p. 94.

I.3.1 Enzimas

A lo largo de la tesis se han utilizado 4 enzimas. Dos para las pruebas de detección del envejecimiento del papel, y otras dos para la consolidación del papel.

- Cellulase / Celulasa (*Trichoderma viride*), Ec 3.2.1.4SIGMA
- Cellulase / Celulasa (*Aspergillus Níger*), Ec 3.2.1.4 FLUKA BioChemika

Estas dos celulasas fueron empleadas para la consolidación de la celulosa. Siendo la primera la utilizada para los geles.

- Glucose oxydase / Glucosa oxidasa (*Aspergillus Níger*), Ec 1.1.3.4...SIGMA

La Glucosa oxidasa se usa para la datación de los materiales celulósicos. La combinábamos en Roma con el electrodo de Clark y posteriormente con la cámara CCD en Lyon. No obstante, al final se utilizó la peroxidasa-His para conocer la degradación de la celulosa de nuestros papeles.

- Peroxydase / Peroxidasa Horseradish (raifort), EC 1.11.1.7.....SIGMA

I.3.2 Productos

A continuación se exponen los productos necesarios para la preparación de las múltiples pruebas enzimáticas realizadas a lo largo de la investigación.

- Acétonitrile / Acetonitrilo EC200-835-2..... SIGMA.
- Acétate de sodium / Acetato de sodio 27 652.298PROLABO.
- Acide chlorhydrique / Acido clorhídrico
- Agar-Agar

El Agar es un polisacárido encontrado en los espacios intracelulares y en las paredes celulares de las algas rojas, *Agarophytas*. La estructura química de este polisacárido fue analizada y determinada en 1958. Se encontró que el Agar contiene dos fracciones principales, un polímero neutro, Agarosa, y un polisacárido sulfatado, Agaropectina. Los polisacáridos son hidratos de carbono de alto peso molecular; se pueden considerar como polímeros de condensación de monosacáridos, enlazados mediante uniones glucosídicas, con eliminación de agua. La ecuación empírica de este proceso es la siguiente: $n\text{CH}_{12}\text{O}_6 = (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5) + (n-1) \text{H}_2\text{O}$.

El Agar está compuesto principalmente por D – galactosa, 3–6 anhiro – L – galactosa, sulfatos y ácido pirúvico; a veces 6 – 0 metil – D – galactosa y ácido urónico entran en su composición. La Agarosa está constituida por unidades alternadas de β -D – galactopiranososa unión 1,3 y 3,6 anhiro–_–L galactopiranososa unión 1,4.

La fracción más altamente sulfatada, Agaropectina, es más variable en su composición, pero básicamente tiene la estructura de la Agarosa con grupos ésteres sulfatados en algunas unidades del polisacárido.

Referente al peso molecular del Agar, se estima que es de aproximadamente 3.000 a 160.000, dependiendo esto del tipo de coloide.

- Tipos de agar empleados

Durante toda la investigación se fue variando los tipos de agar para ver si los efectos del gel variaban.

- Bacto Agar 20g.l⁻¹ ref. 214010.....BD.
- Agar (noble agar) Ultra pure gel.. USB CORPORATION.
- Agarosa type D-5.....EUROMEDEX.
- Agarosa I AMRESCO SOLON.

- **Otras sustancias**

- α -D-Glucosa 1-fosfato Disodium SALT Hydrate $C_6H_{11}O_9PNa_2$ SIGMA.
- β - celobiosa fluorada (Shoda et al. 1994) sintetizada por Dr. J. Schulz (Ezus-Lyon 1).
- Carbonato de sodio ($NaHCO_3$).....SIGMA.
- D(+)-Celobiosa actacetato $C_{28}H_{38}O_{19}$; **EC 226-304-5**.....SIGMA Aldrich.
- Dióxido de Titanio TiO_2FLUKA.

El dióxido de titanio empleado en el laboratorio de Roma fue Degusta P25. Este dióxido de titanio nanopartido y altamente disperso está fabricado según el proceso AEROSIL®. Los datos químico-físicos son: La dimensión media de la partículas primarias es 21nm; área superficial específica 50 ± 15 m²/g; pH en una suspensión al 4%: 3,5 - 4,5) ^[379].

El dióxido de titanio es un óxido metálico semiconductor con propiedades fotocatalíticas en presencia de luz ultravioleta ($\lambda \leq 400$ nm) ^[380].

- (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N ethylcarbodiimide hydrochloride) EDC $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$ 50 nM.....SIGMA-Aldrich.
- Phosphate de sodium / Fosfato de sodio.....Prolabo.
- Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione*).....Fluka.
- N-hydroxysuccinimide NHSSIGMA-Aldrich.
- Péroxyde d'oxygène / Peróxido de oxígeno.....SIGMA-Aldrich.
- Proteína Album de Bovine serum.....SIGMA-Aldrich.
- P-iodophenol / p-iodofenol..... SIGMA-Aldrich.
- Dodecilsulphate de sodium / Sodio dodecilsulfato (SDS).....Aldrich.
- Diethylmalonylurea sodium Veronal (VBS) Prolabo.
- Tpool.....Barredo.
- Detergente.....Alcène

³⁷⁹ [http://padis.uniroma1.it/getfile.py?docid=687&name=Cecilia_Costanza_Tesi_Dottorato_Fotosenso_re_di_permanenza_ambientale_\(ecopersistenza\)&format=pdf&version=1](http://padis.uniroma1.it/getfile.py?docid=687&name=Cecilia_Costanza_Tesi_Dottorato_Fotosenso_re_di_permanenza_ambientale_(ecopersistenza)&format=pdf&version=1) P.50 (Roma 2007)

³⁸⁰ http://www.psa.es/webesp/areas/quimica/docs/Tesis_Pilar_Fernandez.pdf P.29 (granada 2003)

I.4 Instrumentación

I.4.1 Cámara climática de envejecimiento

A lo largo de la investigación se ha empleado este tipo de cámaras para envejecer aceleradamente los papeles de nuestra investigación. Se deterioraron para cuantificar su degradación e intentar consolidarlos posteriormente con nuestro sistema enzimático.

Se emplearon diferentes modelos detallados a continuación:

I.4.1.1 Modelo: QUV Weathering Tester - Model QUV/spray Q-Panel LAB-Products

La máquina usada en el laboratorio de química de la Universidad de “La Sapienza” de Roma era un “veterometro”^[381] modelo QUV representado en la siguiente figura [Figura 1]. Este modelo posee ocho barras de rayos UV dispuestos paralelamente en dos filas. Las condiciones de exposición UV fueron: irradiación $0,6 \text{ W/m}^2/\text{NM}$., grado de humedad constante de 58 %, temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ y longitud de onda de 310 nm [figuras 1, 2 y 3].

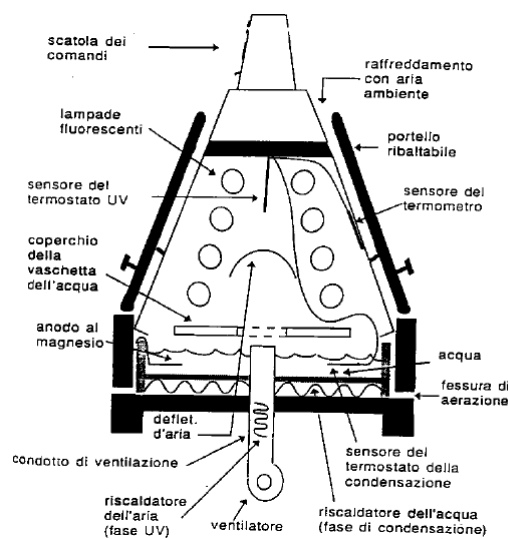


Figura 1. Esquema de la máquina de envejecimiento artificial del papel

³⁸¹ Término italiano para la cámara de envejecimiento acelerado.



Figura 2. Máquina de foto-degradación



Figura 3. Máquina de foto-degradación abierta. Dentro se aprecian los tubos de rayos ultra violeta.

I.4.1.2 Cámara climática CTS modelo: C-20/350/S

La cámara usada en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA, de Madrid era la cámara climática de la marca CTS modelo: C-20/350/S ^[382] [Figura 4].



Tipo	C-20/350
Volumen (litros)	350
Dimensiones	
Altura mm	750
Anchura mm	650
Fondo mm	720
Rango de temperatura (°C)	+10/+90 -20/+180
Rango de humedad relativa (%) entre +10°C y 90°C	10-98

Figura 4. Cámara Climática CTS C-20/350/S

³⁸² Imagen obtenida de la página <http://www.controltecnica.com/c/equipos/index.htm>

I.4.2 Máquinas de Foto-degradación

En el proceso de envejecimiento acelerado de la celulosa del papel, también se han utilizado máquinas de foto degradación.

I.4.2.1 CAMAG IAS Chamagne

Esta cámara consta sólo de una lámpara de UV de 254 nm. Esta máquina se ha utilizado únicamente para la primera etapa del trabajo (en Lyon) y se ha comprobado que no era lo suficientemente potente para degradar adecuadamente el papel.

I.4.2.2 Bio-Link-BLX-E254

Esta máquina se ha empleado en el laboratorio de enzimología de Lyon. Tiene 6 tubos UV de 8 W cada uno y 254 nm de longitud de onda. La humedad de servicio va de 20-80 % sin condensaciones y una temperatura de 5-30 °C. Dimensiones exteriores: altura 30,5 cm/ profundidad 36cm/ancho 35 cm. Dimensiones interiores: 14,5 x 33 x 26.

I.4.2.3 SOL 2 dr. Höle de Metrotec

La cámara de fotodegradación SOL 2 posee una lámpara que puede irradiar un área aproximada de 1400 cm² y no genera ozono [Figura 5]. La intensidad de su lámpara es 6,5 veces superior a la radiación exterior y el área total de uso de esta cámara es de 35 cm x 25 cm. Necesita 230V/50Hz, la potencia de su lámpara es de 400 W. Los datos técnicos ^[383] de la cámara SOL 2 son:

- Dimensiones: 43 x 43 x 34 cm
- Peso: 25 kg

³⁸³ Todos los datos técnicos de la cámara SOL 2 han sido facilitados por la empresa Metrotec, S.A. y www.hoenle.de.

- Luz UVA+VIS +IR (320-3000 nm) y UVB + UVA +VIS + IR (295-3000 nm),
- Nivel de iluminación 120 000 lux
- Intensidad de 950 W/m².



Figura 5. Foto de la Cámara SOL2.

I.4.3 Cámara digital CCD (Charge Coupled Device) de Fujifilm.

Esta cámara se ha empleado para averiguar el estado de deterioro de los papeles. En Roma utilizábamos otro método con la enzima glucosa-oxidasa y el electrodo de Clark y en Lyon, desarrollamos un sistema con otra enzima, la peroxidasa y la cámara CCD. Este método se basa en la interacción entre las cadenas de celulosa y la peroxidasa que poseen la histidina. La presencia de la peroxidasa detectada por imagen de quimiluminiscencia, es la prueba de la degradación del papel.

En el laboratorio de enzimología no teníamos otra manera de cuantificar el estado de degradación del papel, por lo que inventamos esta técnica que nos servía para comparar el efecto de nuestro tratamiento de consolidación en la celulosa de nuestros papeles.

I.4.3.1 Descripción de la cámara CCD

La cámara CCD está compuesta por un detector formado por una matriz de fotorreceptores (1384 922 unidades) [Figura 6]. Cada uno tiene un tamaño de 11 micrómetros por 11 micrómetros. Estos elementos son enfriados a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener un mínimo de ruido de fondo a la hora de la integración de la señal. Durante la medida, los fotorreceptores acumulan electrones proporcionalmente a la cantidad de fotones recibidos. Las señales registradas en forma de imagen son cuantificables gracias a la intensidad de cada píxel. Esta máquina permite detectar el flujo de fotones relativamente débiles de $5 \cdot 10^5 \text{ fotones} \cdot \text{segundo}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Miura et al., 1998).



Figura 6. Conjunto de cámara CCD, caja negra y ordenador.

I.4.3.2 Utilización de la cámara CCD

Para usar esta cámara, las membranas se sitúan sobre una bandeja metálica dentro de la cámara fotográfica CCD, protegida de la luz.

A continuación, se deposita sobre cada una de ellas, una solución específica compuesta por $220\text{ }\mu\text{M}$, H_2O_2 $500\text{ }\mu\text{M}$ et p-iodophenol $200\text{ }\mu\text{M}$. El tiempo de medición para obtener la imagen está definido entre x y x segundos. Cuanto mayor es

la actividad enzimática más oscura sale la imagen en la fotografía CCD, lo que significa que la degradación del papel es importante y por lo tanto la cantidad de enzima fijada es grande.

Luego, para conocer exactamente el estado del papel se realiza la cuantificación numérica de las señales quimiluminiscentes, lo que permite comparar con precisión los diferentes papeles.

I.4.4 Microscopio electrónico Philips XL

A lo largo de la investigación se han efectuado diferentes pruebas para comprobar el estado del papel y la efectividad de nuestro método de consolidación. Con el microscopio electrónico se consigue ver y fotografiar el estado físico de las fibras de celulosa de nuestros papeles. En un primer momento optamos por un microscopio óptico pero al no ser suficiente, buscamos otro sistema como la microscopía electrónica de barrido.

I.4.4.1 Descripción del microscopio

El microscopio electrónico de barrido (también conocido como Scanning o SEM) permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. Fue inventado en 1981 por Ernst Ruska, Gerd Binnig y Heinrich Rohrer, y permite una aproximación profunda al mundo atómico.

La muestra se recubre con una capa de metal delgada de 10-20nm para hacerla conductora y es barrida posteriormente con electrones enviados desde un cañón. Un detector (formado por electroimanes) mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en 3 dimensiones, proyectadas en una imagen de TV. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio.

Las fotografías de microscopía electrónica de barrido de las muestras de esta tesis, se han realizado en el microscopio Philips XL a 20 kV [Figura 7]. Se esperaron más o

menos dos meses para la ejecución de las fotografías; este tiempo dependía de la disponibilidad del microscopio y, de esta manera, nos cerciorábamos de que las muestras estaban totalmente secas.

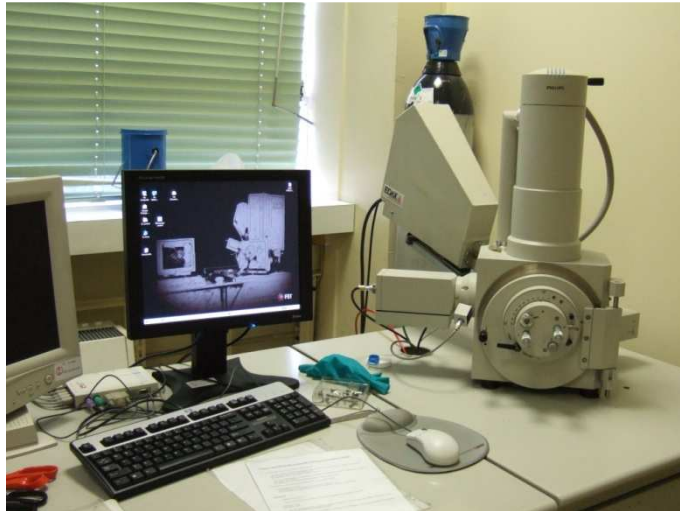


Figura 7. Microscopio electrónico de barrido (MEB/SEM) utilizado para nuestras muestras.

I.4.5 Máquina SCD 040 (Baltec) para la metalización de las probetas

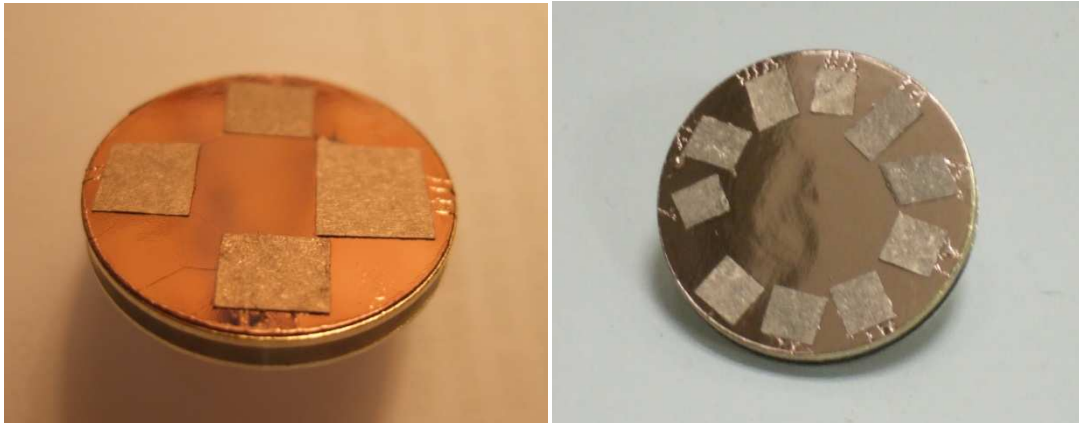
I.4.5.1 Preparación de las muestras

Para obtener imágenes en el microscopio SEM, las muestras introducidas tienen que ser metalizadas para que sean conductoras. Para ello, los fragmentos de los papeles se depositan sobre soporte metálico que tiene una capa adhesiva conductora.

La máquina utilizada es una SCD 040 (Baltec). La metalización con oro se realiza, mediante la aplicación de una corriente de 15 mA (90 s.) en una atmosfera inerte de argón.

La introducción de los papeles metalizados en el microscopio electrónico debe ser lo antes posible ^[384].

³⁸⁴ Se comprobó que era fundamental metalizar las probetas unas horas antes de sacar las fotografías, para obtener unas buenas imágenes. Pasados unos días, se dedujo que el soporte metalizado con los papeles, podía recubrirse con polvo (a pesar de guardarlo en un lugar hermético) y obtener peores imágenes.



Figuras 8 y 9. Dos soportes especiales del microscopio con nuestras de papel recubiertas de oro.



Figura 10. Máquina para metalizar los papeles

I.4.6 Otra instrumentación

I.4.6.1 Equipos para la medición de humedad relativa y temperatura

Antes de realizar los test mecánicos en Madrid, los papeles deben pasar un día como mínimo aclimatándose en el laboratorio donde vayan a practicarse los ensayos. Existen climatizadores para evitar las fluctuaciones de Temperatura y Humedad relativa de la habitación. En el laboratorio de celulosa del INIA de Madrid, empleamos el equipo OPUS 10, Modelo DATA LOGGER THI/USB para medir estos parámetros.

En Lyon, se han realizado varias medidas de la humedad relativa dentro de la cámara Bio-Link-BLX-E254, con un termómetro higrómetro Humlog 10 (marca E+E) para mantener una humedad relativa del 65 % dentro de la cámara.

I.4.6.2 PH meter GLP 21 Crison Leioa

Los papeles tienden a acidificarse con el tiempo y los envejecimientos artificiales. Para medir el pH de nuestros papeles, empleamos el pH meter GLP 21 del laboratorio de la Facultad de Bellas Artes.

I.4.7 Máquina para los test mecánicos D.Y.20, ADAMEL Lhomargy ISA division d'instruments S.A.

Existen diferentes tipos de test mecánicos que permiten medir la resistencia de un papel o cartón. Se han seleccionado los test para determinar las propiedades de tracción con un método con gradiente de alargamiento constante, según la norma española UNE-EN ISO 1924-2 que es la versión oficial de la Norma Europea EN ISO 1924-2 o la Norma Internacional ISO 1924-2:1994.

Esta prueba consiste en cortar los papeles en tiras de 15mm de ancho y más de 180mm de largo. En las zonas de ensayo no debe haber defectos visibles ni irregularidades en el grosor del folio, como marcas al agua. Necesitamos 10 resultados válidos de cada dirección principal del folio. La máquina utilizada para nuestras pruebas es la D.Y.20, ADAMEL Lhomargy ISA division d'instruments S.A.

Antes de poder utilizar esta máquina, deben ser acondicionados los papeles en el lugar de trabajo. En este caso, las tiras de papel se han acondicionado a las condiciones atmosféricas necesarias para realizar los ensayos, durante un día como mínimo. Transcurrido ese tiempo, los papeles se han colocado perpendicularmente entre las mordazas a unos $180 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$. La máquina comienza a estirar la tira hasta que se rompe, obteniendo la fuerza de tracción máxima aplicada hasta la rotura y el alargamiento en la rotura.

I.4.8 Máquinas de FTIR

I.4.8.1 Descripción de la técnica de Espectrometría de absorción IR (FTIR)

La espectrometría se emplea para identificar cualitativamente y cuantitativamente diferentes moléculas orgánicas o aniones inorgánicos de una muestra. Las radiaciones electromagnéticas tienen una naturaleza ondulatoria y otra cuántica, y cada sustancia absorbe unas longitudes de onda determinadas. Por ejemplo, la celulosa se oxida con el tiempo, apareciendo nuevos grupos o hidrolizándose...todas estas reacciones químicas tienen diferentes absorbencias de longitud de onda, por lo que esta prueba puede desvelar nuevas formaciones o transformaciones en la celulosa del papel.

En las pruebas FTIR debe realizarse en primer lugar una curva de calibrado “absorbencia/concentración” establecida de antemano para el material ^[385] que se va a analizar. Y posteriormente las medidas deseadas.

Las longitudes de onda que nos interesan, para conocer la degradación de la celulosa mediante la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier FTIR ^[386, 387, 388, 389 y 390] son principalmente:

- la banda de vibración C-O-C, en la zona de 1050 a 1160 cm^{-1} .
- la banda de vibración de tensión del grupo carbonilo -C=O a 1737 cm^{-1} , que varía según los autores ^[391] entre 1735-1700 cm^{-1} . Algunos estudiosos ^[392] afirman que las

³⁸⁵ MATTEINI M., MOLES A., *Ciencia y Restauración*, Ed. Nerea, Hondarribia, 2001, pp.107-110.

³⁸⁶ CATALAN, R., NEIRA, A., MELO, R. *et al.*, “Copolimerización por injerto de acetato de vinilo en fibra celulósica secundaria”, *Soc. Chil. Quím.*, vol.44, no.4, 1999, pp.505-515. ISSN 0366-1644.

³⁸⁷ CATALAN S., R., NEIRA J., A., RIVAS, B. L. *et al.*, “Polimerización de Injerto de Fibra Celulósica Secundaria con Metacrilato de Metilo y Metacrilato de Etilo”, *Bol. Soc. Chil. Quím.*, set., vol. 45, no.3, 2000, pp.391-402. ISSN 0366-1644.

³⁸⁸ YUTAKA KATAOKA, TETSUO KONDO, “FT-IR Microscopic Analysis of Changing Cellulose Crystalline Structure during Wood Cell Wall Formation”, *Macromolecules*, 31, 1998, pp.760-764.

³⁸⁹ FERRETTI M., *Scientific investigation of Works of art*, Ed. ICCROM, Roma, 1993, pp. 33-37. Hace una descripción del sistema.

³⁹⁰ GÓMEZ M.L., *La Restauración. Examen científico aplicado a la conservación de Obras de Arte* ed. Cátedra, Madrid, 2004, pp.199-205 y p.211

³⁹¹ RODRÍGUEZ LASO M.D. *Degradación mediante envejecimiento acelerado del papel soporte de realizaciones artísticas actuales óleo y acrílico*, Ed. Universidad del País Vasco, Bilbao, 1998, p.306

bandas entre 1730 y 1620 cm^{-1} son características de la celulosa degradada bajo varias condiciones.

- la banda del grupo CH a 2900 cm^{-1}
- la banda correspondiente a los grupos hidroxilos entre 3650 cm^{-1} a 3000 cm^{-1}

I.4.8.2 Nicolet 510 FT-IR Spectrometer

La máquina empleada en Lyon fue la Nicolet 510 FT-IR Spectrometer. Este tipo de espectrómetro con transformada de Fourier utiliza una fuente continua de radiación de infrarrojos. Cuando la luz incide sobre un metal en este caso “Germanium”, una parte se refleja hacia un espejo estacionario y otra parte se transmite en dirección a un espejo móvil. Los rayos reflejados por los espejos vuelven a chocar con el metal, donde la mitad de cada rayo es reflejado y la otra mitad transmitido. Un rayo recombinado se propaga en dirección del detector y el otro vuelve en dirección de la fuente ^[393].



Figuras 11 y 12. Diferentes modelos de espectroscopio de infrarrojos con transformada de Fourier.

³⁹² LOJEWSKA J., MISKOWIEC P., LOJEWSKI T., PRONIEWICZ L. M., “Cellulose oxidative and hydrolytic degradation”, *FTIR approach*, vol. 88, n°3, 2005, pp. 512-520.

³⁹³ Información obtenida de www.mazinger.sisib.uchile.cl

I.4.8.3 FTIR-460 Plus

En el INIA de Madrid se empleó una máquina Jasco FTIR-460 Plus Seral No A054460846 resolución 1 cm^{-1} , con un cabezal especial que mide en un solo punto del papel, y se obtuvieron mejores resultados.

I.4.9 Espectrofotómetro de reflectancia

I.4.9.1 Generalidades

El espectrofotómetro empleado para las muestras es el modelo 070 de Elrepho de Lorentzen & Wettre. Este instrumento se utiliza para medir el color, el brillo y la opacidad de las muestras de papel.

Este espectrofotómetro consta de

1. Una sección conteniendo la óptica y el fotómetro
2. Un PC con un software específico L&W Colour Brightness, para realizar las pruebas necesarias.
3. Herramientas para su calibración y control

“Este espectrómetro es del tipo de rayo doble y proporciona información sobre la reflectancia en el espectro visible de 400-700 nm, a intervalos de 5 o 10 nm.

La muestra se ilumina difusamente y la reflectancia resultante se mide a un ángulo de 0° . La fuente luminosa, una lámpara de xenón filtrada a “casi D65”, tiene un espectro de energía que abarca tanto los rayos ultravioleta como las longitudes de onda visibles”^[394].

Elrepho cumple con la normativa en ISO 2469 como espectrofotómetro compacto.

³⁹⁴ VVAA., *Elrepho instrucciones de manejo* copyright © Ed., Lorentzen & Wettre, Sweden, 2004.

I.4.9.2 Manejo

En primer lugar se abre el software específico y se calibra con respecto a unos patrones no reflectantes: una cavidad negra, un patrón de referencia blanco y un estándar de referencia de rayos ultravioleta. A continuación se pone la muestra a través de una apertura específica sobre el soporte con muelles y por último se mide. Para la medida en el espectrofotómetro se realizan 10 medidas. Para nuestras muestras hemos medido el grado de blancura ISO que puede ser expresada en % a la hora de realizar los gráficos.

I.4.9.3 Propiedades ópticas del papel

Es de suma importancia conocer las propiedades ópticas del papel para poder interpretar más adelante los espectros obtenidos en las mediciones de los papeles. Estas propiedades están relacionadas con el aspecto visual del papel, así como su influencia en el impacto perceptivo de las personas y la calidad física del producto final.

Estas propiedades han sido estandarizadas por la “Comission Internationale d’Eclairage” (CIE) y definen una serie de variables:

- Propiedades cuantificables:

Sirven para definir la variable cuantificable cuando se ilumina una muestra de papel con una determinada radiación lumínica. Esta radiación puede sufrir diferentes efectos:

1. La reflexión especular, radiación reflejada por el papel con el mismo ángulo que el incidente.
2. Transmisión, radiación transmitida por el papel.
3. La reflectancia, radiación reflejada por el papel.
4. Absorción, radiación absorbida por el papel.

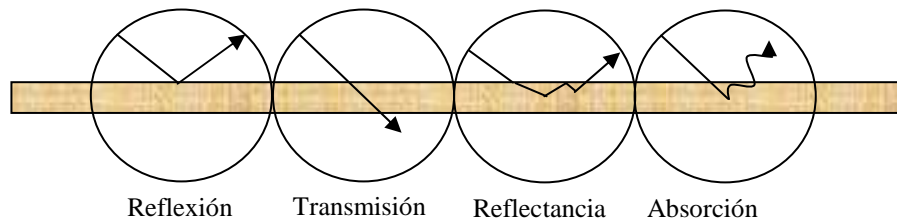


Figura 13. Efectos de la luz sobre una superficie de papel

El sistema cuantificable establece los factores de reflectancia mediante la siguiente relación:

$$R_{\lambda} = R_r / R_i \times 100$$

Donde R_{λ} es el factor de reflectancia para una determinada longitud de onda.

R_i es la radiación incidente.

R_r es la radiación reflejada.

- Condiciones de medida

Las condiciones de medida están condicionadas por factores externos como la luz. Para el papel están estandarizados el uso del “iluminante C” y el “iluminante D65” que simulan la luz diurna.

El D65 contiene mayor porción de radiación ultravioleta que el C.

El iluminante C determina la blancura ISO y ha sido empleado para las muestras realizadas.

- Espectro de media

Los factores de reflectancia se determinan en el espectro visible, zona donde el ojo humano percibe los colores y tienen una longitud de onda que va desde los 400nm a los 700nm.



Figura 14. Espectro visible

I.4.9.4 Blancura ISO

El grado de blancura ISO es una medida de la capacidad del papel de reflejar la luz difusa dentro de la zona azul del espectro visible, está relacionada con lo que el ojo humano aprecia como blanco. Se define como un factor de reflectancia difusa a una longitud de onda de 457 nm con el iluminante C.

II MÉTODOS

PARTE PRÁCTICA

La parte experimental de nuestra tesis está dividida en cuatro partes.

La primera fase que vamos a describir a continuación, fue realizada en Roma, en el laboratorio de Química de la Universidad de “La Sapienza”, bajo la dirección del Profesor Luigi Campanella, fue un acercamiento al uso de enzimas en la restauración y conservación de obras de arte. Este estudio derivó en la estimulación de algas para que produjesen enzimas y/o algún producto de defensa que en contacto con fibras degradadas consiguiesen reparar el papel.

Esta parte no hubiera sido posible sin la obtención de la Beca de la Real Academia de España en Roma.

En todas las etapas de la tesis, hemos envejecido en primer lugar los papeles empleados, hemos medido su degradación, hemos tratado de consolidarlos y por último hemos comparado su estado con el que poseían antes del tratamiento.

II.1 Preparación de las probetas

II.1.1 Envejecimiento acelerado del papel en Roma

Este primer paso de envejecimiento acelerado del papel era fundamental para un correcto estudio de nuestro tratamiento. Para ello, en primer lugar escogimos un tipo de papel corriente como es el papel “extra strong” y en segundo lugar lo envejecimos de tres maneras diferentes:

- Artificialmente en una máquina de foto-degradar irradiada 0,6 W/m²/nm, humedad relativa 58 %, T=45 °C, $\lambda = 310$ nm durante 6 horas;
- Con un catalizador (TiO₂) durante 6 horas en presencia de luz UV a 350 nm (Polilight®)
- Con ácido clorhídrico HCl 0.1 mol/L durante 30 minutos.

Escogimos este tipo de papel de fotocopiar, por ser empleado de forma habitual tanto en un ámbito domestico como laboral y, por no tener un coste económico elevado.

II.1.1.1 Máquina de foto-degradación^[395]

El primer método consistía en introducir en la máquina QUV Weathring Tester-Model QUV/spray Q-Panel LAB- Products de foto-degradación (fig.11 y 12) unos folios de tamaño A4 durante seis horas^[396].

Para esta investigación tuvimos que pensar en un sistema que mantuviera las hojas en vertical dentro de la máquina [figura 13]. De esta manera conseguíamos que el envejecimiento fuera homogéneo sobre toda la superficie de los folios durante la exposición de rayos UVA.

Una vez envejecidos los papeles, envolvimos los papeles tratados con papel aluminio para protegerlos de la humedad y la luz solar, y conseguir que los valores de envejecimiento conseguidos no variasen a través del tiempo.

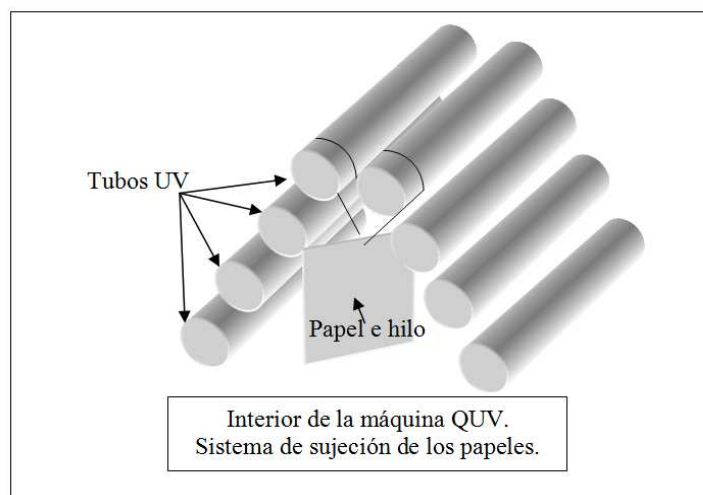


Figura 15. Esquema del sistema para la degradación homogénea del papel

³⁹⁵ Este método de envejecimiento fue utilizado por CAMPANELLA, BATTILOTTI, COSTANZA en "Studies on simulated ageing of paper by photochemical degradation", *Annali di Chimica* 95, 2005, pp.727-740.

³⁹⁶ Solo se mantuvieron durante estas horas porque estudios previos realizados en ese laboratorio demostraban que a partir de 6 horas el papel empieza a degradarse.

II.1.1.2 Envejecimiento acelerado con un catalizador del envejecimiento (TiO₂).

Entre los sistemas de envejecimiento se aplicó un segundo método que consistía en acelerar la degradación del papel metiéndolo en una solución con bióxido de titanio (TiO₂)^[397]. Este catalizador aumenta la degradación del papel, consiguiendo un mayor deterioro en mucho menos tiempo.

Para esta prueba cortamos cuatro discos de papel “extra strong” (+/- 185 mg cada uno) y los sumergimos en una solución compuesta por 100ml de agua destilada (H₂O) y 50mg de bióxido de titanio (TiO₂).

Estos discos, en la solución con el catalizador, fueron irradiados con luz ultravioleta por medio de una máquina “Polilight” (luz UV a 350 nm) pudiendo observar la evolución de la degradación del papel mediante un potenciómetro^[398].

Por último dejamos secar el papel al aire libre antes de consolidarlo con algas. La medida de degradación de la celulosa nos ayudará a comparar el estado del papel antes y después del tratamiento, y saber si nuestro sistema funciona.



Figura 16. Solución de TiO₂ con papel, bajo agitación.

II.1.1.3 Envejecimiento acelerado con HCl

El tercer método utilizado, consistía en bañar un folio en una solución de ácido clorhídrico (HCl) para degradar el papel muy rápidamente. Este sistema era un sistema usado en el laboratorio de química de Roma.

Para ello fue necesario introducir un folio A4 de papel extra-strong en una solución de ácido clorhídrico 0,1M durante media hora (tiempo suficiente para poder ver a simple vista la degradación del papel).

³⁹⁷ Bióxido de titanio Degussa P25, nanodivido altamente disperso, fabricado de acuerdo al proceso “Aerosil”.

³⁹⁸ El potenciómetro utilizado es un Orion modelo 420A pH Meter y determina el potencial del bióxido de titanio irradiado con luz ultravioleta con la Polilight (fuente luminosa de alta intensidad).

Posteriormente fue necesario secar las hojas al aire libre antes de guardarlas o utilizarlas.

La degradación de los papeles fue medida antes y después de la consolidación, con el sistema enzimático de la glucosa oxidasa y el electrodo de Clark (explicado más adelante).

II.1.2 Envejecimiento acelerado en la Universidad de Lyon

En esta primera fase de trabajo en Lyon, se escogió unos papeles blancos de uso corriente y económico, para ir experimentado. Los papeles seleccionados son los siguientes:

- Papel Claire Fontaine de 80 g/m² y de 110 g/m²
- Papel Joseph (utilizado para limpiar los materiales del laboratorio)
- Papel expuesto a la luz solar y a otros contaminantes presentes en el aire del

laboratorio durante años.

Éstos fueron expuestos durante 12 horas a rayos ultra violetas (UVA) de la máquina CAMAG IAS Chamagne, y el papel de 80 g/m² de Claire Fontaine fue introducido en una solución de dióxido de titanio (TiO₂)^[399].

II.1.3 Envejecimiento artificial en el País Vasco

II.1.3.1 Preparación de las probetas

En primer lugar, los papeles seleccionados (fabricados a mano con fibras de algodón y lino y, el papel de Arches 100 % algodón), fueron cortados con unas dimensiones específicas (36x19 cm)^[400]. Después, se pintaron los papeles con diferentes técnicas

³⁹⁹ La preparación es la misma que la realizada en el laboratorio de la Sapienza de Roma.

⁴⁰⁰ Estas dimensiones eran las adecuadas para que los papeles entrasen en las máquinas de fotodegradación y las mínimas para poder medir su resistencia en las pruebas mecánicas efectuadas en Madrid; ya que se necesita como mínimo 18 cm de largo para sujetar las tiras de papel en las mordazas de la máquina de resistencia y alargamiento mecánico.

pictóricas que mostramos a continuación ^[401]. Y por último envejecimos las muestras para luego poder tratarlas con el gel enzimático y ver los resultados.

- **Técnicas secas aplicadas a los papeles**

- **Lápiz**

Los dibujos realizados para las pruebas, fueron realizados con los lápices Faber-Catell y son los siguientes:

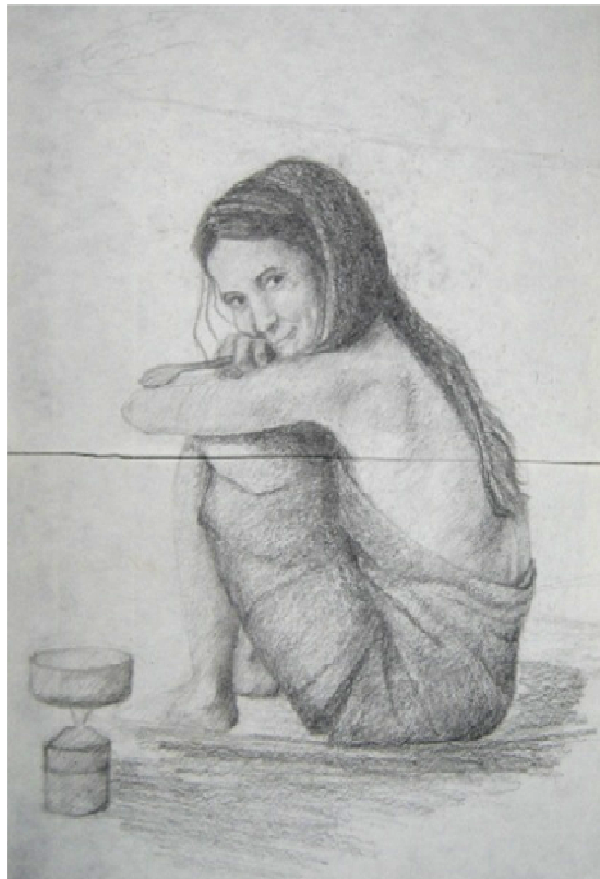


Figura 17. Técnica: lápiz. Realizado por Alicia de Lera.
Papel fabricado a mano con fibras de lino.

⁴⁰¹ Vamos a realizar una explicación muy breve de cada técnica, porque lo único que nos interesa de cada material es su composición para saber si pueden inhibir la actividad enzimática.



Figura 18. Técnica: lápiz. Realizado por Alicia de Lera. Papel realizado a mano con papel de fibras de algodón.



Figura 19. Técnica lápiz. Realizado por Leticia Gaspar. El papel es de Arches, 100% algodón.

- **Carboncillos**

Los dibujos realizados en carboncillo (barras de carboncillo sin marca comercial) para la investigación son los siguientes:



Figura 20. Técnica carboncillo. Papel realizado a mano con fibras de lino 100%.
Dibujo hecho por Alicia de Lera.

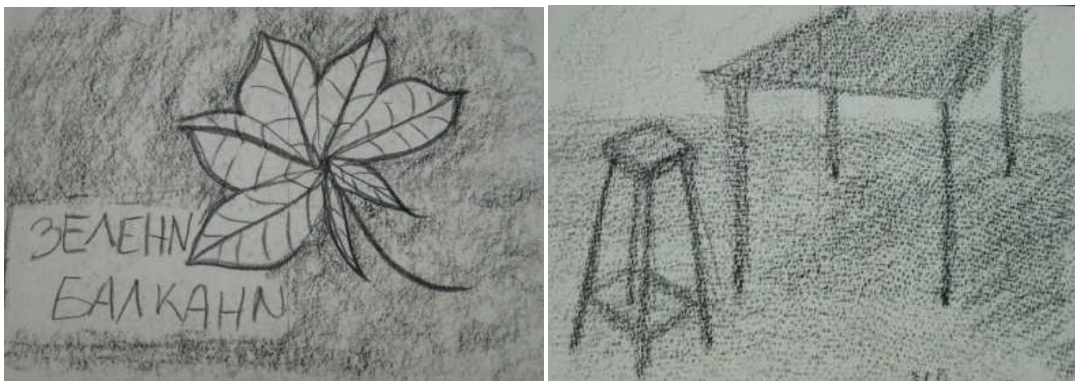


Figura 21 (izquierda). Técnica carboncillo. Papel realizado a mano con fibras de algodón.
Dibujo realizado por Alicia de Lera.

Figura 22 (derecha). Técnica carboncillo. El papel es de Arches, 100% algodón.
Dibujo hecho por Alicia de Lera.

- **Pastel**

Los pasteles empleados sobre nuestros papeles son de la marca STABILO CarbOthello.



Figura 23. Técnica: pastel. Papel realizado a mano con fibras de lino 100%.
Dibujo realizado por Alicia de Lera.



Figura 24. Técnica: Pastel. Papel realizado a mano con fibras de algodón.
Dibujo ejecutado por Alicia de Lera.

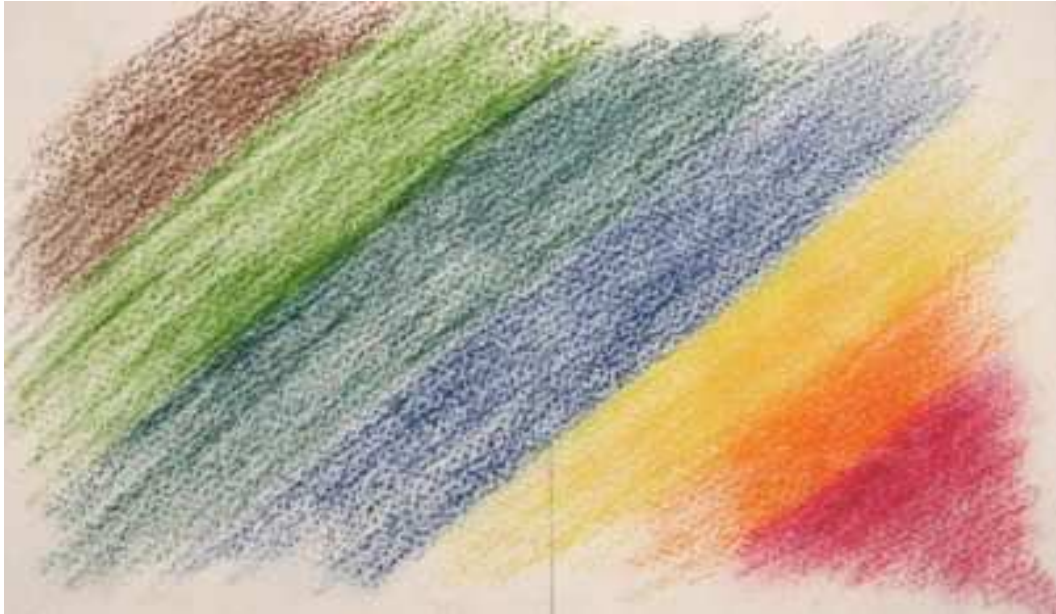


Figura 25. Técnica Pastel. El papel es de Arches, 100% algodón.
Dibujo realizado por Alicia de Lera.

- **Grabados**

Los grabados siguientes fueron realizados con plancha metálica y tintas de grabado por María Teresa Escohotado Ibor.



Figura 26. Papel hecho a mano 100% lino- aguafuerte realizado por Teresa Escohotado.



Figura 27. Papel hecho a mano 100% algodón (gofrado de Teresa Escotado).

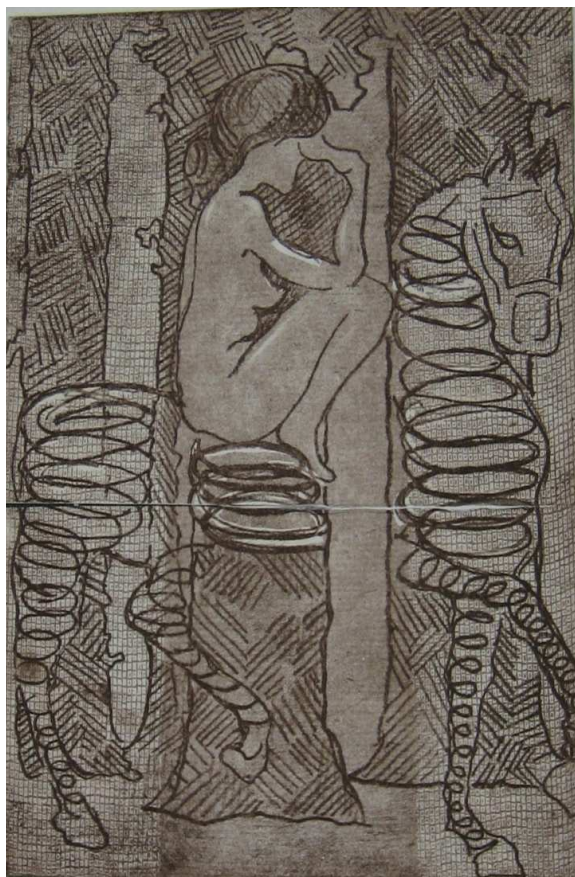


Figura 28. Papel hecho a mano 100% lino- resina blanda realizada por Teresa Escotado.



Figura 29. Tintas de Teresa Escotado. El papel está hecho a mano 100% algodón.

○ **Técnicas acuosas o temple de goma**

- **Acuarela**

Las acuarelas empleadas son Van Gogh.



Figura 30. Acuarela de Alicia de Lera. El papel hecho a mano 100% lino.



Figura 31. Acuarela de Alicia de Lera. El papel hecho a mano 100% algodón



Figura 32. Acuarela de Alicia de Lera. Papel Arches 100% algodón.

- **Gouache**

Guache utilizado: Titan al agua.



Figura 33. Gouache de Alicia de Lera. El papel Arches 100% algodón.



Figura 34. Guache de Alicia de Lera. El papel hecho a mano 100% algodón

○ **Procedimientos Sintéticos**

Marca: Louvre Acrylic



Figura 35. Acrílico de Alicia de Lera. El papel está hecho a mano con 100% fibras de lino.



Figura 36. Acrílico. El papel está hecho a mano con 100% fibras de algodón. El dibujo fue realizado por Teresa Escotado Ibor.



Figura 37. Acrílico. Papel Arches 100% algodón. El dibujo fue realizado por una niña de 5 años.

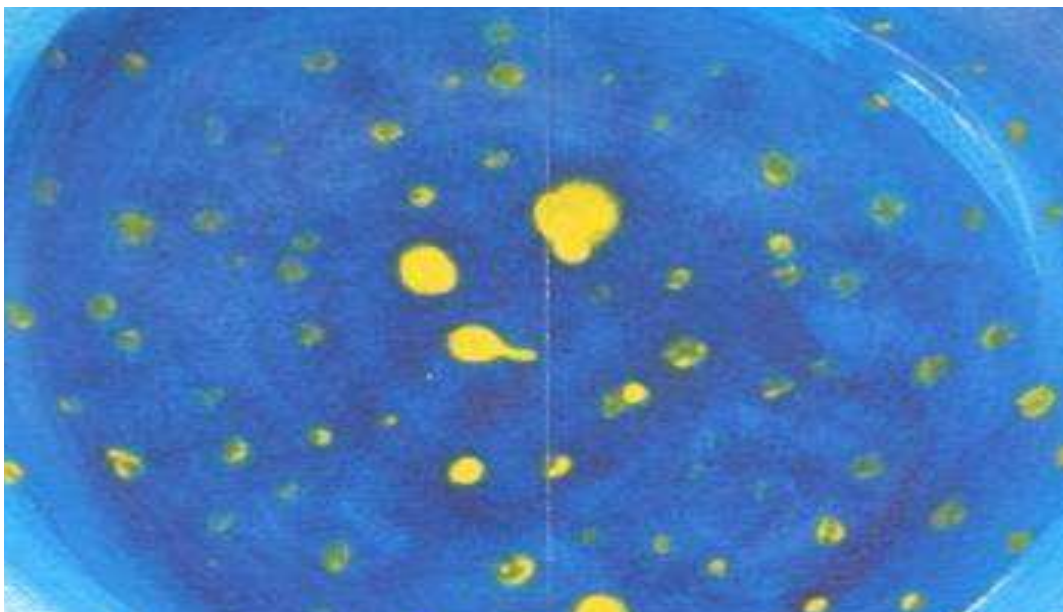


Figura 38. Acrílico de Alicia de Lera. Papel Arches 100% algodón

○ **Procedimientos grasos**

- **Óleo**

La marca de los óleos empleados son Van Gogh serie 2.



Figura 39. Óleo realizado por Alicia de Lera.
Papel Arches 100% algodón.



Figura 40. Óleo realizado por Alicia de Lera.
Papel Arches 100% algodón.

- **Cera**

Los dibujos siguientes, han sido realizados mediante las ceras Manley.

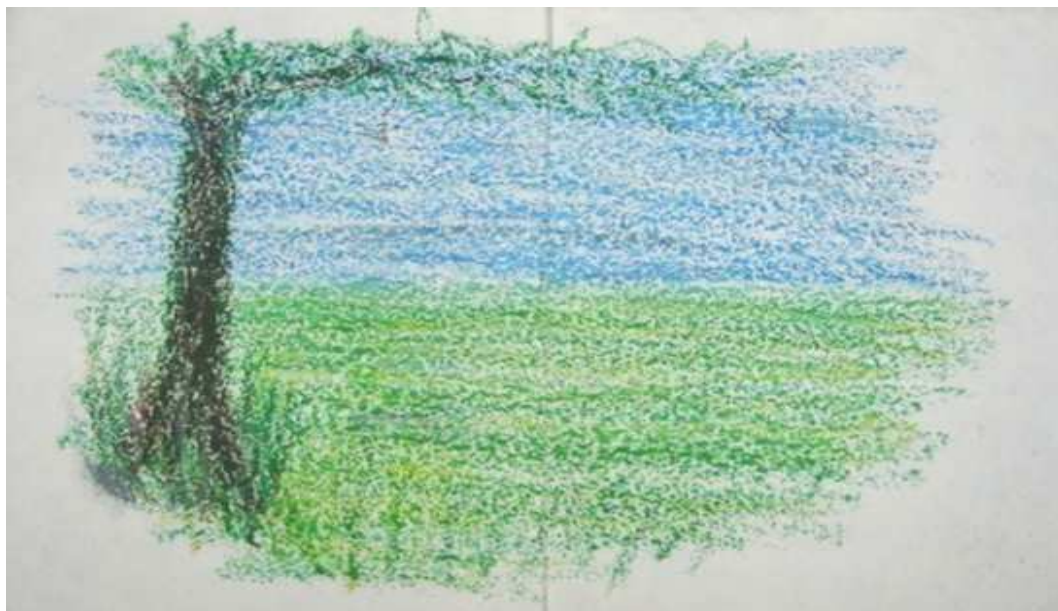


Figura 41. Dibujo de cera ejecutado por Alicia de Lera.
Papel fabricado a mano con fibras de lino 100%.



Figura 42. Dibujo de cera realizado por Alicia de Lera.
Papel fabricado a mano con fibras de algodón 100%.



Figura 43. Dibujo de cera hecho por Alicia de Lera.
Papel Arches de algodón 100%.

II.1.3.2 Envejecimiento artificial de los papeles

El envejecimiento artificial de las probetas en España fue realizada en el laboratorio de restauración de la Facultad de Bellas Artes de la Universidad del País Vasco.

Según diversas investigaciones, existen varias formas para conseguir el envejecimiento acelerado de un material. El principio básico de degradación es conseguir variaciones a frecuencias aceleradas y a valores límite de parámetros como temperatura, humedad, lluvia, radiaciones UVA, contaminantes, etc., que pueden ser conseguidas en cámaras adecuadas para este efecto.

MATTEINI, M. y MOLES, A. ^[402] y/o STRLIC, M. y KOLAR,J ^[403] concluyen proponiendo el principio básico o sistemas básicos para la degradación de materiales, expuesto a continuación:

- Foto-degradación (fotólisis)
- Termo degradación (termólisis)
- Foto-oxidación y termo-oxidación (con oxígeno)
- Radiólisis
- Degradación mecano-química

Existen muchos modos de degradar el papel. En Roma se tenían tres sistemas - descritos con anterioridad-. Algunos estudiosos⁴⁰⁴ afirman que la degradación del papel es mayor bajo el efecto del ozono, peróxidos, ácidos y álcalis, halógenos, componentes agresivos, el efecto de un campo eléctrico, ultrasonidos, irradiaciones de láser, alta temperatura, etc., que viene a ser lo mismo que el principio básico expuesto unas líneas antes.

Los papeles envejecidos en la cámara SOL 2 dr. Höle de Metrotec, de la Facultad de Bellas Artes de Leioa, se sometieron a radiaciones de rayos UVA, exactamente como en Lyon, para tener unas probetas lo más similares posible.

II.1.4 Segundo envejecimiento artificial en el País Vasco

II.1.4.1 Preparación de los papeles

En la siguiente fase de la investigación, se volvieron a pintar los papeles con diferentes técnicas.

⁴⁰² MATTEINI, M., MOLES, A. *Ciencia y restauración Método de investigación*, Ed. Nerea, IAPH, Hondarribia, 2001.

⁴⁰³ STRLIC, M., KOLAR,J. *Aging and stabilisation of paper*, Ed. National and University Library, Slovenia, 2005, p.10

⁴⁰⁴ Ver bibliografía de Envejecimiento acelerado. Matteini, M y Moles A., citan a muchos investigadores que nos han servido como referencia para nuestra investigación.

- **Lápiz**

Los dibujos realizados con lapiceros Faber-Catell en esta fase la investigación, son los siguientes:



Figura 44. Lápiz. Dibujo realizado por Alicia de Lera.
Papel Fabriano 100% algodón.



Figura 45. Lápiz. Dibujo efectuado por Alicia de Lera.
Papel Fabriano 100% algodón.

- **Lápices de colores**

Los papeles pintados con lápices de colores Faber-Catell Policromos son:



Figura 46 (izquierda). Lápices de colores. Papel Fabriano 100% algodón.
Figura 47(derecha). Lápices de colores. Papel Fabriano 100% algodón.
Dibujo realizados por Alicia de Lera.

- **Carboncillo**

En carboncillo se realizaron dos dibujos con carboncillo natural sin marca comercial.



Figura 48(izquierda). Muñeco carboncillo. Papel Fabriano 100% algodón.
Figura 49(derecha). Edificios carboncillo. Papel Fabriano 100% algodón.
Dibujo efectuados por Alicia de Lera

- **Pastel**

Los dos dibujos efectuados para las pruebas, fueron realizados con los pasteles de la marca STABILO CarbOthello y son los siguientes:



Figura 50 (izquierda). Colores Pastel. Papel Fabriano 100% algodón.
Figura 51 (derecha). Rostro Pastel. Papel Fabriano 100% algodón.
Papeles pintados por Alicia de Lera

- **Acuarela**

Las acuarelas usadas para la realización de los dibujos son Van Gogh.



Figura 52 (izquierda). Mariquita Acuarela. Papel Fabriano 100% algodón.

Figura 53 (derecha). Colores Acuarela. Papel Fabriano 100% algodón.

Papeles pintados por Alicia de Lera.

- **Guache o Témpera**

Los dos papeles pintados con las témperas Titan al agua, son los siguientes:



Figura 54. Mujer Guache. Dibujo realizado por Alicia de Lera.
Papel Fabriano 100% algodón.

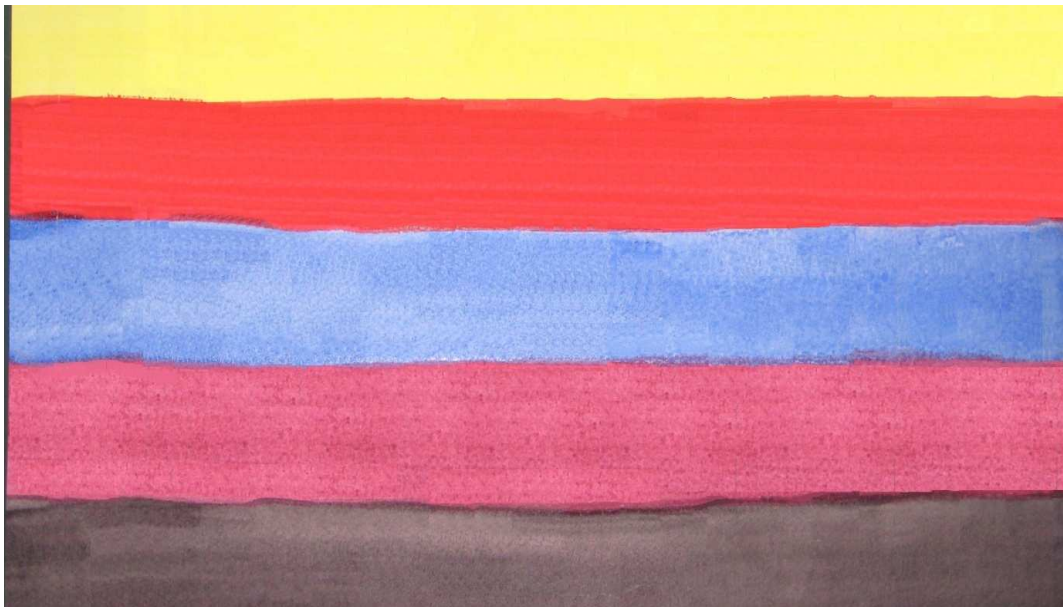


Figura 55. Colores Guache. Papel pintado por Alicia de Lera.
Papel Fabriano 100% algodón.

- **Cera**

Se emplearon las ceras Manley para realizar los siguientes dibujos:



Figura 56 (izquierda). Flores Cera. Papel Fabriano 100% algodón.
Figura 57 (derecha). Colores Cera. Papel Fabriano 100% algodón.
Papeles dibujados por Alicia de Lera.

- **Tinta china**

La marca de tinta china empleada para los siguientes papeles es STAEDTLER marsmatic:



Figura 58. Mujer Tinta china. Papel Fabriano 100% algodón.
Dibujo realizado por Alicia de Lera.



Figura 59. Tinta china. Papel FABriano 100% algodón.
Dibujo efectuado por Alicia de Lera.

- **Bolígrafo**

La marca de bolígrafo utilizada para realizar los dibujos es PILOT BPS-GP (M):



Figura 60(izquierda). Molino Bolígrafo. Papel Fabriano 100% algodón.
Figura 61(derecha). Mujer Bolígrafo. Papel Fabriano 100% algodón.
Papeles dibujados por Alicia de Lera.

- **Acrílico**

Se realizaron las siguientes probetas con los acrílicos Louvre Acrylic.



Figura 62. Colores Acrílicos. Papel Fabriano 100% algodón. Papel pintado por Alicia de Lera.



Figura 63. Atardecer acrílico. Papel Fabriano 100% algodón. Dibujo pintado por Alicia de Lera.

- **Grabado**

El Grabado siguiente fue realizado con planchas metálicas y tinta de grabado para nuestras pruebas:



Figura 64. Grabado realizado por María Teresa Escohotado. Papel Fabriano 100% algodón.

- **Tintas de Grabado**

Para la siguiente probeta, se aplicaron con un pincel las tintas de grabado sobre el papel de Fabriano.

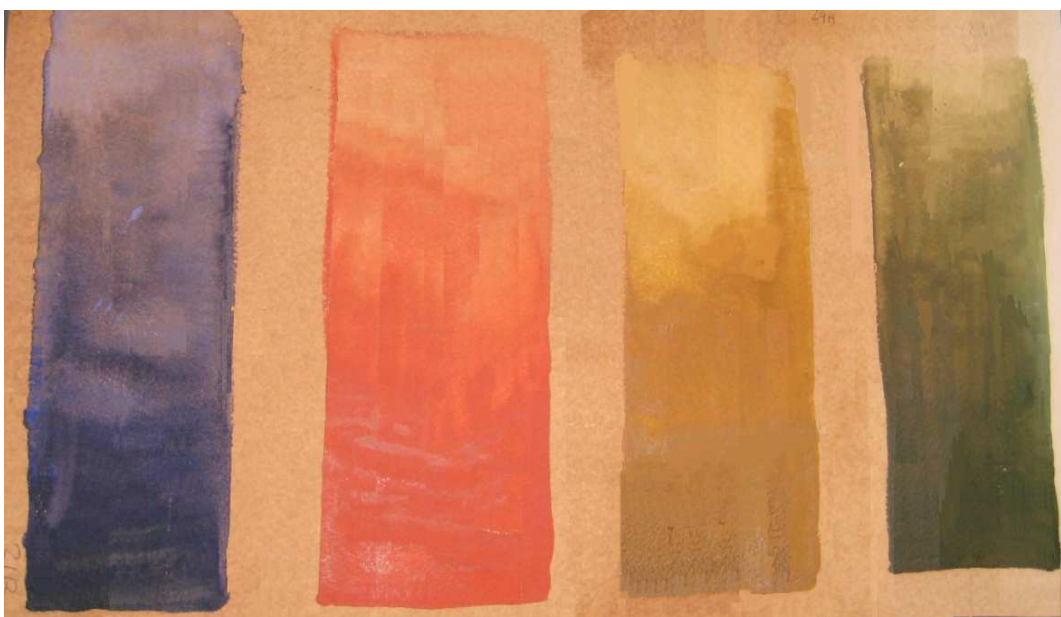


Figura 65. Tinta de grabado. Papel Fabriano 100% algodón.

II.1.4.2 Envejecimiento acelerado de los papeles en Leioa

En Lyon, se envejeció el papel en la cámara de radiaciones UVA –Bio-Link-BLX-E254-, obteniendo una clara degradación de nuestros papeles según las pruebas realizadas con posterioridad.

En Leioa, sin embargo, se optó por seguir envejeciendo nuestras probetas con rayos UVA en la cámara de rayos ultravioletas del departamento de pintura, pero los resultados de las pruebas posteriores demostraron que el envejecimiento acelerado no era eficaz. Por este motivo se decidió aumentar el número de horas de radiación ultravioleta. Se pensó que los papeles al ser más gruesos y estar constituidos por fibras de lino o algodón necesitaban mayor número de horas de rayos UVA y, se decidió envejecerlos con otro método de envejecimiento según la norma UNE 57092-1:2002 ^[405,406] sobre envejecimiento acelerado de papel que describimos a continuación:

- **Envejecimiento acelerado**

En primer lugar, se empleó la norma UNE 57092-1:2002 equivalente a la Norma Internacional ISO 5630-1:1991. Este sistema, realizado mediante un tratamiento con calor seco a 105 °C, consiste en calentar en la oscuridad, durante un tiempo determinado los papeles, dentro de un horno dotado de ventilación a 105 °C ± 2 °C. Los papeles permanecen como mínimo a 100mm de las paredes y no deben tocarse entre sí. El tiempo debe ser de 24 ± 1 h, 48 ± 1 h o 72 h ± 1 h.

Se carecían de los aparatos estándar adecuados para realizar las pruebas, por lo que se pensó en emplear diferentes hornos siguiendo las normas UNE. Posteriormente se

⁴⁰⁵ http://209.85.229.132/search?q=cache:ZcmrxGJZgfYJ:www.boe.es/aeboe/consultas/bases_datos/doc.php%3Fcoleccion%3Dindilex%26id%3D2002/22411%26xtlen%3D1017+Norma+UNE+57092-4+Papel+y+cart%C3%B3n+envejecimiento+acelerado&hl=es&ct=clnk&cd=1

⁴⁰⁶ <http://www.boe.es/boe/dias/2002/11/18/pdfs/A40585-40590.pdf>

realizó los test mecánicos para verificar que los efectos de degradación en el papel eran adecuados.

II.1.5 Tercer envejecimiento acelerado en el País Vasco.

II.1.5.1 Preparación de los papeles

Para esta parte de la investigación, se prepararon las probetas, pintando de manera simple, los papeles de Fabriano 100% algodón. Se aplicaron en cada papel dos o tres colores. Se utilizaron la técnica de acuarela (magenta, azul y amarillo), témpera (azul, magenta, negra y amarilla), por ser quizá las que más problemas dan en tratamientos acuosos y, pintura acrílica (azul, magenta, negra y amarilla) por ser una técnica muy utilizada. Posteriormente los papeles pintados y sin pintar fueron envejecidos artificialmente. Se usó también para las pruebas, un libro de más de 50 años de antigüedad sin valor artístico, histórico ni sentimental.

Los siguientes papeles que se observan, son un ejemplo de cada técnica, de todas las muestras realizadas.

- Acuarela

La acuarela necesaria para la realización de las pruebas es de la marca Van Gogh.

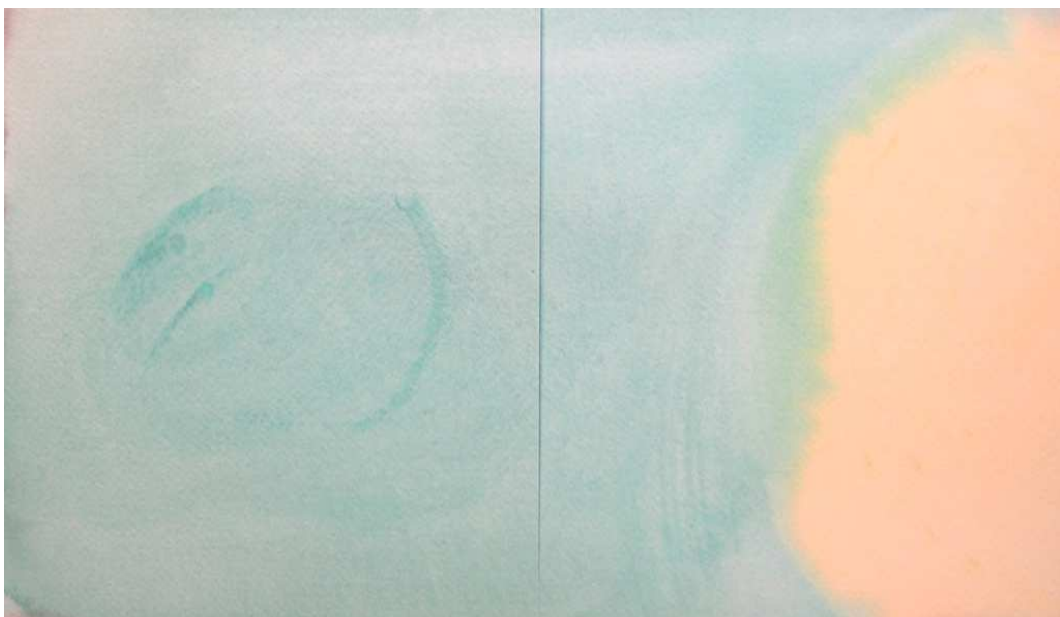


Figura 66. Acuarela verde y amarillo. Fabriano 100% algodón. Papel pintado por Alicia de Lera.

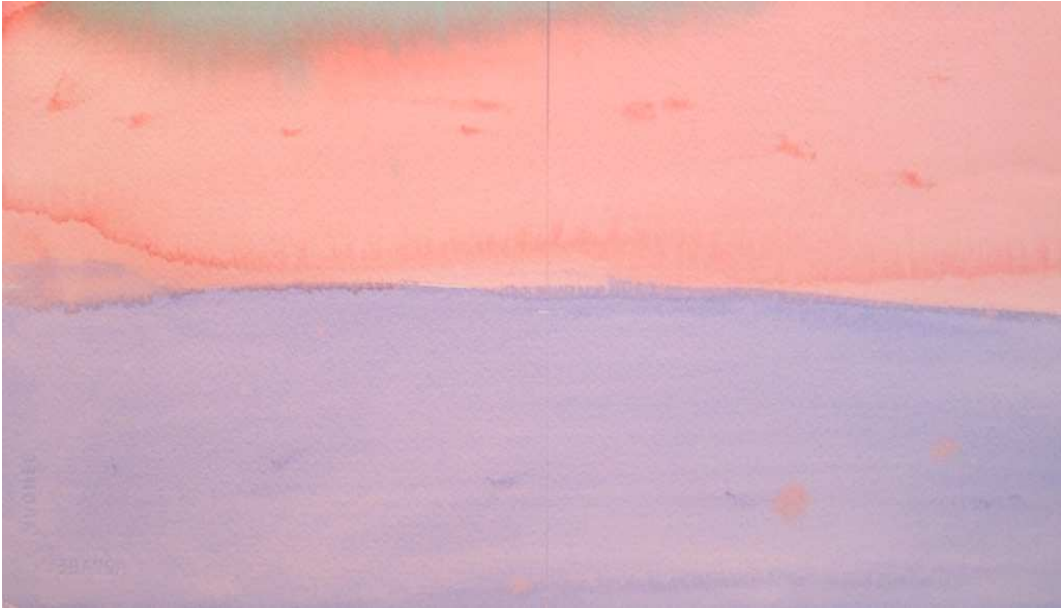


Figura 67. Acuarela roja y azul. Fabriano 100% algodón. Papel preparado por Alicia de Lera.

- **Témpera**

Los colores utilizados en las témperas Titán al agua, son los mismos que en las acuarelas (magenta, azul, amarillo, rosa, verde y negro). A continuación se muestran varios ejemplos de este tipo de técnica:



Figura 68. Témpera amarilla y negra. Fabriano 100% algodón. Dibujo ejecutado por Alicia de Lera.

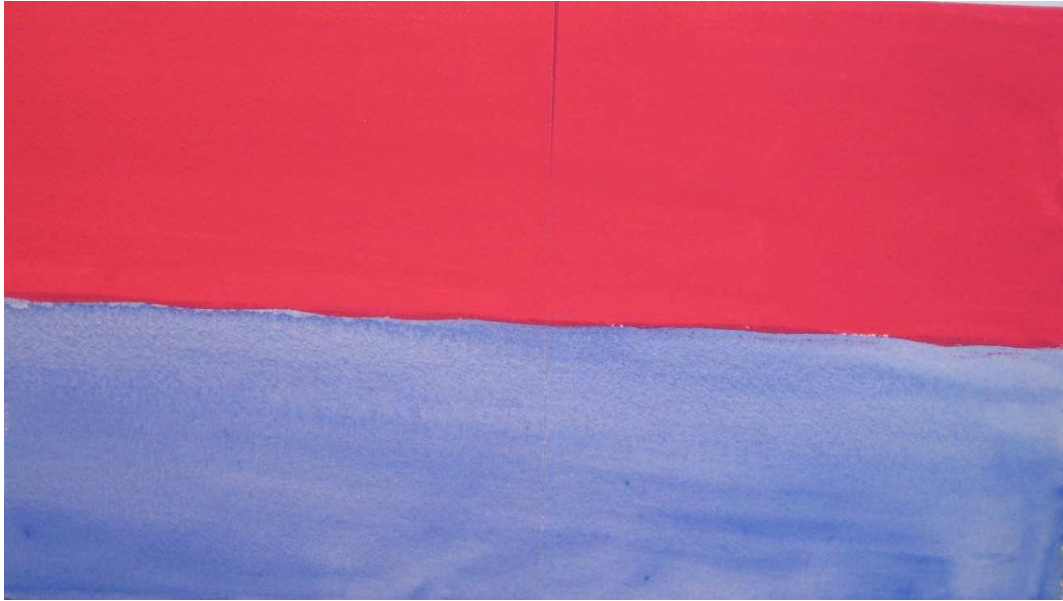


Figura 69. Témpera magenta azul. Fabriano 100% algodón. Dibujo realizado por Alicia de Lera

- **Acrílico**

Para la técnica pictórica acrílica con las pinturas Louvre Acrylic, se aplicó los mismos colores que en otras técnicas: azul, amarillo, magenta, rosa, verde y negro. A continuación mostramos dos de las muestras creadas para los experimentos:

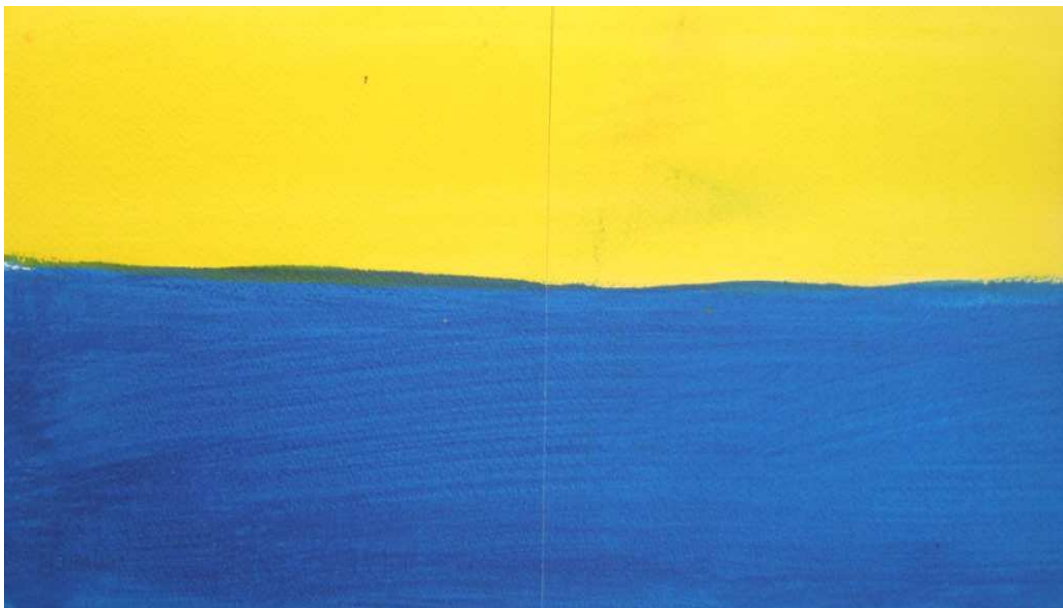


Figura 70. Acrílico amarilla y azul. Fabriano 100% algodón. Papel pintado por Alicia de Lera.

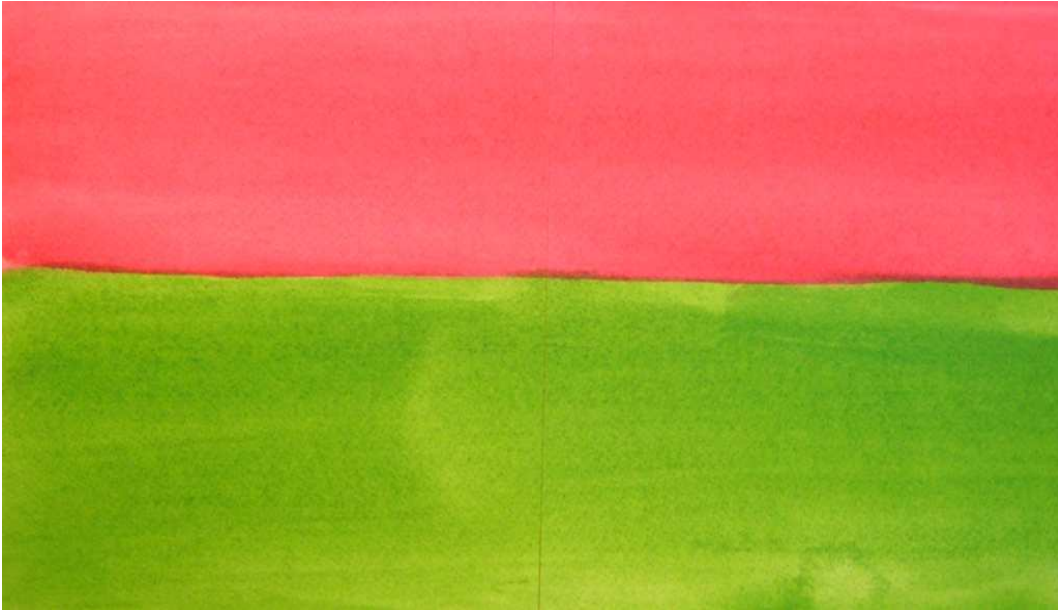


Figura 71. Acrílico rosa y verde. Fabriano 100% algodón. Probeta preparada por Alicia de Lera.

○ **Otro tipo de papeles usados**

- **Papeles de referencia**

Los papeles de referencia son los papeles de Fabriano sin ninguna técnica pictórica. Estos soportes celulósicos se envejecieron posteriormente de la misma manera que los papeles con técnicas pictóricas.

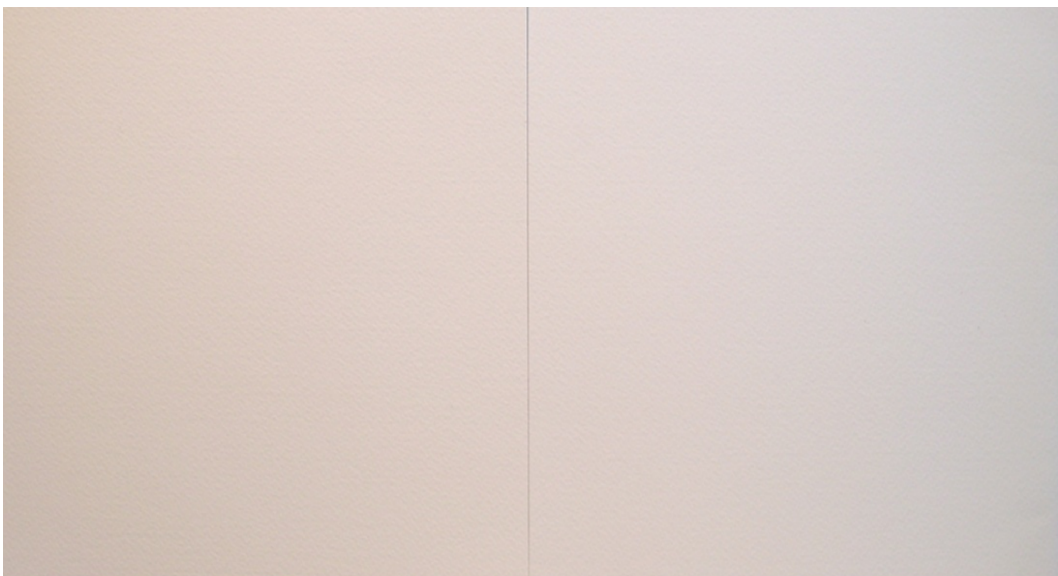


Figura 72. Papel de referencia Fabriano 100% algodón.

- **Libro**

A continuación, se observa una hoja del libro sin ningún valor económico, histórico, sentimental. Se aprecia, que la parte superior está más oscurecida. Esto es debido a un ataque de microorganismos en los bordes exteriores del libro. Y sobre todo, en la parte superior, donde debió de recibir más agua de alguna gotera o fuga.

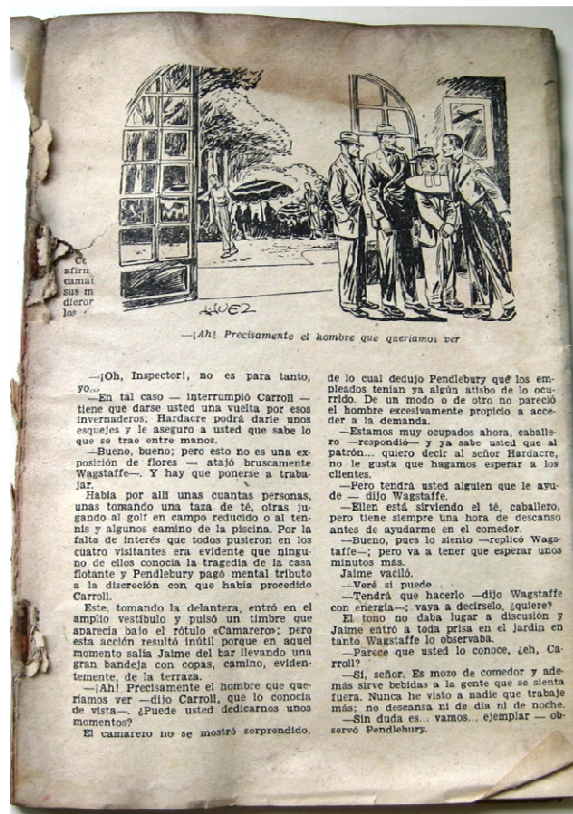


Figura 73. Libro empleado para nuestras pruebas

II.1.5.2 Envejecimiento acelerado de las muestras

Los papeles pintados y sin pintar fueron envejecidos según la norma UNE 57092-1:2002 Papel y cartón con un tratamiento con calor seco a 105 °C, explicado con anterioridad. El horno empleado poseía un termostato regulable con posibilidad de conocer la temperatura exacta del horno. Para crear la oscuridad, se tapó el cristal que muestra el interior. Los papeles fueron colgados de una rejilla mediante hilo, para que quedasen suspendidos y no se tocaran entre sí. A continuación, una vez

introducidos era verificado su correcto posicionamiento. El horno poseía ventilación, indispensable para el correcto envejecimiento de las muestras.

Las hojas del libro no necesitaron ser envejecidas artificialmente porque estaban muy debilitadas y deterioradas, y se rompían muy fácilmente. Se les realizó un pre-tratamiento para eliminar suciedad y cualquier sustancia que pudiera inhibir el efecto de las enzimas a la hora de aplicar el gel. Este proceso consistía en realizar varios lavados con agua destilada y un lavado con etanol al 0,5% en agua. También se lavaron al 0,5% en jabón. Por última se aclaraban los papeles diversas veces con agua destilada y se dejaban secar antes de proceder al tratamiento enzimático.

II.1.6 Envejecimiento acelerado en Madrid

Los papeles y técnicas empleados en esta última fase fueron los mismos que en la última que hemos descrito (Papeles Fabriano 100% algodón pintados con acuarela, pintura acrílica y témpera; papeles de referencia y del libro de más de 50 años). Esta vez se cambió totalmente la técnica de envejecimiento acelerado, y se aplicó la Norma UNE 57092-4 de tratamiento con calor húmedo a 80°C y 65% de humedad relativa. Esta norma es equivalente a la Norma Internacional ISO 5630-3:1996.

La Cámara climática CTS modelo: C-20/350/S posee los requisitos para mantener la temperatura a $80 \pm 0,5$ °C y a una humedad relativa del 65 ± 2 %. Las muestras empleadas fueron protegidas de la luz y fueron envejecidas durante $24 \pm 0,25$ h, $48 \pm 0,5$ h, $72 \pm 0,75$ h.

II.2 Métodos de medida del envejecimiento del papel

Tras el envejecimiento acelerado de nuestro material celulósico, necesitamos usar un método para averiguar su grado de envejecimiento. En restauración existen varios métodos. En Roma sólo empleamos dos: el primero era un test enzimático y el segundo era uno realizado con una solución de bióxido de titanio. Ambos métodos son destructivos. En Lyon, probamos otros test y en España realizamos test mecánicos.

II.2.1 Test Enzimático ^[407] de Roma.

La celulosa al envejecer sufre transformaciones químicas que provocan roturas de las uniones de las cadenas poliméricas y, oxidaciones con formación de grupos carboxílicos y radicales.

El test enzimático ^[408] consiste en averiguar el número de grupos carboxílicos presentes en un material celulósico (papel, tejido o madera), mediante el empleo de la enzima Glucosa oxidasa inmovilizada y un biosensor ^[409] enzimático: el electrodo de Clark ^[410] [figura 74]. De esta manera conocemos el estado de envejecimiento de nuestro papel o de cualquier material celulósico.

II.2.1.1 Preparación del test

Para este test son necesarios los siguientes elementos:

- Tampón fosfato y tampón acetato.
- Peso de alta precisión, un agitador magnético, un vaso para hacer mezclas, dos matraces, pipetas, cajas de petri y tubos de ensayo.

⁴⁰⁷ CAMPANELLA L., ANTONELLI A., FAVERO G., TOMASSETTI M., "New archeometric method for wood based on an enzymatic biosensor" *L'Actualité Chimique*, 2001, pp. 14 – 20.

⁴⁰⁸ Este sistema fue empleado por primera vez en el laboratorio del departamento de química de la Universidad de la "Sapienza" de Roma, en el 2001.

⁴⁰⁹ El biosensor mide la actividad de la enzima inmovilizada (ya que la enzima se une al papel dependiendo de su deterioro y cuanta más uniones haya , mayor será su actividad).

⁴¹⁰ El electrodo de Clark lee la difusión gaseosa de oxígeno gracias a un electrodo amperométrico

- N-(3-Dimetilaminopropil)-N etilcarbodiimide hidrachloride
- D(+)- Glucose Monohydrate
- Agua destilada

II.2.1.2 Prueba con el Electrodo de Clark

Esta prueba consiste en primer lugar, en la extracción de tres fragmentos de papel, en forma de disco con un diámetro aproximado de 1 cm. Posteriormente, cada disco de papel es pesado y depositado en placas de petri con 10mL de tampón fosfato de pH 4,8 y N-(3-Dimethylaminopropyl)-N ethylcarbodiimide hidrachloride 0,1 M.

Estos papeles con la solución, deben ser agitados durante una hora y a continuación depositados en diferentes tubos de ensayo con la enzima (4000 unidades de enzima en 1mL de tampón acetato 0,1 mol/L a un pH 5). Éstos serán conservados durante 24 horas a una temperatura de 3-4 °C. La enzima glucosa oxidasa se inmoviliza covalentemente a la celulosa del papel, gracias a la

carbodiimida que actúa de puente entre los grupos carboxílicos de la celulosa y las cadenas proteicas de la enzima; se crean uniones amida entre los grupos carboxílicos de la celulosa y los grupos amina de la enzima.

Una vez transcurrido el tiempo necesario, se sacan los papeles y se colocan en placas de petri con 10mL de tampón acetato 0,1 mol/L pH 5 y se agitan durante 20 minutos. Esta operación debe ser realizada tres veces, renovando a cada ocasión el tampón acetato para eliminar la enzima que no ha sido unida químicamente al papel.

Para medir con el electrodo de Clark, cada papel en forma de disco es puesto en contacto con la membrana del biosensor y sujeto con un fragmento de tela de nylon y una arandela. A continuación, la membrana de papel se sumerge en 10 ml de tampón acetato 0,1 mol/L pH 5 bajo agitación y se pone en funcionamiento el electrodo de Clark (en modo H₂O), conectado a un pH metro. Debemos esperar la estabilización de las medidas durante aproximadamente 5-10 min y añadir a la solución del tampón



Figura 74. Electrodo de Clark

acetato, una solución de D(+)- glucosa Monohidrato; este sustrato conlleva la disminución de la concentración de oxígeno producida por la reacción enzimática de oxidación de la glucosa. Las medidas son recogidas cada 10 segundos hasta la estabilidad de estas.

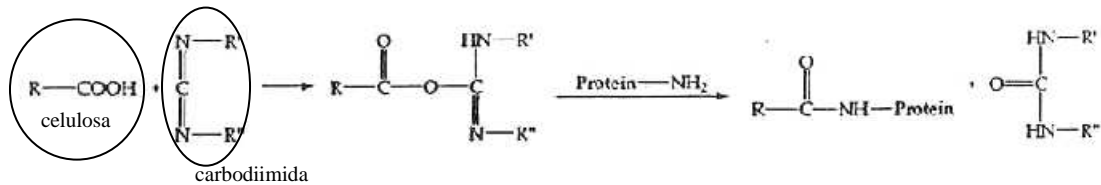


Figura 75. Inmovilización de la enzima a la celulosa con carbodiimidaCH₂N₂

II.2.2 Método enzimático para conocer la degradación del papel en Lyon.

El estudio realizado en el laboratorio de “Génie enzymatique Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS-CNRS 5246)” de la CPE de la Universidad de Lyon1, está centrado en primer lugar en la investigación de un nuevo método para medir la degradación de materiales celulósicos, y en segundo lugar en la búsqueda de una enzima que pueda restablecer las uniones glucosídicas de la celulosa. En Roma, para conocer la degradación del papel se necesitaba un día y medio; por este motivo se decidió desarrollar otro sistema más rápido. Los sistemas enzimáticos están basados en medir los grupos -COOH, grupos carboxílicos, que se forman y se liberan en la degradación de la celulosa. El método experimental desarrollado en Lyon necesitaba la combinación de la enzima peroxidasa -en vez de glucosa oxidasa- y la cámara CCD de Fujifilm ^[411].

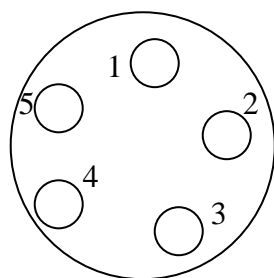
⁴¹¹ Los detalles sobre utilización y funcionamiento de la cámara CCD están descritos con anterioridad.

II.2.2.1 Primeras pruebas

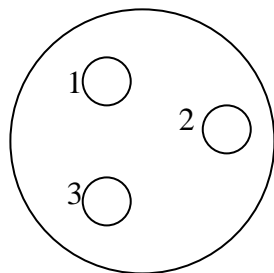
Para el primer método, se cortaron cinco fragmentos de los papeles envejecidos y otros tres sin envejecer. Seguidamente depositábamos 50 μL de GOD ^[412] (Glucosa Oxidasa) sobre cada membrana de papel y los introducíamos en el frigorífico, donde permanecían una hora. En las primeras pruebas los fragmentos de celulosa eran lavados después de la aplicación de la enzima. Estos lavados con tampón fosfato duraban 15 minutos cada uno. En pruebas sucesivas, los papeles se lavaron antes y después de ponerlos en contacto con la enzima. En ensayos posteriores la glucosa oxidasa fue reemplazada por la peroxidasa. El protocolo de aplicación de la enzima era exacto al anterior. Durante nuestra investigación, empleamos papeles envejecidos en Roma en nuestros test enzimáticos para contrarrestar los resultados con los de los papeles fotodegradados en Lyon.

II.2.2.2 Protocolo de los primeros test enzimáticos

La configuración de los fragmentos en dos placas de petri fue la siguiente:



- | |
|---|
| <p>1-Papel Joseph envejecido con UV
 2-Papel envejecido natural de 80g.m^2
 3-Papel envejecido con UV de 110g.m^2
 4-Papel envejecido con UV de 80g.m^2
 5-Papel envejecido con UV y TiO_2 de 80g.m^2</p> |
|---|



- | |
|---|
| <p>1-Papel sin envejecer de Joseph
 2-Papel sin envejecer de 110g.m^2
 3-Papel sin envejecer de 80g.m^2</p> |
|---|

⁴¹² La concentración de la enzima GOD irá variando según nuestras necesidades pero las concentraciones que hemos utilizado son de 5mg/mL, 1mg/mL, 0,2mg/mL y 0,04mg/mL.

- Lavado:

Lavado de 15 minutos con tampón fosfato, antes de aplicar la enzima sobre el papel.

- Aplicación:

Deposición de 50 μ L de GOD o peroxidasa sobre cada fragmento de papel durante 1 hora.

- Lavado:

Después del contacto con la enzima y antes de la medición con la cámara CCD, las membranas de papel fueron sumergidas dos veces durante 15 minutos, en una solución de tampón Fosfato.

II.2.2.3 Variación en el sistema enzimático

Algunos resultados obtenidos con el método anterior eran inexactos. Debido a esto, se pensó emplear una mezcla de sustancias que sirvieran de puente entre el papel y la enzima peroxidasa. Esta fase será denominada activación.

Este sistema se repitió diversas veces, variando de vez en cuando el tipo de enzima para contrastar los resultados.

- Activación:

Una vez realizados los lavados, se deposita sobre cada papel 50 μ L de una solución de EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N ethylcarbodiimide hydrochloride) 50 nM y de NHS (N-hydroxysuccinimide) 50 nM, que servirá de puente entre los grupos de ácido carboxílico -formados tras la oxidación del papel-, y la enzima peroxidasa. Esta solución permanecerá durante 30 minutos sobre cada membrana.

- Lavado:

Tras la activación, las membranas son lavadas durante 10 minutos con agua destilada.

- Inmovilización de la enzima:

Tras el lavado, sobre cada membrana de papel, se deposita 50 μL de 0,04 mg/ml de peroxidasa durante una hora. El tampón aquí utilizado será el tampón carbonato 0,1 M pH 9.

- Lavados:

A continuación son lavadas dos veces las membranas de papel con tampón fosfato 0,1 M pH 7 durante 15 minutos.

- Medidas:

Antes de depositar las membranas dentro de la caja negra de la cámara CCD, se depositará 50 μL de una solución ^[413] con luminol previamente preparada.

Protocolo de la nueva prueba:

- 1- Lavado de 20 minutos con Tampón (Tp) fosfato y NaCl y un segundo lavado con Tp fosfato
- 2- Activación con NHS + EDC 50nM (30 min.)
- 3- Lavado con agua destilada
- 4- Inmovilización de la enzima Peroxidasa con Tp C (1h)
- 5- Dos lavados de 15 min. con Tp Fosfato
- 6- Medida con la cámara CCD

II.2.3 Nuevo protocolo de medida de la degradación con la enzima HRP-

HIS.

El sistema de medida para conocer la degradación de la celulosa no daba del todo resultados satisfactorios, por lo que fueron de nuevo variados la composición y el método del sistema enzimático.

⁴¹³ Solución compuesta por 1mL de tampón VBS, 5 μL de H₂O₂ , 40 μL de Luminol y 20 μL de p-iodofenol 10nM.

Se utilizó la peroxidasa de Raifort, modificada con residuos de histidina (HRP-His). Estos residuos quelados permiten a la enzima fijarse sobre un átomo de níquel quelado con un poliácido. Este poliácido estará presente en las fibras degradadas de la celulosa. La fijación de la HRP-His será utilizada como marcador de la degradación del papel. Para poder realizar este sistema, fue necesario utilizar la cámara CCD para obtener imágenes de quimiluminiscencia.

Protocolo

Cada membrana de papel se introduce en un tubo de ensayo junto a 500 μL de NiCl_2 , durante 30 minutos. Esta sustancia sirve de puente entre los grupos carboxílicos y la etiqueta histidina de la enzima peroxidasa [Figura 76]. Después, se lavan los papeles con un 1mL de tampón VBS durante 20min, y posteriormente se aplican 500 μL de la enzima HRP-HIS/ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ en tampón VBS, durante 30 min. Por último, se efectúan dos lavados de 20 min con 1 ml de tampón VBS y se procede a la medición con la cámara CCD. La solución de medida está compuesta por 1mL de tampón VBS, 5 μL de H_2O_2 , 40 μL de Luminol y 20 μL de p-iodofenol 10 nM.

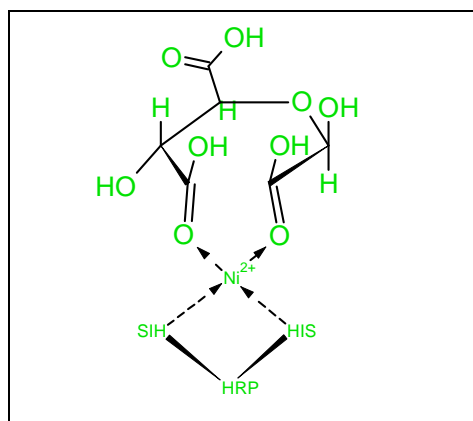


Figura 76. Unión entre los grupos carboxílicos y la etiqueta histidina de la enzima peroxidasa.

II.3 Consolidación experimental del papel

II.3.1 Consolidación en Roma con esteres de las algas.

II.3.1.1 Hipótesis

El uso de enzimas para la consolidación celulósica era el primer objetivo en esta investigación. No obstante, en Roma esto no era factible por motivos económicos. Por esta razón se optó por el uso de las algas *Spirulina subsalsa*. Hipotéticamente, estas algas en contacto con un metal pesado se estimulaban y podían producir alguna sustancia “esteres” ^[414], catalizadas por enzimas, que pudiesen subsanar las uniones glucosídicas degradadas entre las cadenas de celulosa.

II.3.1.2 Preparación

En primer lugar, se escogió el metal pesado mercurio (HgNO_3) que sirve para estimular las algas. Este metal pesado podría ser sustituido por otro metal de menor impacto medioambiental.

A continuación, se prepara una solución de mercurio (HgNO_3) 10^{-10} M donde se sumergen las algas y donde se pondrán los papeles en contacto con las algas en la solución de mercurio durante un periodo de 4 horas, 48 horas, etc.

Estos papeles habrán sido previamente envejecidos aceleradamente con rayos UVA, según se ha descrito anteriormente.

Por último, una vez transcurrido el tiempo de 4 horas, 16 horas, etc., de contacto entre papel y solución, se sacan los papeles, se dejan secar y, se protegen de la luz y la humedad relativa del laboratorio.

El paso siguiente será realizar el test enzimático para conocer el estado del papel y si este sistema con algas, consigue consolidar el papel.

⁴¹⁴ Se supuso que eran esteres pero aún quedan pruebas por realizar para conocer su naturaleza.

II.3.2 Consolidación de celulosa en Lyon

Tras realizar el estudio de enzimas en restauración y conservación de obras de arte, se planteó la posibilidad de consolidar los materiales celulósicos con enzimas.

Ese ha sido el principal objetivo de la parte práctica de esta investigación. Es decir, encontrar una enzima capaz de reforzar la celulosa desde su interior, sin introducir ningún adhesivo.

En un primer momento, no se encontró ningún artículo sobre la consolidación enzimática en restauración por lo que la búsqueda fue dirigida a artículos de biotecnología. Se encontraron los artículos “Chemical síntesis of cellulose and cello-oligomers using a hydrolysis enzyme as a catalyst” ^[415] y “Glycosidase-catalyzed synthesis of oligosaccharides through intermediate analogue substrates” ^[416], donde sintetizaban celulosa con enzimas hidrolíticas. Este hallazgo sirvió para comenzar la investigación.

II.3.2.1 Primeros ensayos de consolidación enzimática

○ Selección del material

En la primera fase de este tipo de consolidación se emplearon los siguientes papeles:

- Fragmentos de papeles de 80 g/m² Claire Fontaine sin degradar (papeles de referencia).
- Membranas de papel fotodegradado con el “veterómetro” durante 6 horas.
- Fragmentos foto degradados con TiO₂ y la poli Light durante 6 horas.
- Papeles degradados con el HCl 0,1 M durante 30 min.

⁴¹⁵ KOBAYASHI S., SHODA S., “Chemical síntesis of cellulose and cello-oligomers using a hydrolysis enzyme as a catalyst” *Int. J. Biol. Macromol.* Vol. 17 n° 6, 1995, pp.373-379.

⁴¹⁶SHODA S., FUJITA, M., KOBAYASHI S., “Glycanase-Catalyzed Síntesis of Non-natural Oligosaccharides” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, Vol.10 n°. 54, 1998, pp.279-289.

○ **Aplicación de una solución enzimática**

Se cortaron los papeles en forma circular con un diámetro aproximado de 0,7-1 cm. A continuación se colocaban sobre un soporte impermeable donde se les añadía 50 μL de la solución enzimática. La proporción de esta solución era de 1:5 enzima/solvente acetonitrilo. Y la concentración de la celulasa era de 5 mg/ml en tampón acetato 0,1 M pH 5,5. Después sumergíamos los papeles durante 30 minutos en tampón fosfato 0,1 M y repetíamos la operación una segunda vez para limpiarlos.

- **Comprobaciones**

Los primeros resultados del método enzimático para conocer la degradación de la celulosa mostraban una clara mejoría del estado del papel. Por lo tanto, era necesario realizar diferentes pruebas reemplazando materiales, cambiando las proporciones, etc., para averiguar los diferentes resultados con esos cambios.

3. Variación de la solución enzimática

En una segunda fase, se varió la solución enzimática depositada sobre cada membrana de papel y se amplió el tiempo de actuación hasta 20 horas. La solución estaba compuesta por: 400 μL de acetonitrilo, 100 μL de tampón acetato 0,05 M pH 5, 25 μL de celulasa 5 mg/ml con tampón acetato pH 5 y 25 μL de glucosa-1-fosfato 0,1 M con tampón acetato pH 5.

Trascurrido el tiempo del tratamiento se realizaron dos lavados rápidos y otros dos de 1mL de agua destilada durante 20 minutos.

Los papeles utilizados eran de Claire Fontaine de 80 g/m^2 y de 110 g/m^2 , envejecidos previamente con rayos ultravioleta durante 360 minutos.

4. Sustitución de la celulosa por otra proteína

En primer lugar se testó si la celulosa reparaba o no el papel. Para averiguarlo, se reemplazó la celulosa por una proteína *Album de Bovine serum* (Sigma-Aldrich).

Si los resultados de los test enzimáticos mostraban que el papel había sido reparado con la proteína *Album*, se demostraría que la celulosa no es la que repara el papel.

En pruebas sucesivas se testaron dos tipos de celulosas para saber cuál tenía mejores resultados. Las celulosas que se emplearon fueron: la celulosa de Sigma y la de Fluka.

Por último, se compararon papeles tratados con celulosas con otros sin celulosas. El tiempo de aplicación también fue disminuido de 4 a 2 horas, debido al debilitamiento físico que presentaban los papeles tras las 4 horas de tratamiento.

5. Variación de las proporciones de solvente y de tampón

Para observar el efecto que creaba el solvente y el tampón sobre la actividad enzimática de las celulosas, se decidió variar las proporciones de la solución enzimática.

Sobre una membrana aplicamos 100 μL de acetonitrilo y 400 μL de tampón acetato, y en otra 200 μL de acetonitrilo y 300 μL de tampón acetato.

6. Efecto de la temperatura ambiente en la actividad enzimática.

Se observó que la actividad enzimática variaba según la temperatura ambiente. Quedaba saber si este fenómeno afectaba en el resultado de la reparación celulósica.

7. Lavados

a- Con el solvente y el tampón

En las primeras pruebas, los papeles después del tratamiento enzimático con celulasas, se lavaban con agua destilada. Diferentes pruebas revelaron que los lavados con agua podían activar la actividad hidrolítica de las celulasas antes de ser eliminadas completamente y degradar el papel. Por este motivo, decidimos lavar los papeles con 400 μL de acetonitrilo y 100 μL de tampón acetato –el solvente y tampón de la solución enzimática-.

b- Con inhibidores de celulasas

Estudios realizados ^[417] en el pasado, demostraron que la aplicación de quelantes activos, DHA y AMU y sus complejos metálicos de Cu (II) inhibían las celulasas al acoplarse a su centro activo. En otros estudios (Mandels y Reese, 1963) empleaban lactonas, glucolactonas, formaldehidos, reactivos carbonilo, agentes oxidantes y (Jermyn, 1952) agentes complejos como la 8-hidroxi quinonlina e iones de metales pesados.

Investigaciones posteriores ^[418] demuestran que dos lavados son suficientes para eliminar el 99 % de la enzima, por lo que no es necesario utilizar inhibidores. Pero nuestro problema era que el agua activaba la acción hidrolítica y degradaba el papel antes de eliminar la presencia de enzimas en el papel. El problema era saber cuál era el inhibidor más adecuado para las celulasas que no degradara el papel.

Se realizaron diferentes pruebas con etanol ^[419], para averiguar el estado del papel después del lavado con etanol y, si tenía efecto inhibitor con las enzimas.

⁴¹⁷ RAO *et al.*, “A non conventional method of wood preservation”, *Journal of archaeological chemistry*, Vol. 4, 1986, pp. 11-15.

⁴¹⁸ MEYER A.T., ANDREWS W., BAKER C., “An investigation into the removal of enzymes from paper following conservation treatment” *Journal of the American institute of conservation*, vol. 31, n° 3, 1992, pp. 312-323.

⁴¹⁹ La aplicación de etanol sobre fibras de celulosa es perjudicial. Reseca las fibras, degradándolas.

En el libro “*Handbook of Enzyme Inhibitors*”^[420], los inhibidores de la celulasa son la celobiosa, la glucosa y la fenil beta D-glucósido y, según la base de datos Brenda^[421] de enzimas, los inhibidores de la celulasa (proveniente del hongo *Trichoderma viride*) son los iones metálicos de la plata (Ag⁺), cobre (Cu²⁺), Magnesio (Mg²⁺), Hierro (Fe²⁺), Mercurio (Hg²⁺) y el compuesto químico permanganato potásico KMnO₄. Estos iones y compuestos oxidan el papel, por lo que se evitará emplearlos en la limpieza del consolidante enzimático y la investigación se centrará en el uso de los primeros inhibidores como la celobiosa.

II.3.2.2 Gel enzimático

La solución enzimática tenía varios inconvenientes. Su actividad enzimática variaba según la climatología de cada día y la inmersión prolongada del papel en la solución tenía consecuencias negativas en el estado físico del papel. Por estas razones, se decidió usar un gel para controlar las fluctuaciones de temperatura y humedad relativa, disminuir la velocidad de evaporación del solvente y eliminar la inmersión prolongada del papel.

Los geles empleados en restauración suelen ser metilcelulosa, carboximetilcelulosa, agar-agar, etc. Los dos primeros fueron descartados al ser derivados de la celulosa; ya que se desconocía cómo iban a reaccionar mezclados con celulasas. Así que se optó por el gel Agar-agar, basándose en el artículo de Nieves Valentín^[422].

⁴²⁰ HELMWARD SOLLNER, *Handbook of Enzyme Inhibitors* (3ª edición), Ed. Wiley-VCH, New York, 1999.

⁴²¹ http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.4

⁴²² VALENTÍN N., SÁNCHEZ A., HERRAEZ I., “Analyses of deteriorated Spanish glass windows: cleaning methods using gel systems” *Triennial meeting (11th), Edinburgh, 1-6 September 1996: preprints*, Ed. ICOM. Committee for Conservation, James & James, London, 1996, pp. 851-856.

○ **Preparación del gel**

La preparación del gel tenía una dificultad. El gel agar no llegaba a mezclarse bien con la solución enzimática con acetonitrilo. Además, tenía otra dificultad que era la temperatura a la hora de mezclar el gel y la solución ^[423], porque hay que controlar que el gel no esté ni demasiado caliente para desnaturalizar las enzimas, ni demasiado frío porque al gelificar, no se puede realizar una mezcla homogénea entre el gel y la solución enzimática.

Estos dos problemas se solucionaron con el uso de un agitador magnético y el control riguroso de la temperatura con un termómetro.

Por lo tanto, para fabricar el gel enzimático se debe en primer lugar, preparar una pequeña cantidad de gel agar al 1 %. (10 mg de agar-agar en 1 ml de H₂O hasta 80-100 °C). Posteriormente, se espera a que la temperatura del gel descienda hasta 35-36 °C, y se añade la solución enzimática con un agitador magnético para obtener un gel homogéneo. Por último, el contenedor del gel será tapado mientras éste se enfría a temperatura ambiente, para evitar la evaporación del acetonitrilo.

○ **Metodología para la puesta a punto del gel y verificación de su eficacia.**

Fueron efectuadas en una primera fase, diferentes pruebas que se exponen a continuación, para comprobar la eficacia del gel, su duración, las posibilidades de fabricarlo con otras sustancias y, averiguar la aplicación más adecuada y respetuosa con la obra.

1. Se estudió en cuánto tiempo el gel perdía su efecto reparador.

Para ello, se guardó el gel de un día para otro y se realizaron diferentes test a los papeles, cada día hasta que el tratamiento perdiese eficacia y degradase el papel.

⁴²³ Solución de 400µL de acetonitril, 100µL de tampón acetato, 25 µL de glucosa y 25 µL de celulasa.

2. Se comprobará qué temperatura es la más adecuada para mezclar la solución enzimática con el gel de agar, para que las enzimas no se desnaturalizen.
3. Una vez preparado el gel, se contrastará su actividad reparadora en un ambiente cerrado y abierto, dejando evaporar ligeramente el disolvente.
4. Se emplearan diferentes sustratos. En un primer lugar, se utilizará glucosa-1-fosfato, un sustitutivo del sustrato β -celobiosa fluorada usado en el artículo de referencia. Más adelante, se usará la α y β -celobiosa fluorada, sintetizada en la Universidad de Lyon.
5. Se separará el gel del papel con un tejido no tejido –Reemay- para evitar la proliferación de hongos en el papel y se verificará que los resultados sean lo suficientemente satisfactorios.
6. Se investigará la mejor aplicación del nuevo sustrato β -cellobiosyl fluoride de tres maneras diferentes: en solución, en un gel preparado con agua destilada y en otro gel preparado con tampón acetato.
7. Se comparará la eficacia entre un gel de agar preparado con tampón acetato y otro con agua destilada.
8. Se variará los tipos de papeles de las pruebas. Se envejecerá papel blanco de uso corriente y papel de periódico con rayos ultravioletas UVA.
9. Por último, se experimentará con diferentes disolventes: dimetilsulfósido, etanol y acetonitrilo.

II.3.2.3 Segunda fase del Gel enzimático

La segunda parte experimental está centrada en aplicar el gel en papeles con técnicas pictóricas, para observar si los pigmentos o aglutinantes pueden afectar de alguna manera al tratamiento, reduciendo la actividad enzimática, al ser posibles inhibidores de las enzimas. Por otro lado, se comprobará que el gel no degrada la policromía del papel.

En esta fase de la investigación se intentó también encontrar un lavado adecuado que inhiba la actividad hidrolítica de las celulasas y no sea perjudicial para las fibras de celulosa del papel.

Esta parte de la investigación fue realizada a caballo entre el País Vasco, donde se preparaban las probetas, y el laboratorio de enzimología de Lyon, donde se aplicaban los geles enzimáticos. Debido a la imposibilidad de realizar los geles en el Laboratorio de química de la Facultad de Bellas Artes, fue obligatorio volver periódicamente al laboratorio de Lyon.

○ **Preparación de los envases para los geles**

Antes de fabricar el gel, se debe preparar los recipientes impermeables y químicamente inertes donde se depositará el gel y las soluciones inhibitoras de las enzimas en los lavados; se seleccionó el material MYLAR® por sus características.

Los recipientes fueron realizados de la siguiente manera:

En primer lugar se mide los papeles a tratar. Posteriormente se dibuja en la hoja de MYLAR® las medidas tomadas (representando el fondo del recipiente) y se suman 4 cm más en todo el perímetro antes de cortar el papel. Esos 4 cm servirán de paredes del recipiente para que no se salga el gel o la solución inhibitora.

○ **Preparación definitiva del gel enzimático.**

La preparación del gel no dista de los geles preparados con anterioridad; aunque se varió el fabricante o el tipo de algún que otro componente que se mencionará más adelante. Por otro lado, las dimensiones del papel y las cantidades de cada sustancia fueron superiores para poder realizar los test mecánicos. Para efectuar estos test, los papeles debían tener unas dimensiones bastante superiores a las que se habían utilizado hasta ese momento (de largo como mínimo 19 cm para poder atar las tiras de papel a las mordazas de la máquina de los test mecánicos). Por lo tanto los geles y sus cantidades debían ser superiores.

○ **Receta del gel:**

• **Agar**

En esta fase se empleó en un primer momento el agar ultra-pure y el Agarose I de AMRESCO. En pruebas sucesivas se utilizó el gel Agarosa al 1 % en tampón acetato ^[424]. Estos geles deben ser calentados al baño maría a una temperatura de 80-90 °C, hasta observar que el gel sea completamente translúcido.

La cantidad empleada de gel es de 300 mg de agar y 30 ml Tampón Acetato (a un pH 5,5 y una concentración de 0,1 M).

• **Solución enzimática**

La solución enzimática tiene que prepararse previamente y luego ser añadida al gel. Se recuerda que el gel debe bajar a una temperatura de 36 °C para poder añadir la solución enzimática, siempre con ayuda de un agitador magnético. Si la temperatura fuera superior, las enzimas pueden ser desnaturalizadas y el gel quedaría inservible o incluso perjudicial para el papel.

La receta de la solución es la siguiente:

- 12 ml de etanol o acetonitrilo
 - 3 ml de tampón acetato 0,1 M pH 5,5
 - 0,750 ml de celulasa ^[425] con una concentración de 5 mg/ml.
 - 0,750 ml del sustrato β-celobiosa fluorada ^[426].

O también:

- 18 ml de etanol (y se experimentó con acetona).
 - 4,5 ml de tampón acetato pH 5,5
 - 1,125 ml de celulasa (5 mg/ml) ^[427].
 - 1,125 ml de β-celobiosa fluorada ^[428].

⁴²⁴ El tampón acetato se prepara con 15,6 g de acetato de sodio y 7,46 g de cloruro de potasio en 1 l de H₂O.

⁴²⁵ Celulasa: Para prepararla debíamos dividir por ejemplo el peso (2,4 mg) de enzima entre (5 mg/ml), obteniendo 0,48 ml que es la cantidad de tampón necesaria.

⁴²⁶ Beta celobiosil fluoride 0,1 M es: 0,750 ml x 0,1 M x 344 PM= 25,8 mg

⁴²⁷ Cellulase al 5 mg/ml: 6,1 mg de cellulase----1,22 ml de tampón Ac.

El gel enzimático debe gelificarse y enfriar antes de su utilización. En muchas ocasiones se deja preparado de un día para otro en el frigorífico, protegido con una hoja impermeable de MYLAR®, en contacto con el gel y un papel de aluminio recubriendo el envase. Cabe la posibilidad de utilizarlo como mínimo, una hora después de su fabricación. De esta manera evitamos que se evapore tan rápidamente el solvente.

○ **Probetas y tratamiento**

Antes del tratamiento, se pesaron los papeles con el fin de poner en evidencia eventuales diferencias de peso antes y después del tratamiento. El gel siempre deberá ser separado del papel con un tejido no tejido que evita el contacto directo e impide dejar restos del gel sobre el papel, que puedan producir una proliferación de microorganismos en un futuro (Obsérvese el esquema siguiente).

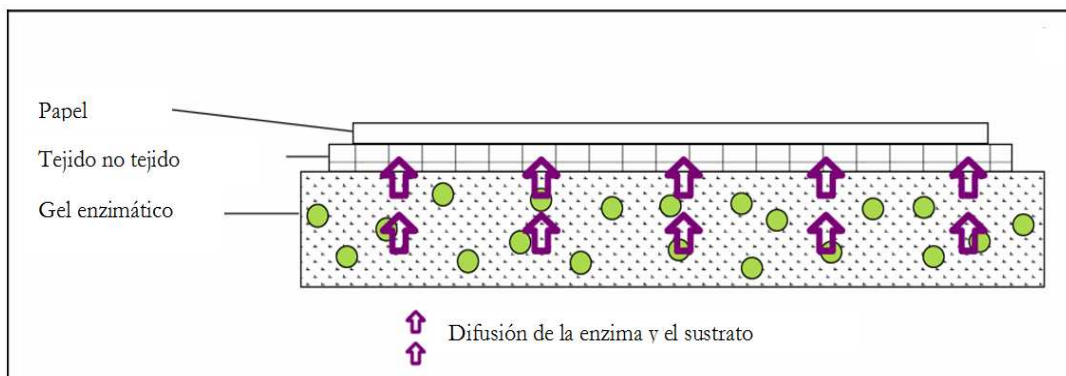


Figura 77. Esquema de las diferentes partes del tratamiento y el sentido de la difusión de la enzima.

El tratamiento con el gel dura dos horas, durante las cuales hay que estar atento a que la solución enzimática del gel impregne homogéneamente los dibujos. En algunas ocasiones los papeles se embebían heterogéneamente, curvándose por algunas zonas y por otras no [Figura 78]. Para evitar este fenómeno, se puede colocar un ligero peso sobre el papel para poner en contacto toda la superficie del papel con el gel.

⁴²⁸ 1,125 ml.0,1 M.344=38,7 mg de sustrato

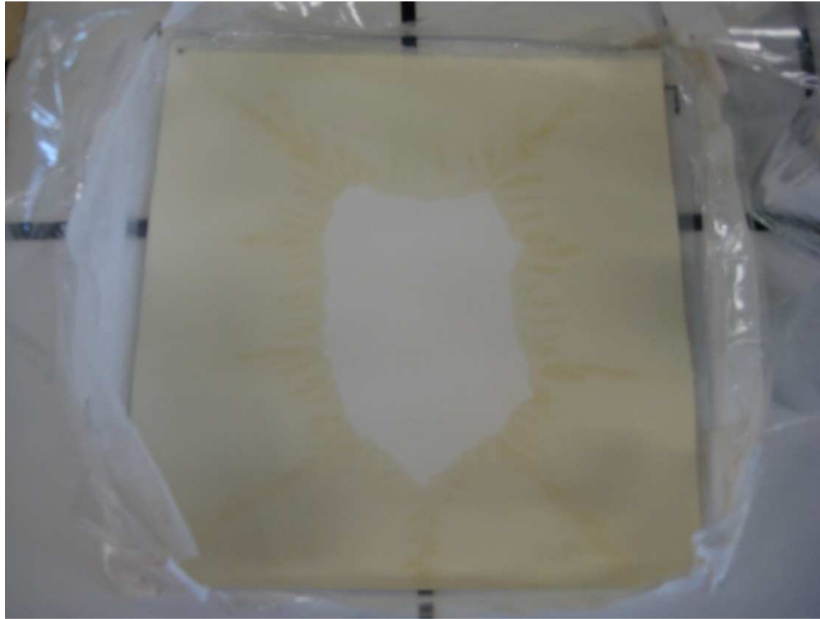


Figura 78. Papel sin técnica pictórica durante el tratamiento. Obsérvese que la solución empapa heterogéneamente el papel.

Normalmente, el tratamiento se realiza en el laboratorio. No obstante, también se puede realizar el tratamiento bajo una campana de succión para evitar respirar los vapores del etanol o acetonitrilo cuando se evaporan y eliminar cualquier peligro de toxicidad. Este método es menos perjudicial para el restaurador pero acelera la evaporación del solvente.

De todos modos, en la última fase de esta investigación, se descubrió que el tratamiento enzimático daba muy buenos resultados, manteniendo la temperatura entre 5-15 °C.

○ **Los lavados inhibidores del tratamiento.**

Esta fase se centra sobre todo en la búsqueda de un inhibidor eficaz para las enzimas del gel. Porque tras el tratamiento y la evaporación del solvente, éstas podían trabajar como hidrolasas y degradar el papel.

Se realizaron múltiples pruebas a los papeles tratados y se observó que las enzimas no habían sido inhibidas a tiempo y el papel había sido degradado. Por ese motivo, se buscó la forma de inhibirlas sin perjudicar al papel, con diferentes lavados después del tratamiento enzimático con el gel.

En la segunda fase de la investigación realizada en Lyon, se desconocía cuál era el mejor inhibidor de las celulasas. Tenían que reunir varios requisitos: que fueran respetuosas con los papeles, con y sin técnicas pictóricas y, que inhibiesen completamente la acción hidrolítica de las celulasas, una vez el disolvente se hubiera evaporado.

La búsqueda del inhibidor o quizá sistema inhibidor comenzó por unos simples lavados con tampón fosfato pH 8 0,1 M y 1 % de etanol en el tampón durante diez minutos. Y seguidamente, se realizan dos lavados con agua destilada, para eliminar cualquier resto de enzima y material no deseado.

Posteriormente se experimentó con SDS al 2 % en H₂O pero los resultados de los lavados no fueron satisfactorios por lo que se buscó otro tipo de inhibidor para las enzimas.

Se aplicaron también lavados de D-cellobiose ^[429] en una concentración de 10mM ^[430]. Este inhibidor, es el producto producido por las propias enzimas celulasas que inhiben su actividad enzimática (se puede encontrar en la página de Sigma-aldrich). Los papeles se sumergen en la solución de D-cellobiose preparado en un primer momento con agua y posteriormente con el tampón acetato (TpAc). Por último se lavan los papeles con agua destilada y etanol al 1 %.

Los lavados serán los siguientes:

- 1- D-cellobiose 10 mM en H₂O
- 2- D-cellobiose 10 mM en TpAc
- 3- Alcohol al 1 % en H₂O (dos veces).

Por último, se experimentaron múltiples lavados para poder compararlos entre sí y deducir cuál era el mejor para inhibir las enzimas y el menos perjudicial para el papel.

Las hojas fueron divididas en varios fragmentos con una anchura mínima de 4 cm. Los tratábamos con el gel enzimático de alcohol o acetonitrilo separados mediante

⁴²⁹ http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=22150|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

⁴³⁰ 100ml de solución D-cellobiose: 342mg en 100ml de H₂O

Reemay®. El gel fue cambiado por el de Agarose (typeD-5 gelling $t^{\circ}=36^{\circ}\text{C} - 89,3^{\circ}\text{C}$ Euromedex). Por último, se efectuaron los diferentes lavados durante 15 minutos cada uno:

1. Tampón acetato 1 % etanol (3 lavados).
2. Tampón acetato 1 % etanol, entre papeles secantes [Figura 79].
3. D-cellobiose 10 mM=342 mg en 100 ml
4. D-cellobiose 50 mM=1,710 g en 100 ml
5. Tpool 3%
6. Sólo etanol entre papeles secantes.
7. Hipoclorito de sodio
8. Hiposulfito sódico 3% (1,5 g en 50 ml H_2O)

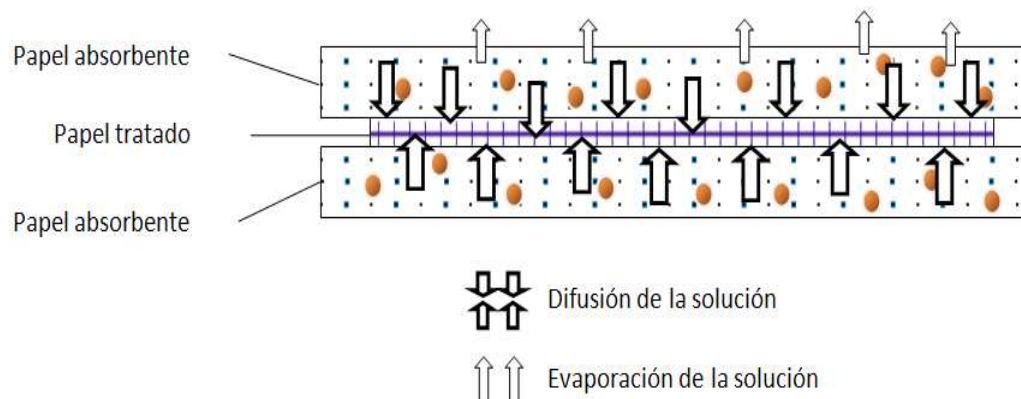


Figura 79. Esquema del lavado entre papeles secantes