

Anexos

Anexo I

Autores: Alicia de Lera Santín

Título: “Estudio de Enzimas en Procesos de Conservación y Restauración de
Obras de Arte”

Tipo de publicación: artículo

Nombre de la publicación: *Academia de España en Roma*

Año: 2006

Páginas: 96-101.

ALICIA DE LERA
Irrin (Cephalos), 1980



En 2004 obtiene el título de Licenciado en Bellas Artes por la Universidad del País Vasco. Paralelamente realiza prácticas en empresas de restauración en Leica, Burjos, Hondambia y también en el taller de restauración de la Facultad de Bellas Artes de la Universidad del País Vasco.

En 2004 recibe una beca Erasmus con la que realiza una estancia en Atenas (Grecia), donde adquiere conocimientos de restauración de cerámica, piedra, mosaico, materiales orgánicos y fotografía. Entre 2004 y 2005 cursa una parte del doctorado en Conservación de Bienes Culturales en Leica.

Durante 2006, y gracias a la beca de la Real Academia de España en Roma, realiza una parte de sus investigaciones sobre la consolidación de materiales celulósicos en la Universidad de la Sapienza, en Roma (Italia), y una búsqueda bibliográfica en la biblioteca del ICCROM. También realiza un curso de limpieza de superficies pictóricas en Cremona (Italia) y otro sobre textiles en Sevilla.

Actualmente realiza parte de la tesis en la Universidad de Lyon1 (Francia), especializándose en la utilización de enzimas en la consolidación de soportes celulósicos de obras de arte.



Máquina de foto-degradación



Máquina de foto-degradación durante la degradación los tubos de rayos ultra violeta.



Solución de H₂O₂ con papel, bajo agitación

Para esta prueba se tomaron cuatro discos de papel "extra strong" (+/- 185mg cada uno). La solución del fotocatalizador estaba compuesta por 100ml de H₂O destilada y de 0.1mg de bióxido de titanio. Posteriormente, se irradió la solución con discos y con luz ultravioleta por medio de la "light". Para ver la evolución de la degradación del papel, se utilizó un potenciómetro*.

3.1.3 Evaluación de aceleración con HCl

El último método utilizado para envejecer el papel fue por medio de ácido clorhídrico. Se usó un baño de agua con un calentador de agua de 100ml de H₂O destilada y de 0.1M durante medio hora (tiempo suficiente para poder ver a simple vista la degradación del papel)

Después de los procesos de envejecimiento acelerado realizados con TIO₂ y HCl, se dejaron secar las hojas al aire libre.

3.2 Teste de conservación

Para conocer el grado de degradación que puede llegar a tener un material celulósico, se pueden utilizar diferentes métodos. En Roma utilizamos concretamente dos, aquellos que consideramos más efectivos. El primero con amoníaco y el segundo con bióxido de titanio.

* El potenciómetro utilizado es un Ohaus modelo 6204, pH Meter y detector de iones de titanio instalado con un ultravioleta con la Palflyz. Fuente: Larínosa de alta tecnología

100 ALICIA DE LEBIA

3.2.1. Test Enzimático⁶

El test, con un laboratorio⁷ en comisión fue realizado y validado y realizado por primera vez en 2001 en el departamento de química de la Universidad de la "Sapienza" de Roma. Gracias al 4-Electrodo de Clark enzima Glucosa oxidasa inmovilizada y a un electrodo de Clark⁸ (fig. 4), se consiguió conocer el número de grupos carboxílicos presentes en una muestra antigua y averiguar así su estado de envejecimiento.

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

Esta prueba se realizó de la siguiente manera: se contaron primero tres discos de cada tipo de papel envejecido con un diámetro de 1cm. A continuación, se pesaron y se depositó cada disco en placas de petri con 10mL de tampón fosfato de pH 4,0 y N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidracilamida D.M. Posteriormente se agitaron las placas durante una hora y tres cuartos de hora, se introdujeron los tres fragmentos en tres tubos de ensayo con el ácido y 1mL de tampón acetato en el frigorífico a 3-7°C. Transcurrido un día, se sacaron los tubos del frigorífico y se colocó todo fragmento de papel en placas de petri con 10mL de tampón acetato durante 20 min., bajo agitación. Esta operación se repitió dos veces más y en cada una de ellas se tomó el tampón acetato.

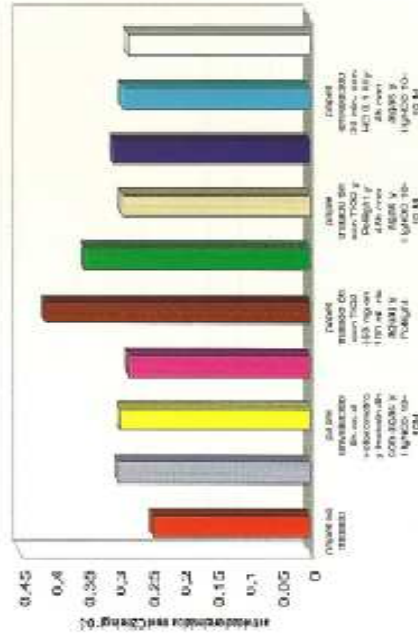
ELECTRODO DE CLARK

Después de haber realizado el procedimiento anterior, se puso el papel en contacto con la membrana del electrodo de Clark y se sujetó con un fragmento de tela de nylon y una arandela. La membrana de papel se sumergió en 10mL de tampón acetato bajo agitación gracias a un agitador magnético y se puso en funcionamiento el electrodo de Clark (en modo H₂O), conectado a un pHmetro. A continuación se esperó hasta que las medidas fueron estables (1-5-10min) y se añadió al tampón acetato DE(1) glucosa Monohidrato, por último se cogieron las medidas durante más o menos 10min (tiempo necesario para que se estabilizara la numeración).



Configuración del Clark⁸

Resultados del test enzimático de Glucosa oxidasa



6- Ver vereda de U¹ de la IAL (inglés)

7- El bioensayo mide la actividad de la enzima inmovilizada (ya que la enzima de Clark se une al papel dependiendo de su tamaño y cuando más haya, mayor será su actividad).

8- El electrodo de Clark lee la difusión gaseosa de oxígeno gracias a un electrodo amperométrico.

Anexo II

Autores: Luigi Campanella, Cecilia Costanza, Alicia de Lera

Título: RIPARAZIONE DI CARTA INVECCHIATA ARTIFICIALMENTE E
FOTODEGRATA

Tipo de publicación : Poster

Una giornata ABiCi –Ambiente e Beni Culturali in bicicletta 6-7 luglio 2006

Villa Presidenziale del Gombo – Tenuta di San Rossore - Pisa

Anexo III

Autores: Alicia de Lera Santín, María Teresa Escohotado Ibor, Loïc Blum y
Christophe Marquette.

Ponencia en la SEDE Capitolio Nacional. La Habana, CUBA, Mayo del 7 al 9
2007.

Taller sobre la Conservación del Patrimonio Documental y la Prevención contra
Catástrofes en Países de Clima Tropical.

Publicación electrónica con ISBN 978-959-7196.

CONSOLIDACIÓN DE CELULOSA CON UN NUEVO MÉTODO ENZIMÁTICO ESTUDIOS PRELIMINARES

Alicia de Lera Santin¹, Maria Teresa Escohotado Ibor², Loïc Blum³ y
Christophe Marquette³

¹ Universidad del País Vasco. Facultad de Bellas Artes. Departamento de Pintura – Restauración. Campus de Leioa, Bº Sarriena, s/n 48940 Leioa (Vizcaya). España. Teléfono: (0034) 687 42 1234. E-mail: alilera_10@hotmail.com, Adelera001@ikasle.ehu.es

² Universidad del País Vasco. Facultad de Bellas Artes. Departamento de Pintura – Restauración. Campus de Leioa, Bº Sarriena, s/n 48940 Leioa (Vizcaya). España. Teléfono: (0034) 680 27 70 34. E-mail: mtescohotado@hotmail.com, Web: www.ehu.es/bellasartes

³ Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire. UMR 5246: Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire, CNRS-Université Lyon 1. Bât CPE, 43, bd du 11 novembre 1918 - 69622 Villeurbanne (France)
E-mail : Loic.Blum@univ-lyon1.fr, christophe.marquette@univ-lyon1.fr

INTRODUCTION

La utilización de enzimas en restauración surgió en los años setenta cuando Wendelbo & Fosse¹ aplicaron por primera vez un enzima proteolítico sobre diversos manuscritos. Pero habría que esperar hasta la década siguiente para observar un desarrollo en el empleo de hidrolasas para limpiezas y otros tratamientos de obras de arte. Makes, De La Chapelle, Wolbers o Cremonesi^{2-3,4} han sido grandes precursores en el empleo de estas proteínas poliglobulares. Nuestro objetivo principal en la investigación de enzimas, era reducir e incluso eliminar, la toxicidad en algunos procesos de conservación y restauración de obras de arte. Ya que su manipulación sólo puede producir reacciones alérgicas cuando se encuentran en estado liofilizado. Este problema puede ser evitado con el empleo de material adecuado –como guantes, gafas, etc.- De esta manera mejoraríamos la calidad de trabajo de los restauradores, porque, hay un alto riesgo y una clara incidencia de enfermedades cancerígenas y otras de diversa índole, motivadas por productos altamente tóxicos utilizados en conservación y restauración de obras de arte.

Para llevar a buen término nuestro estudio de consolidación de papel mediante enzimas, en primer lugar tuvimos que envejecer artificialmente el papel para después poder tratarlo con el gel enzimático y por último medir los resultados mediante diversos tests.

MATERIALES EXPERIMENTALES Y MÉTODOS

Degradación del papel

Para realizar nuestras pruebas utilizamos dos clases de papel.

Por una parte, escogimos un papel blanco de fotocopiar de 80g.m² de la marca Claire-Fontaine, que foto-degradamos⁵⁻⁶⁻⁷ de tres maneras diferentes con una máquina de fotodegradación (Bio-Link-BLX-E254), por medio de rayos ultravioletas (UV):

- 1- Degradación a seco del papel con 599 julios de rayos UV.

- 2- Degradación del papel con un catalizador TiO_2 en agua más 599 julios de UV.
- 3- Degradación del papel mediante la sumersión en agua desionizada y 599 julios de UV.

Por otro lado, empleamos un papel de aproximadamente cincuenta años que no posea ningún tipo de valor histórico, artístico o sentimental.

Degradación química:

Para comprender lo que sucede químicamente en el papel, debemos tener en mente las siguientes reacciones químicas⁸⁻⁹ que se producen en la celulosa:

Fig. 1 Formación de ácidos carboxílicos (-COOH)

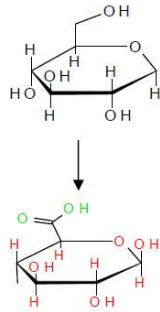


Fig. 2 Formación de dobles enlaces (-C=O)

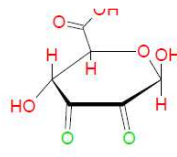


Fig. 3 Rotura del anillo y formación de nuevos grupos de ácidos carboxílicos

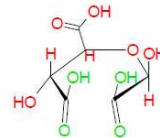
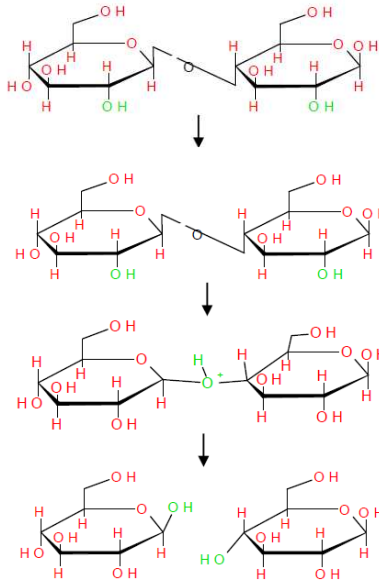


Fig.4 Rotura mediante hidrólisis de las uniones $\beta(1-4)$ glucosídicas entre las unidades de β -D- ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), catalizadas por medio de iones hidrógeno:



Método enzimático para reparar el papel

En un principio partíamos de la idea de encontrar un sistema enzimático para consolidar materiales celulósicos como tejidos o papel. Para ello nos basamos en un artículo de KOBAYASHI S. & SHODA S.¹⁰⁻¹¹ donde la celulosa era sintetizada in Vitro.

Escogimos para empezar el papel blanco de fotocopiar por ser un material más o menos simple constituido por largas cadenas de celulosa unidas entre sí por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

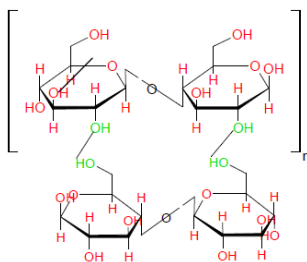


Fig. 5. Unión entre diferentes cadenas de celulosa

En un principio ensayábamos con papeles de un tamaño aproximado de 1x1cm, aunque posteriormente variamos las dimensiones a 15x15cm o más grande, según nuestras necesidades.

Solución enzimática

Cuando comenzamos a experimentar, utilizábamos una solución enzimática aproximadamente parecida a la indicada en el artículo, de quince minutos a dos horas:

- 400µl acetonitrile
- 100µl acetate buffer 0,05M pH 5,
- 25µl cellulase¹² (from *Trichoderma viride*) 5mg/ml with acetate buffer pH 5
- 25µl de glucose-1-phosphate 0,1M with acetate buffer pH5 or β-cellobiosyl fluoride 0,1M in deionized water.

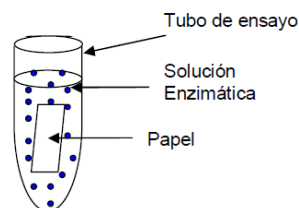


Fig.6. Primeros ensayos de tratamiento con la solución.

Sorprendentemente, las celulasas son enzimas hidrolasas que hidrolizan la celulosa; pero éstas, en contacto con el acetonitrilo actúan a la inversa de su naturaleza, y en vez de romper las uniones β (1-4)glucosídicas, ayudan a formarlas.

Pero la aplicación de la solución enzimática directamente sobre el papel era muy agresivo para éste, y podía incluso degradarlo, debido principalmente a su inmersión prolongada en la solución enzimática y a los múltiples lavados posteriores con tampones.

Gel enzimático

La solución enzimática no satisfacía nuestros objetivos porque era tóxica y a veces agresiva con el papel. Esto último dependía mucho de las fluctuaciones de la temperatura y de la humedad relativa del laboratorio durante el tratamiento, provocando variaciones en la actividad enzimática. Por estas razones fue planteada la utilización de la solución enzimática en gel¹³; de esta manera reducíamos la evaporación del solvente, las excesivas variaciones de humedad y temperatura, y controlábamos la actividad enzimática.

En restauración se emplean varios tipos de geles, como la metilcelulosa, carboximetilcelulosa, agarosio... usados sobre todo en limpiezas de obras de arte¹⁴. Nos decantamos por el uso del agar-agar¹⁵⁻¹⁶ que es un polisacárido extraído de las algas rojas, *Agarophytas*, porque desconocíamos las posibles reacciones que podían producirse entre la metilcelulosa y las celulasas.

Preparación del gel

- En primer lugar, es preparado el gel de agar-agar al 1% en tampón acetato – esta proporción permite el desplazamiento de los enzimas en el gel-.
- Posteriormente el contenedor es calentado al baño maría hasta alcanzar más o menos 80° C –temperatura en la que se disuelve el gel-.
- A continuación el gel es enfriado hasta unos 35-30° C para poder añadir la solución enzimática con las mismas proporciones anteriormente mencionadas –una temperatura superior desnaturalizaría el enzima, y una temperatura inferior impediría la mezcla homogénea con la solución porque el gel empieza a gelificar-. En pruebas posteriores cambiamos el solvente acetonitrilo –por ser muy tóxico- con el etanol.
- Para llevar a buen término la mezcla homogénea entre el gel y la solución, es necesario el empleo de un agitador magnético mientras añadimos la solución al gel, y su mezcla no sea completamente homogénea.
- Por último, será depositado el gel enzimático en un contenedor con la forma y formato deseados, y se dejará reposar durante varias horas hasta su completa gelificación.

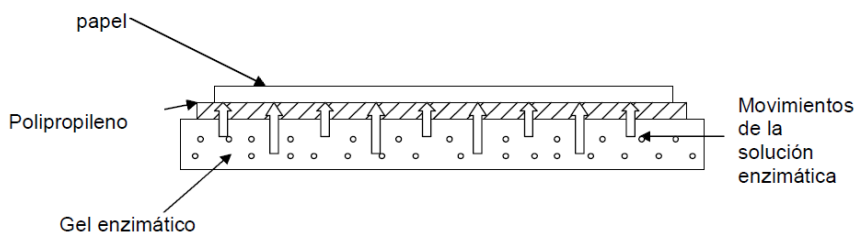


Fig.7. Estructura del tratamiento con el gel.

Eliminación de residuos de gel

Tras el empleo del gel enzimático es posible que permanezcan residuos de gel en el papel si se ponen directamente en contacto. Para evitar esto, empleamos polipropileno no tejido: impide el contacto directo del papel con el gel y a su vez permite la llegada de la solución enzimática al papel. Por otra parte también se puede emplear el enzima agarasa para la eliminación de posibles residuos¹³.

Eliminación de celulosas

Estudios¹⁷⁻⁸ han demostrado que sólo dos lavados son suficientes para eliminar el 99% de los enzimas presentes en el papel. Pero debido a la naturaleza de hidrolasas de los enzimas empleadas, era de suma importancia evitar el lavado con agua en los primeros lavados para no reactivar las celulosas como hidrolasas.

Por lo tanto, para desnaturalizar¹⁸ y eliminar las celulosas optamos por empapar papel secante¹⁹ con el mismo solvente y tampón (4:1) usados en la solución enzimática durante 5-10min, y renovar la solución cada 10-15min. También es posible el uso del etanol²⁰ de la misma manera, en vez del solvente y el tampón. Una vez realizada la operación varias veces, podemos realizar los lavados con las substancias que deseemos como el agua ya que el enzima está ya desnaturalizado.

Para estas pruebas comparamos tres tipos de lavados para averiguar cuál era el adecuado. El primero sería leve, prácticamente sin lavar. El segundo medio, sólo con los lavados del papel secante y el tercero, intensivo. Fueron realizados múltiples lavados con el papel secante y posteriormente con agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

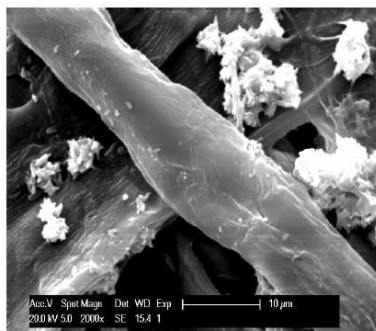
Para averiguar si nuestro método daba buenos resultados, nos planteamos diferentes análisis para verificar que el papel había sido consolidado después del tratamiento enzimático.

En primer lugar desarrollamos una técnica enzimática para conocer el estado de degradación del papel (pero que no vamos a hablar por falta de tiempo), en segundo lugar realizamos fotografías de microscopía electrónica de barrido y por último test mecánicos.

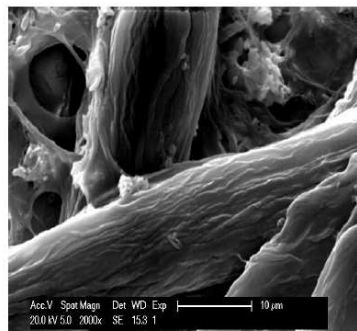
Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Optamos por emplear el "scanning electron microscope" (SEM)²³ trabajando a 20 kV (Philips XL 20) para obtener la imagen de la topografía de las muestras de papel. Preparamos los fragmentos de papel pegándolos con carbono a un soporte metálico y los recubrimos con oro para hacerlos conductores.

Fibras antes del tratamiento

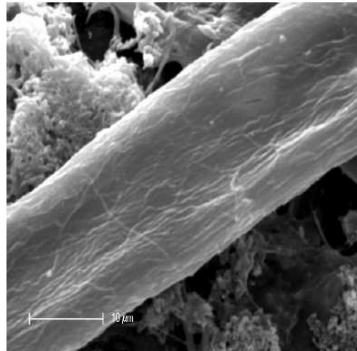


8- Fibra antes de envejecer

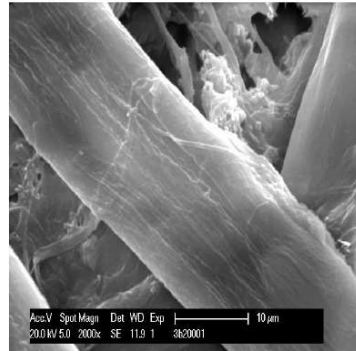


9- Fibra envejecida con 299,97 joules UV y agua

Tratamiento con el gel enzimático

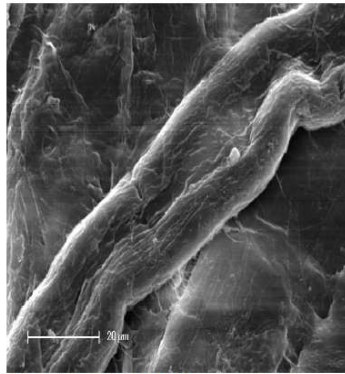


10- Fibra tratada durante dos horas con el gel enzimático con etanol.

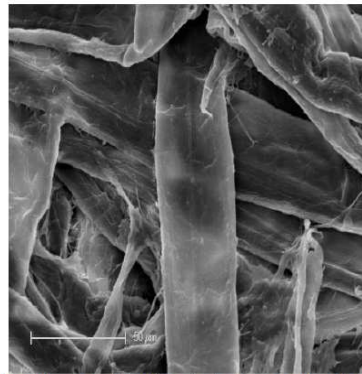


11 – Fibra tratada durante dos horas con el gel enzimático con acetonitrilo

Papel de 50 años



12- Fotografía del microscopio electrónico (SEM) antes del tratamiento



13- Fibra de 50 años tratada con el gel enzimático

Test mecánicos

Para los test mecánicos empleamos la máquina "ADAMEL Lhomargy" de "ISA division d'instruments S.A.", modelo D.Y. 20. Esta máquina mide tanto la energía de rotura en decaNewtons (daN) como el alargamiento en milímetros (mm).

Cada papel tratado fue cortado en tiras de una anchura de 1,5cm, y una largura de 18cm.

Para tener unos resultados fiables, necesitamos como mínimo diez tiras de cada papel en sentido longitudinal y otras diez en sentido transversal.

Los gráficos siguientes son medias de los resultados obtenidos:

Pruebas mecánicas de energía de rotura de las muestras de papel

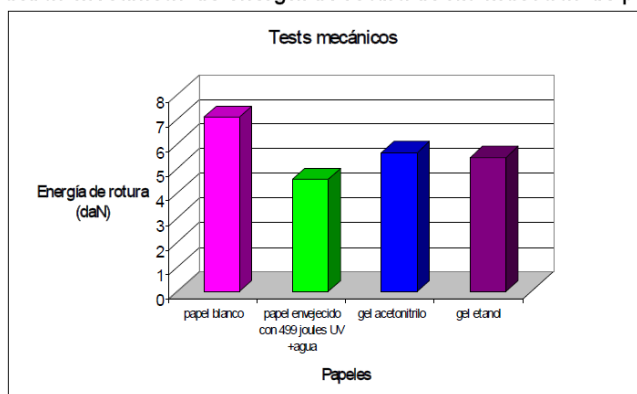


Gráfico 1. Media del conjunto de resultados de papeles tratados, donde el sentido de corte era longitudinal. El gel acetónitrilo o etanol quiere decir que el gel está mezclado con una solución enzimática que contiene acetónitrilo o etanol.

Pruebas mecánicas de alargamiento de las muestras de papel

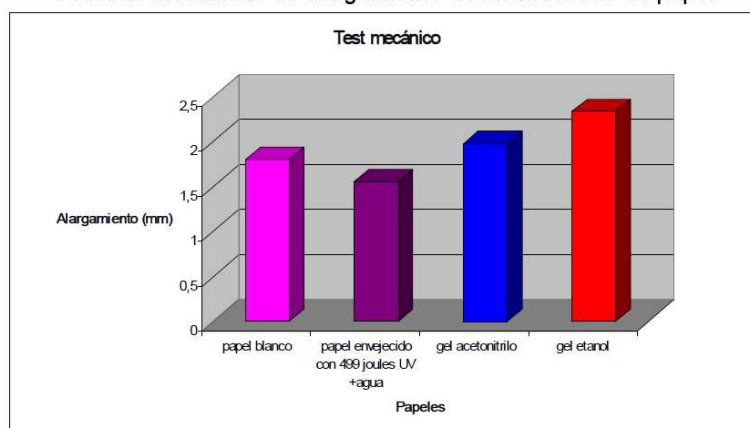
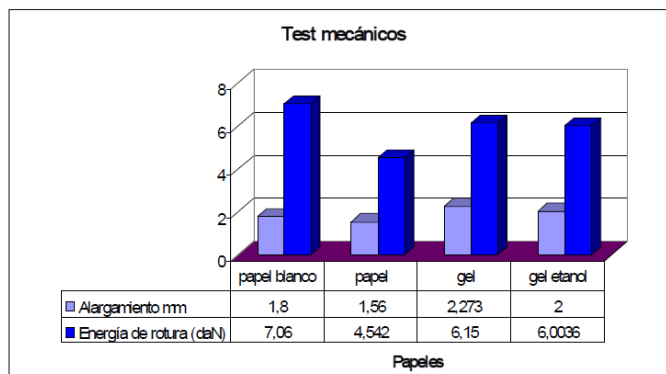


Gráfico 2. Media del conjunto de resultados de papel tratado donde el sentido de corte era longitudinal.

Los resultados obtenidos demuestran que el papel ha sido consolidado, ya que existe una mejoría de la resistencia del papel a la rotura. La energía necesaria para romper los papeles tratados es mayor que la muestra degradada con ultravioletas y agua.

Por otro lado, el alargamiento de las fibras tratadas es muy superior a las degradadas y las que no han sido manipuladas.

El siguiente gráfico es una media de todos los resultados obtenidos para los papeles degradados a seco. Para esta media empleamos la media final de los resultados de diez papeles tratados con geles enzimáticos.



Los resultados obtenidos vuelven a demostrar que el estado del papel tratado enzimáticamente mejora. Es obvio que el gel enzimático con acetonitrilo tiene mayor efecto sobre las fibras que el gel con etanol, pero éste es menos tóxico y respetuoso con el papel, el medio ambiente y el restaurador.

Resultados generales según los lavados:

Tabla 1. Resultados generales de los test mecánicos de fuerza de rotura y alargamiento, de los papeles envejecidos con UV. El corte de los papeles es longitudinal.

GEL	LAVADO	daN	mm
ACETONITRILLO	SIN	5,998	2,06
ETANOL	SIN	5,62	2,04
ACETONITRILLO	MEDIO	6,81	2,48
ETANOL	MEDIO	6,56	2,16
ACETONITRILLO	INTENSIVO	6,28	2,56
ETANOL	INTENSIVO	6,402	2

Los resultados de la tabla 1 demuestran que las uniones de las fibras del papel sin lavar no han sido tan reparadas como las de los papeles lavados de manera intensiva o media. Esto puede ser explicado porque los enzimas una vez que el solvente es evaporado, trabajan como hidrolasas. Por lo que es muy importante desnaturalizar los enzimas para que no sigan actuando. Por otra parte los papeles que son lavados intensivamente también tienen peores resultados que los lavados ligeramente. La causa de esto es que todos los lavados acuosos afectan a las propiedades físicas y mecánicas de los papeles.

CONCLUSIONES

En todas las pruebas realizadas a los papeles tratados con el gel enzimático, hemos comprobado que existe una mejora química, física y mecánica, demostrando que las celulasas en presencia de un solvente como puede ser el acetonitrilo o el etanol, reaccionan a la inversa de su naturaleza, ayudando a reconstruir las uniones rotas de la celulosa. Pero a pesar de este éxito, este tratamiento debe ser realizado con la máxima cautela posible y el mayor respeto hacia la obra. Antes de emplearlo serán realizadas las oportunas pruebas para averiguar si es compatible el tratamiento con los materiales (pigmentos, colorantes...) componentes de la obra.

Por supuesto esta investigación es un paso preliminar para nuestra búsqueda hacia una restauración respetuosa con el restaurador, el medio ambiente y la obra de arte. Aún nos faltan por realizar muchas otras pruebas científicas, con otro tipo de soportes celulósicos, con y sin técnicas pictóricas sobre éstos. De todos modos no descartamos la idea de encontrar otro tipo de enzima que no necesite la utilización de un solvente y que a ser posible, no sea una hidrolasa para evitar cualquier tipo de riesgo innecesario; porque el problema de las celulasas es que son hidrolasas, y en manos de restauradores inexpertos puede provocar desagradables desperfectos.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me han ayudado y han creído en mí desde un principio y a la beca de la Caixa que ha financiado este estudio. Especialmente Pascal Perriat por enseñarme a utilizar el microscopio electrónico, a Juan Carlos Villar del INIA quien me ofreció sus instalaciones para realizar los test mecánicos y a José Luiz Pedersoli del IICROM que me dio múltiples consejos para llevar a buen término mis pruebas, y por último a todos mis compañeros. Gracias a todos.

Bibliografía

1. Wendelbo, O., Fosse, B.: *Protein "Surgey" A Restoring Procedure Applied on Paper*. Restaurator press Vol. 1, (1970): 245-248.
2. Belluci, R., Cremonesi, P.: *L'uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti* Ed. Kermes: arte e tecnica del restauro: Fiesole, Firenze, Italia, vol. 7, n. 21, (1994): 45-64.
3. Bellucci, R., Cremonesi, P., Pignagnoli, G.: *A preliminary note on the use of enzymes in conservation: the removal of aged acrylic resin coatings with lipase*. Studies in conservation. Vol. 44 (1999): 278-281.
4. Cremonesi, P.: *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*. ed. Il prato, Padova, 2002
5. Campanella, L., Battilotti, M., Costanza, C.: *Studies on simulated ageing of paper by photochemical degradation* Annali di Chimica 95,(2005):.727-740.
6. Campanella, L., Battilotti, M., Costanza, C.: *Degradazione fotochimica della cellulosa della carta*, Ambiente, Risorse e Salute, n.99, Anno XXIII, (settembre-ottobre 2004): 6-12.
7. Campanella, L., Costanza, C. Tomassetti, M.: *Trattamento della carta con antiossidanti* La chimica e l'industria, n.10 anno 87, (diciembre '05): 84-89.
8. Banik, G., Cremonesi, P., De La Chapelle, A., Montalbano, A.: *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo* Il Prato, Padova, 2003.
9. Van der Reyden, D.: *Recent scientific reserach in paper conservation*. JAIC 31 (1992): 117-138.
10. Kobayashi, S., Shoda, S.: *Chemical síntesis of cellulose and cello-oligomers using a hydrolysis enzyme as a catalyst* Int. J. Biol. Macromol. Volume 17 number 6 (1995): 373-379.
11. Shoda, S., Kohri M., Kobayashi.: *Glycosidase-catalyzed synthesis of oligosaccharides through intermediate analogue substrates*. Chemistry and Biology Reserch Singpost Kerala, India, 2005.
12. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/C9422>

13. Valentin, N. Et al. *Analyses of deteriorated Spanish glass windows: cleaning methods using gel systems* Triennial meeting (11th), Edinburgh, 1-6 September 1996 ICOM. Committee for Conservation. Paris, France.(1996): 851-856.
14. Butazzoni, N., Casoli, A., Cremonesi, P., Rossi, P.: *Preparazione e utilizzo di gel enzimatici, reagenti per la pulitura di opere policrome*. Progetto restauro, Anno 7, N. 16 (2000) 11-19.
15. Cona, T.: *Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar*. Revista chilena infectol., vol.19 supl.2, (2002): 77-81.
16. Honrie: *Materials for conservation, organic consolidants adhesives and coatings* ed. Butterworth, Bodmin 1987
17. Andrews, T.: *An investigation into the removal of enzymes from paper following conservation treatment*. Journal of the American institute of conservation, vol 31 (1992): 312-323.
18. Helmward Zollner *Handbook of Enzyme Inhibitors*. ed. VCH, Weinheim (Germany), 1990.
19. Carr D., Niven B., Campbell L.: *Effect of selected aqueous treatments on the properties of two papers* Studies in Coconservation Vol.51 (2006): 189-198.
20. Bacilkova B.: *Study on the Effect of Butanol Vapours and other Alcohols on Fungi* Restaurator Vol.27 (2006): 186-199.
21. Haddour, N., Cosnier, S., Gondran, C.: *Electrogeneration of Poly(pyrrole)-NTA Chelator Film for a Reversible Oriented Immobilization of Histidine- Tagged Proteins* JACS january 20, 2005.
22. Campanella, L., Antonelli, A., Favero, G., Tomassetti, M.: *New archeometric method for wood based on an enzymatic biosensor*. L'Actualité Chimique (October 2001): 14- 20.
23. http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_electr%C3%B3nico_de_barrido

Anexo IV

Autores: Alicia de Lera Santín, María Teresa Escohotado Ibor, Loïc Blum y
Christophe Marquette.

Título: “Método experimental para consolidar fibras de papel (I parte del
estudio)”

Tipo de publicación: artículo

Nombre de la publicación: Ge-conservación nº1

Año: 2009

Páginas: 177-188.

Método experimental para consolidar fibras de papel (I parte del estudio)

Alicia de Lera Santin, María Teresa. Escohotado Ibor, L. J. Blum y C. A. Marquette

Resumen: En este artículo describimos un nuevo método enzimático para consolidar la celulosa del papel. Este método aplicado directamente sobre el papel, consiste en la síntesis de la celulosa con una enzima hidrolítica: la celulasa. Ésta actúa como una sintetasa, consolidando el papel envejecido de forma natural o artificialmente, cuando es mezclada en una solución disolvente orgánico en un tampón en la relación (4:1) en presencia de un sustrato (β -celobiosa fluorada). Para mejorar el tratamiento añadimos un gel de agar-agar con todos los reactivos necesarios.

Para observar el estado de las fibras antes y después del tratamiento, realizamos test mecánicos y fotografías de microscopía electrónica de barrido. Se observó que el proceso de consolidación casi consigue recuperar el estado físico inicial de las fibras así como su resistencia al desgarre y alargamiento.

Palabras Clave: Consolidación, celulosa, enzima, celulasa, agar-agar.

Abstract: In this article we described a new enzymatic method to consolidate paper cellulose. The method involves the synthesis of cellulose, directly within the paper material, by the hydrolase enzyme: cellulase. The enzyme, used in a mixed solution of organic solvent/buffer (4:1) and in the presence of a specially designed substrate (β -cellobiosyl fluoride), acts as a synthetase and enabled the consolidation of both naturally and simulated aged papers. A special gel-like preparation based on agar polymer and including all the necessary reagents was used to easily perform the paper treatment.

Scanning electron microscopy and mechanical testing studies show that the aged papers exhibited heterogeneous and cracked cellulose fibres together with low mechanical resistance. It was also shown that the consolidation process led to the recovery of smooth and un-cracked cellulose fibres with resistance to tearing and lengthening close to the initial ones.

Keywords: Consolidation, cellulose, enzyme, cellulase, agar-agar.

Resumo: Neste artigo descrevemos um novo método enzimático para consolidar a celulose do papel. Este método consiste na síntese da celulose com uma enzima hidrolítica: a celulasa. Esta actua como uma sintetasa, consolidando o papel quando é misturada numa solução orgânica de solvente/tampão (4:1) em presença dum substrato (β -cellobiosyl fluoride). Para melhorar o tratamento acrescentamos um gel de agar-agar com todos os reactivos necessários.

Para observar o estado das fibras antes e depois do tratamento, realizamos test mecânicos e fotografias de microscopia electrónica de varrido. Observou-se que o processo de consolidação quase se consegue recuperar o estado físico inicial das fibras assim como a sua resistência ao desgarre e alargamento.

Palavras-chave: Consolidação, celulose, enzima, celulasa, agar-agar.

Introducción

En muchos procesos de conservación y restauración de obras de arte, los restauradores suelen emplear productos tóxicos, alérgicos e incluso cancerígenos (principalmente disolventes volátiles). Algunos de estos tratamientos químicos con disolventes podrían ser remplazados por una química más "verde", mediante el uso de enzimas específicas previamente seleccionadas.

Método experimental para consolidar fibras de papel. (I parte del estudio)

La utilización de enzimas en restauración surgió en los años sesenta cuando Sheridan, aplicó la tripsina para eliminar adhesivos proteicos (Sheridan 1962). Pero habría que esperar dos décadas para observar un desarrollo en el empleo de hidrolasas para limpiezas y otros tratamientos de obras de arte. Los siguientes investigadores Wendelbo y Fosse (Wendelbo y Fosse 1970), Makes (Makes 1979; Makes 1982; Makes 1988), Segal y Cooper (Segal y Cooper 1977; Cooper *et al.* 1980), Wolbers (Wolbers 2000a; Wolbers 2000b), De La Chapelle y Banik (Banik *et al.* 2003), Cremonesi y Belluci (Belluci y Cremonesi 1994; Belluci *et al.* 1999; Cremonesi 2002) han sido grandes precursores del uso de enzimas, inspirando a muchos restauradores e investigadores en el empleo de este tipo de proteínas. La mayoría de estos estudios están centrados en la eliminación de adhesivos, proteínas, almidones y triglicéridos (Wolbers 2000a; Grattan *et al.* 1987).

Nuestra investigación se centró en la consolidación de la celulosa en soportes de papel [Figura 1-a)] mediante una reacción catalizada por enzimas. Las degradaciones que se producen en el papel son debidas principalmente a la oxidación y a la hidrólisis de la estructura polimérica de la celulosa (Fig. 1-b, c). Los principales problemas para la integridad mecánica del papel son la hidrólisis ácida (Banik *et al.* 2003; Van der Reyden 1992) [Figura 1-b)], que provoca la ruptura de las cadenas de este polisacárido. Algunos de los fragmentos producidos se van perdiendo y provocan una pérdida de sus propiedades mecánicas.

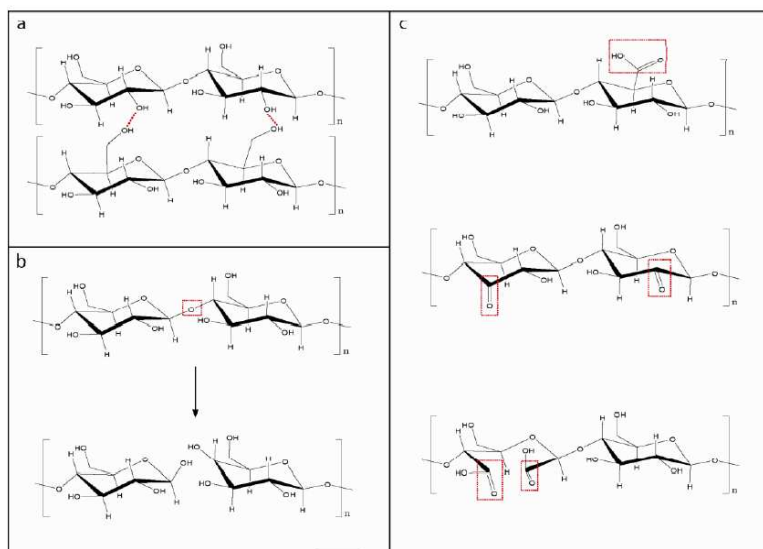


Figura 1. a) Estructura de los polímeros de homosacáridos y puentes de hidrogeno (en rojo) de las fibras de celulosa, b) hidrólisis ácida que se produce durante el envejecimiento de las fibras de celulosa y c) posible reacción de oxidación de las fibras de celulosa.

Normalmente para reforzar los papeles degradados se utiliza el gel de metilcelulosa o de sal sódica de carboximetilcelulosa cuando los papeles aún conservan su resistencia mecánica y/o la laminación con diferentes técnicas cuando el papel está muy degradado y no es posible aplicar otros tratamientos.

A. de Lera Santin, M. T. Escohotado Ibor, L. J. Blum y Ch.A. Marquette

El planteamiento adoptado en este estudio está basado en los trabajos realizados por Kobayashi *et al.* (Kobayashi y Shoda 1995; Shoda *et al.* 1994) sobre la síntesis *in vitro* de la celulosa usando celulasas, enzimas hidrolíticas, en unas condiciones específicas con un disolvente orgánico: el acetonitrilo. El proceso presentado por Kobayashi *et al.*, consiste en desplazar el equilibrio de la reacción producida por la celulosa hacia la síntesis (y no la lisis) de la celulosa, consiguiendo la solubilización de ciertos sustratos de la reacción en acetonitrilo y utilizando un sustrato de síntesis por el cual la enzima tiene una mejor afinidad que por la celulosa y sin el cual, no sería factible esta reacción. De esta manera, la enzima trabaja a la inversa.

En el presente estudio, fue desarrollada la misma reacción para llevar a cabo *in situ* la re-síntesis de la celulosa en los documentos envejecidos (de forma natural o aceleradamente). En primer lugar el papel fue introducido en una solución con la celulosa. Posteriormente, tras constatar la eficacia del tratamiento, se desarrolló una técnica con un gel de agar para disminuir la agresividad del tratamiento en los soportes celulósicos y controlar más fácilmente los factores externos de temperatura y humedad relativa que influyen directamente en el éxito del tratamiento. Para comprobar el efecto del tratamiento aplicado, el papel fue sometido a ensayos mecánicos y las fibras fueron observadas por microscopía electrónica de barrido.

Materiales y métodos

Materiales

Celulasa (EC 3.2.1.4. de *Trichoderma viride*) de Sigma.
 β - celobiosa fluorada (Shoda *et al.* 1994) sintetizada por Dr. J. Schulz (Ezus-Lyon 1).
 Acetonitrilo EC200-835-2 SIGMA
 Acetato de sodio 27 652.298 PROLABO
 Agar: Bacto Agar 20g.l⁻¹ BD ref. 214010

Papeles envejecidos de forma natural y aceleradamente.

En nuestra primera fase de investigación fotodegradamos (Campanella *et al.* 2005) papel blanco A4 de 80g.m⁻² (Claire-Fontaine, adquirido en Francia y Extra Strong, comprado en Italia). El papel era cortado en fragmentos de 15cmx20cm y posteriormente envejecidos según las normas UNE 57092-1:2002 Papel y cartón. Envejecimiento acelerado. Parte 1: Tratamiento con calor seco a 105° C y UNE 57092-1:1991 UNE 57092-4:2002 Papel y cartón. Envejecimiento acelerado. Parte 4: Tratamiento con calor húmedo a 80° C y 65% de humedad relativa en una cámara CTS modelo c-20/350/S. También envejecimos el papel exponiéndolo a luz ultravioleta (UV) (con una longitud de onda de 254nm) a una radiación de 399J.cm⁻² en una cámara Bio-Link-BLX-E254 con una humedad relativa del 65%. Para conseguir esta humedad relativa dejábamos dentro de la cámara un recipiente con agua destilada que evaporaba con el calor de las lámparas. Para controlarla, fueron realizadas varias medidas antes, durante y después de la utilización de la cámara con un termómetro higrómetro Humlog 10 (marca E+E).

También fue empleado un papel de un libro sin ningún tipo de valor histórico, artístico o sentimental que había envejecido de forma natural y tenía aproximadamente 50 años

Solución enzimática y protocolo para consolidar papel (primeras pruebas)

Para las primeras pruebas cortamos los papeles envejecidos artificialmente en fragmentos de 1 cm² y luego los tratamos con una solución compuesta por 400µl de acetonitrilo, 100µl de tampón

Método experimental para consolidar fibras de papel. (I parte del estudio)

acetato 0.05 M (pH 5.5) y una concentración de $0.25\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de enzima celulasa y 5mM de β -celobiosa fluorada.

Las porciones de papel eran sumergidas en la solución enzimática reparadora y permanecían allí durante dos horas a temperatura ambiente [Figura 2-a]. Posteriormente, los fragmentos de papel fueron lavados dos veces con $400\mu\text{l}$ de acetonitrilo y $100\mu\text{l}$ de tampón acetato 0.05M pH 5.5 durante 15 minutos. Estos lavados son necesarios para inhibir y eliminar cualquier resto de enzima hidrolítica que pueda hidrolizar la celulosa, una vez que el disolvente y tampón han evaporado.

Gel enzimático y protocolo para la consolidación de papel

Se preparó un gel de agar para su uso como soporte del enzima y su sustrato. Su concentración fue al 1% (m/v) preparado en el mismo tampón acetato indicado anteriormente, (1g de agar en 100ml de tampón acetato). Esta concentración de agar fue escogida para permitir la libre difusión de la enzima a través del gel. La preparación del gel consistía en un calentamiento inicial del agar con el tampón al baño maría a una temperatura de $80\text{-}90^{\circ}\text{C}$ para disolver completamente el polímero; después lo dejábamos enfriar hasta $35\text{-}36^{\circ}\text{C}$ sin que gelificase, para poder mezclar la solución enzimática sin que ésta perdiese su actividad enzimática a causa de una temperatura excesiva que desnaturalizase las enzimas.

La celulasa (0.75ml preparada en el tampón acetato) y su sustrato (0.75ml en H_2O) fueron añadidos a 15ml de acetonitrilo/tampón acetato (4:1) y posteriormente, mezclados con 30ml de gel ya preparado para alcanzar la concentración descrita anteriormente: $0.25\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 5mM , respectivamente. En pruebas sucesivas fue sustituido el disolvente acetonitrilo por etanol para disminuir la toxicidad del gel. Las proporciones de todos los componentes de la solución enzimáticas fueron exactamente las mismas que para el gel con acetonitrilo. Para evitar posibles restos de gel sobre el papel y una posible proliferación de hongos, interponíamos un tejido no tejido (Reemay) entre el gel y el papel mientras la solución enzimática penetraba en el papel [Figura 2-b].

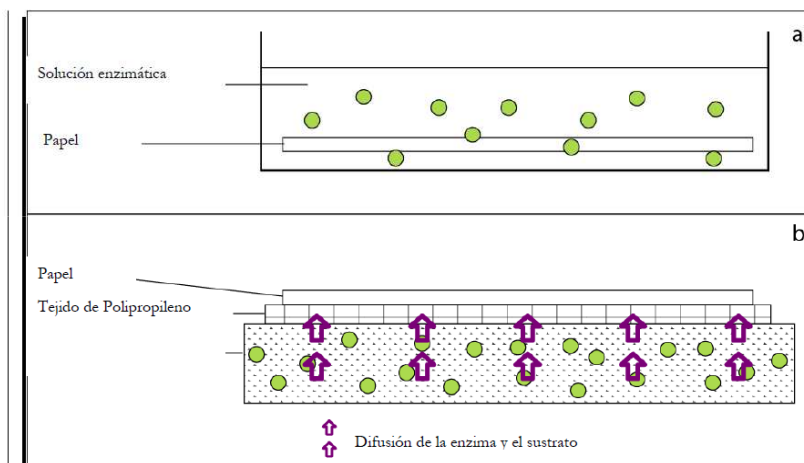


Figura 2. Representación esquemática de la consolidación usando a) una solución enzimática b) un gel enzimático.

A. de Lera Santin, M. T. Escolotado Ibor, L. J. Blum y Ch.A. Marquette

Los fragmentos de aproximadamente 1cm^2 fueron tratados con el gel enzimático durante dos horas y posteriormente depositados sobre papeles secantes embebidos con acetonitrilo/tampón acetato (4:1) durante 10 minutos para lavar y eliminar la enzima hidrolítica. Para inhibir posibles restos de enzima se lavó el papel con una mezcla de etanol al 1% en agua destilada durante 5 minutos.

Para realizar los ensayos mecánicos, se necesitaron trozos más grandes de papel de 300cm^2 ($15\text{cm} \times 20\text{cm}$) que fueron tratados de la misma manera que los pequeños.

Microscopio electrónico de barrido

La superficie de los papeles fue metalizada con oro (15 mA, 90 s) y posteriormente realizamos fotografías con microscopía electrónica de barrido (SEM) a 20 kV (Philips XL 20). El tiempo transcurrido entre el tratamiento y la metalización de las muestras fue más o menos de dos meses. (Esto dependía en muchas ocasiones de la disponibilidad del microscopio).

Resultados y Discusión

La celulosa es un componente presente en muchos documentos antiguos y modernos. Es un homopolisacárido cuya principal cadena está compuesta por la repetición de un mismo disacárido, la celobiosa [Figura 1-a]. Estos biopolímeros atraen la atención de los científicos por su potencial como nuevos biomateriales para la encapsulación de medicamentos. Las dificultades para lograr la síntesis *in vitro* de estos polímeros ha provocado el desarrollo de procedimientos especiales y sustratos enzimáticos (Kobayashi y Shoda 1995; Shoda *et al.* 1994; Schuster *et al.* 1994).

En el presente estudio investigamos el uso de enzimas hidrolíticas, las celulasas, en la síntesis *in vitro* de la celulosa. Esta enzima ha demostrado ser capaz de catalizar la síntesis de los homopolisacáridos cuando es utilizada en una solución compuesta por acetonitrilo/tampón acetato (4:1) en presencia de un sustrato especial β -cellobiosa fluorada [Figura 3]

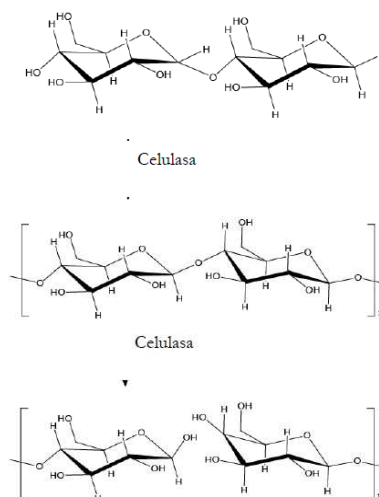


Figura 3. Las dos posibles reacciones que se pueden producir por la catálisis de las celulasas que dependen de la solución utilizada.

Método experimental para consolidar fibras de papel. (I parte del estudio)

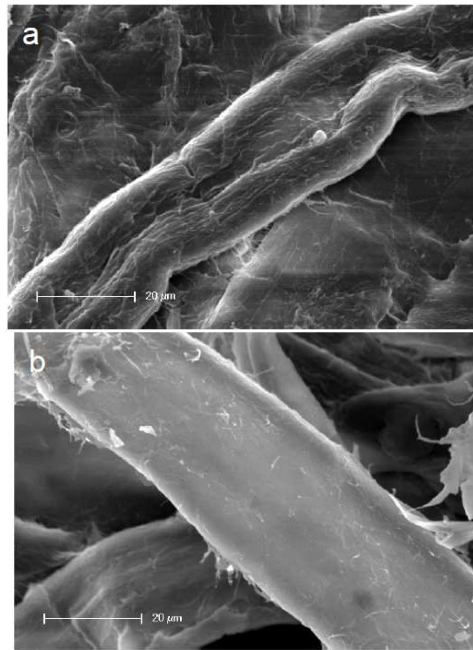


Figura 4. Imágenes de microscopía electrónica de un papel de 50 años (electrones secundarios): a) antes y b) después de la consolidación usando una solución enzimática.

Para observar los efectos de nuestro tratamiento, recurrimos a la microscopía electrónica de barrido (SEM) para ver el papel de 50 años antes y después del tratamiento enzimático de dos horas. La Figura 4-a fue escogida por mostrar en primer plano, la degradación de una fibra de papel envejecida de forma natural; observamos las fibras de celulosa, heterogéneamente resacas y craqueladas. Después del tratamiento enzimático del papel [Figura 4-b], se aprecia una clara mejora de la homogeneidad de las fibras con la eliminación de los craquelados. Por lo tanto nuestro método mejora sensiblemente las características de las fibras de celulosa.

Sin embargo, la aplicación directa de la solución enzimática sobre el papel, era un sistema demasiado agresivo. Por un lado, la inmersión prolongada durante dos horas de la muestra en la solución enzimática y la posterior limpieza con el tampón tenían un efecto negativo en el papel. El tratamiento enzimático comenzaba a perder efecto pasadas esas dos horas de inmersión. Por otro lado, las fluctuaciones de la temperatura del laboratorio provocaban una variación de la actividad enzimática de la solución. De hecho, si no controlamos la evaporación del disolvente orgánico durante el tratamiento, puede producir la hidrólisis de la celulosa (Fig.3) ya que la reacción (hidrólisis o síntesis enzimática) está directamente relacionada con la proporción de acetonitrilo en la solución reparadora. Por lo tanto es de suma importancia la dosificación correcta de los componentes del preparado enzimático para que no se produzca la hidrólisis de la celulosa. La concentración del sustrato es muy importante para la correcta consolidación de la celulosa. Una

A. de Lera Santin, M. T. Escotado Ibor, L. J. Blum y Ch.A. Marquette

cantidad inferior a la indicada provocaría la pérdida de eficacia del tratamiento. Al ser un componente muy caro, en esta investigación se indica la cantidad adecuada para el óptimo efecto del tratamiento.

Para controlar la evaporación de los componentes volátiles, consideramos como opción el empleo de un gel enzimático. En efecto, el uso de una matriz polimérica impide la evaporación excesiva del disolvente, reduce las excesivas variaciones de la humedad, y facilita el manejo y aplicación de la solución enzimática. En restauración, se utilizan varios tipos de geles compatibles con las obras de arte. La metilcelulosa, la carboximetil celulosa de sodio y el agar son algunos de los geles más empleados en limpiezas de obras de arte (Butazzoni *et al.* 2000; Baglioni *et al.* 2009). Optamos por el agar (Horie 1987; Campani *et al.* 2007) un polisacárido extraído de las algas rojas *Agarophytas*, por ser inerte a la acción de la enzima hidrolítica usada.

Para este estudio necesitamos envejecer gran cantidad de papel según las normas UNE anteriormente citadas. Las figuras 5-a y 5-b son imágenes del papel antes y después del envejecimiento acelerado, obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (SEM). Como podemos observar, el tratamiento de envejecimiento acelerado degrada claramente el papel. En el caso del papel de 50 años, existen evidentes craquelados heterogéneos en el papel.

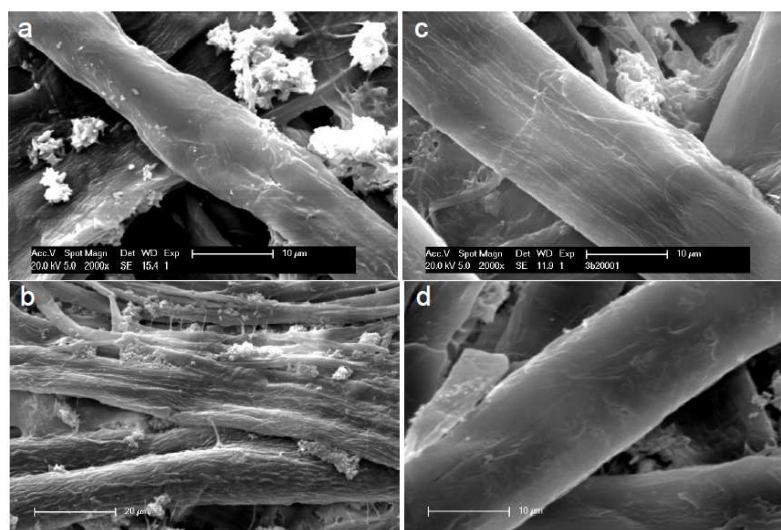


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de barrido del papel blanco de fotocopiador (electrones secundarios): a) antes y b) después del envejecimiento acelerado y antes del tratamiento del gel enzimático c) después del lavado con acetoniitrilo o d) después del lavado con etanol.

Para llevar a cabo el tratamiento del papel con el gel enzimático, se coloca un separador de polietilentereftalato (Reemay) entre el gel y el papel para prevenir que ningún depósito o resto del polímero permaneciese sobre el papel tratado [Figura 2-b]. De esta manera, sólo la solución de

Método experimental para consolidar fibras de papel. (I parte del estudio)

celulosa con su sustrato en un medio de acetonitrilo/tampón acetato (4:1) es capaz de ser difundido en contacto con la muestra.

Como muestra la imagen SEM de la figura 5-c, se obtiene un mejor aspecto del estado de las fibras de celulosa después del tratamiento con el gel de enzimas. Las fibras están más lisas y tienen una superficie homogénea. Se obtuvieron resultados parecidos usando un gel enzimático preparado a base de una solución de etanol/tampón acetato (4:1) que es caracterizado por una baja toxicidad para el restaurador y el medio ambiente, debido a la baja toxicidad del disolvente orgánico utilizado [Figura 5-d]. El gel puede ser aplicado una vez está gelificado, de todos modos hemos comprobado que el empleo del gel obtiene mejores resultados como mínimo una hora y como máximo 18 horas después de su preparación.

Posteriormente realizamos ensayos mecánicos para determinar completamente la consolidación del papel con el tratamiento enzimático. Los test mecánicos realizados, en el equipo D.Y. 20, ISA division d'instruments S.A. y según las normas de ensayo UNE-EN ISO 1924-2, analizaban la resistencia del papel a la rotura (daN) y al alargamiento (mm). Cada muestra se cortaba en tiras de 1,5cm de ancho y 18 cm de largo. Con el fin de obtener resultados fiables, debíamos cortar mínimo 10 tiras en sentido longitudinal y otras 10 en sentido transversal. Los resultados obtenidos se observan en la figura 6. Como se puede ver, la resistencia a la rotura desciende después del envejecimiento y aumenta claramente después del tratamiento enzimático. Por otra parte, el alargamiento de las fibras tratadas es bastante superior al valor obtenido por el papel envejecido. Este resultado revela una vez más que el tratamiento enzimático mejora la integridad de la estructura del papel.

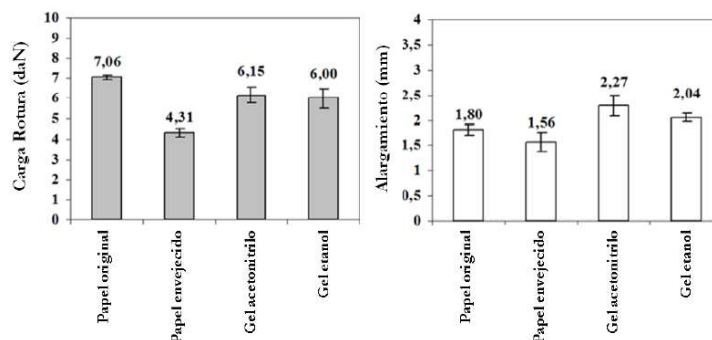


Figura 6. Resultados de los test mecánicos de los papeles blancos de fotocopiar antes y después del envejecimiento acelerado y después de la consolidación utilizando un gel enzimático preparado con acetonitrilo o etanol.

Conclusiones

La consolidación del papel utilizando una reacción enzimática ha sido descrita y los resultados obtenidos han sido buenos. En pruebas realizadas con todos los componentes pero sin enzima los resultados fueron negativos: el papel seguía degradado; por lo tanto, es necesario esta enzima para consolidar el papel. El gel de agar con todos los reactivos necesarios fue utilizado para mejorar el tratamiento del papel. Todos los test realizados para verificar la acción reparadora de los

A. de Lera Santín, M. T. Escohotado Ibor, L. J. Blum y Ch.A. Marquette

tratamientos enzimáticos con el gel, han probado que las fibras de celulosa han mejorado tanto morfológicamente como mecánicamente. Faltan pruebas de envejecimiento en papeles tratados con gel para comprobar su eficacia con el tiempo.

pesar de estos resultados satisfactorios, el tratamiento debe ser usado con la máxima prudencia y el mayor respeto hacia las obras de arte. Siendo necesario antes de cualquier operación, comprobar si el tratamiento es compatible con los componentes de la obra de arte (pigmentos, colorantes, etc.).

Esta investigación preliminar es un primer paso para conseguir una herramienta en restauración que sea respetuosa con el restaurador, la obra de arte y el medio ambiente. Pero aún debemos realizar muchos más test a otro tipo de papeles, con y sin técnicas pictóricas, para observar la interacción de este método con una superficie celulósica pintada.

Agradecimientos

Parte de este trabajo fue subvencionado primero por la beca de La Caixa y posteriormente por la beca predoctoral del Gobierno Vasco concedida a A. De Lera Santín.

Debemos agradecer a Juan Carlos Villar y Nuria Gómez del INIA por dejarnos realizar los test mecánicos, al Prof. P. Perriat por permitirnos efectuar las fotografías con el microscopio electrónico de barrido, así como a José Luiz Pedersoli del ICCROM por su ayuda.

Bibliografía

SHERIDAN J. "Enzymes, as they relate to the conservator of paintings" In *Exposition of painting Conservation, Brooklyn Museum*, 1962.

WENDELBO, O.; FOSSE, B.(1970), "Protein Surgery. A Restoring Procedure Applied on Paper", *Restaurator*, 1: 245-248.

MAKES, F. (1979) *Enzymatic consolidation of paintings*, Goteborg: Department of History of Art and Architecture University of Goteborg

MAKES, F., (1982a) "Enzymatic consolidation of a painting: Seventeenth century landscape from Skokloster Palace", En *Science and technology in the service of conservation. Preprints of the contributions to the Washington congress*, London: International Institute for Conservation, 135-138.

MAKES, F. (1988b) *Enzymatic consolidation of the portrait of Rudolf II as "Vertumnus" by Giuseppe Arcimboldo with a new multi-enzyme preparation isolated from Antarctic Krill (Euphausia superba)*, Göteborg: Acta universitatis gothoburgensis

SEGAL, J., COOPER, D. (1977) "The use of enzyme to release adhesives", *Paper Conservator*, 2: 47-50.

COOPER, D., KING, C., SEGAL, J. (1980) "The use of Enzymes in partially non aqueous media", En *Conservation of Library and Archive Materials and the Graphic Arts: Abstracts and Preprints of the International Conference on the Conservation of Library and Archive Materials and the Graphic Arts*, Cambridge: Institute of Paper Conservation and The society of archivists, 25-30.

BANIK, G.; CREMONESI, P.; DE LA CHAPPELLE, A.; MONTALBANO, A., (2003) *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*. Padova: Il prato.

WOLBERS, R., (2000) *Cleaning painted surfaces: Aqueous methods*. London: Archetype Publication.

Método experimental para consolidar fibras de papel. (I parte del estudio)

WOLBERS, R. C., (2000) *Abstracts of Papers of The American Chemical Society*, 220, U396-U396.

BELLUCI, R.; CREMONESI, P., (1994) "L' uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti". *Kermes, arte e tecnica del restauro*, 26: 45-64.

BELLUCCI, R.; CREMONESI, P.; PIGNAGNOLI, G., (1999) "A preliminary note on the use of enzymes in conservation: the removal of aged acrylic resin coatings, with lipase" *Studies in Conservation*, 44 (4): 278-281.

CREMONESI, P., (2002). *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*. Padova: Il prato

GRATTAN, D.; ST. HILAIRE, J.; BURGESS, H.; MCCAWLEY, J. C., (1987) "The use of enzymes in partially non-aqueous media". En *Conservation of Library and Archives Materials and the Graphic Arts*, London: G. Petherbridge, Butterworths, 15-24.

VAN DER REYDEN, D., (1992) "Recent Scientific Research in Paper Conservation". *Journal of the American Institute for Conservation*, 31 (1): 117-138.

KOBAYASHI, S.; SHODA, S.-i., (1995) "Chemical synthesis of cellulose and cello-oligomers using a hydrolysis enzyme as a catalyst" *International Journal of Biological Macromolecules*, 17 (6): 373-379.

SHODA, S.; KHORI, M.; KOBAYASHI, S., (2005) "Glycosidase-catalyzed synthesis of oligosaccharides through intermediate analogue substrates". En *Biocatalysis : chemistry and biology* Trivandrum: Research Signpost, 83-98

SHODA, S.; OKAMOTO, E.; KIYOSADA, T.; KOBAYASHI, S., (1994) "Synthesis of 6- and/or 6-O-Methylated Cellobiosyl Fluorides: New Monomers for Enzymatic Polymerization". *Macromolecular Rapid Communications*, 15 (10): 751-756.

CAMPANELLA, L.; BATTILOTTI, M.; COSTANZA, C., (2005) "Studies on simulated ageing of paper by photochemical degradation", *Annali di Chimica*, 95 (11-12): 727-740.

SCHUSTER, M.; WANG, P.; PAULSON, J. C.; WONG, C.-H., J. (1994) "Solid-phase chemical-enzymatic synthesis of glycopeptides and oligosaccharides", *Journal of the American Chemical Society*, 116 (3):1135-1136.

BUTAZZONI, N.; CASOLI, A.; CREMONESI, P.; ROSSI, P., (2000) "Preparazione e utilizzo di gel enzimatici, reagenti per la pulitura di opere policrome", *Progetto restauro*, 16: 11-19.

BAGLIONI P., DEI L., CARRETTI E., GIORGI R., (2009) "Gels for the Conservation of Cultural Heritage", *Langmuir*, 25 (15): 8373-8374.

HORIE, C. V., (1987) *Materials for conservation, organic consolidants, adhesives and coatings*. Oxford: Architectural Press.

CAMPANI, E, CASOLI, A., CREMONESI, P., SACCANI, I., SIGNORINI, E., (2007) *L'uso di agarosio e agar per la preparazione di "gel rigidi"* Use of agarose and agar for preparing rigid gels, Saonara : Il prato.

A. de Lera Santin, M. T. Escotado Ibor, L. J. Blum y Ch.A. Marquette



Doctoranda Alicia de Lera Santín
 Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire
 UMR CNRS 5013. Bat. CPE - Université Claude Bernard Lyon 1
 43 Bd. du 11 Nov. 1918. 69622 Villeurbanne Cedex
 Universidad del País Vasco UPV-EHU. Facultad de Bellas Artes
 Campus de Leioa, B° Sarriena, s/n. 48940 Leioa (Vizcaya)
alilera_10@hotmail.com

Licenciada en Bellas Artes (2004), ha obtenido diferentes becas: *La Caixa*, *Real Academia de España en Roma* y *Gobierno Vasco*, permitiéndole desarrollar la tesis que lleva a cabo sobre aplicaciones enzimáticas en Restauración y Conservación de Obras de Arte.



Catedrática María Teresa Escotado Ibor
 Universidad del País Vasco
 Facultad de Bellas Artes
 Campus de Leioa, B° Sarriena, s/n
 48940 Leioa (Vizcaya)
mtescotado@hotmail.com

Catedrática en conservación y restauración de obras de arte del Departamento de pintura de la Facultad de Bellas Artes de la Universidad del País Vasco. Realizó la tesis sobre "Conservación y restauración de arte contemporáneo sobre lienzo". Cuenta con más de 30 años de docencia, numerosos proyectos de investigación I+D, I+D+i, programa Erasmus así como proyectos de innovación educativa.



Dr. Loïc J. Blum
 Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire,
 UMR 5246: Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et
 Supramoléculaire,
 CNRS-Université Lyon 1
 Bât CPE, 43, bd du 11 novembre 1918 - 69622 Villeurbanne (France)
Loic.Blum@univ-lyon1.fr

Received the "Doctorat de spécialité" (1983) in Biochemistry and the "Doctorat d'Etat et Sciences" (1991) from the "Université Lyon 1". He is presently Professor and the head of both "Institut de Chimie" and "Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires" (CNRS-Université Lyon 1).

Método experimental para consolidar fibras de papel. (I parte del estudio)



Dr. Christophe Marquette
Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire,
UMR 5246: Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et
Supramoléculaire,
CNRS-Université Lyon 1
Bât CPE, 43, bd du 11 novembre 1918 - 69622 Villeurbanne
(France)
christophe.marquette@univ-lyon1.fr

Received the "Doctorat de spécialité" in Biochemistry (1999) from the Université Lyon 1. He is presently permanent researcher at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) at the ICBMS and is in charge of the development of optical biochips and micro-arrays.

Anexo V

Autores: Luigi Campanella, Cecilia Costanza, Alicia De Lera.

Título: Riparazione Di Carta Invecchiata Artificialmente E Fotodegrata

Tipo de publicación: comunicación en congreso

Participación en el congreso : AIAr, CONVEGNO NAZIONALE SISTEMI
BIOLOGICI E BENI CULTURALI

Dipartimento Scienze Botaniche, Orto Botanico di Palermo
aula Giuseppe Lanza, via Lincoln n° 2, Palermo,
6-7 Ottobre 2009

Riparazione Di Carta Invecchiata Artificialmente E Fotodegrata

Luigi Campanella, Cecilia Costanza, Alicia De Lera

Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza",
Piazzale Aldo Moro 5, 00185, Roma

luigi.campanella@uniroma1.it cecilia.costanza@uniroma1.it
alilera_10@hotmail.com

RIASSUNTO

Viene proposta un'applicazione non tradizionale di biorestauro riferita a carta degradata.

Carta comune per fotocopie è stata dapprima sottoposta a tre procedimenti diversi di invecchiamento accelerato: trattamento con una soluzione di HCl 0.1 mol/L per 30 minuti, fotodegradazione per 6 ore catalizzata da biossido di titanio in presenza di luce UV a 350 nm (Polilight®); invecchiamento artificiale in un veterometro nelle condizioni di esposizione UV: irradianza 0,6 W/m²/nm, umidità relativa 58 %, T=45°C, $\lambda = 310$ nm per 6 ore. La carta così degradata è stata poi trattata, per 4 ore e per 48 ore, con una sospensione di un'alga, la *Spirulina Subsalsa*, stimolata da una soluzione di Hg(NO₃)₂ 10⁻¹⁰ mol/L a produrre composti sequestranti. L'effetto di riparazione di tali prodotti sulle catene cellulose danneggiate è stato studiato con un fotosensore a biossido di titanio e con un test enzimatico mediante biosensore a glucosio ossidasi. Sono stati così determinati rispettivamente due indici di valutazione: la "permanenza ambientale" e l'attività enzimatica immobilizzata. La sospensione di *Spirulina Subsalsa* determina, sia dopo 4 h sia dopo 48 h, un effetto di risanamento della carta dai processi degradativi della cellulosa, dovuti all'invecchiamento artificiale, con incremento dei valori di persistenza ambientale e con diminuzione dell'attività enzimatica immobilizzata sulla carta trattata rispetto a quella non trattata.

Parole chiave: carta, invecchiamento artificiale, permanenza ambientale, attività enzimatica immobilizzata.

Abstract

An understanding of the aging processes involving cellulosic materials is of considerable interest for planning restoration to repair paper from damages due to ageing and environmental attack. An alga, *Spirulina subsalsa*, after treatment with heavy metal solutions, produces esters able to repair the cellulose chains. An investigation was consequently carried out to study the restoring effect of these products on the damaged cellulose chains of common photocopying paper which had been subjected to three prior procedures of accelerated ageing (treatment with a solution of HCl 0.1 mol/L for 30 minutes in the open air; photodegradation for 6 hours catalyzed by titanium dioxide in the presence of UV light at 350 nm, Polilight®; artificial ageing in weatherometer for 6 hours)

and then treated for a variable time (4 h and 48 h) with a suspension of *Spirulina subsalsa* stimulated to produce sequestering compounds by a solution of $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-10} mol/L. The effect of restoration on the damaged cellulose chains has been studied via the environmental persistence test and via a biosensoristic method, based on immobilization on the paper of glucose oxidase enzyme. The indexes of environmental persistence assessment and of immobilized enzymatic activity of untreated and treated paper samples are determined. The treatment by suspension of *Spirulina* has the effect of restoring damaged cellulose. This protective effect on the paper from cellulose degradation processes, due to artificial aging, is already evident after 4 h and becomes substantial after 24 h, with higher values of environmental persistence for treated paper than for untreated paper.

Key words: paper, artificial ageing, environmental permanence, immobilized enzymatic activity.

Introduzione

Il degrado della carta costituisce il problema principale per quanto riguarda la protezione del "bene" (libri antichi, documenti, etc.), dagli attacchi di agenti esterni di varia natura (ambientali, biologici, chimico-fisici, ecc.) e dall'aggressione di fattori interni al materiale stesso. Un'alga, la *Spirulina Subsalsa*, trattata con soluzioni di metalli pesanti, produce esteri in grado di riparare le catene della cellulosa (Pawlik-Skowrońska, 2004). In questo lavoro è stato quindi studiato l'effetto di riparazione di tali prodotti sulle catene cellulosiche danneggiate di carta comune per fotocopie, dapprima sottoposta a tre procedimenti diversi di invecchiamento accelerato e poi trattata a tempi diversi con la sospensione di *Spirulina Subsalsa* stimolata a produrre composti sequestranti da una soluzione di $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-10} mol/L. Lo studio dell'effetto di riparazione di tali prodotti sulle catene cellulosiche danneggiate è stato effettuato con due metodi:

- 1) fotosensoristico a base di biossido di titanio (Campanella et al. 2004, 2005a, 2005b, 2006);
- 2) biosensoristico con un test enzimatico mediante un biosensore a glucosio ossidasi (Campanella et al. 2001).

Si sono determinati rispettivamente due indici di valutazione di degrado della carta:

- 1) persistenza ambientale;
- 2) capacità di immobilizzazione dell'attività enzimatica.

La permanenza della carta è definita nella norma UNI EN ISO 9706 come la proprietà di rimanere chimicamente e fisicamente stabile per lunghi periodi di tempo, cioè di mantenere le sue caratteristiche senza un deterioramento significativo nelle normali condizioni di conservazione e di uso.

Materiali

Carta comune per fotocopiatrici e stampanti laser: carta bianca per fotoriproduttori In Ufficio Copy blu Codice 13092 - 6IN - Formato cm 21x29,7, A4, di peso base 80 g/m².

Hg(NO₃)₂ (Aldrich).

Campionamento e trattamento della carta con la sospensione di Spirulina Subsalsa

La carta è stata sottoposta a tre procedimenti diversi di invecchiamento accelerato:

- 1) trattamento con una soluzione di HCl 0.1 mol/L per 30 minuti all'aria;
- 2) fotodegradazione per 6 ore catalizzata da biossido di titanio alla presenza di luce UV a 350 nm (Polilight®);
- 3) invecchiamento artificiale in un veterometro nelle condizioni di esposizione UV:

irradianza spettrale 0,6 W/m²/nm, umidità relativa 58 %, T=45°C, λ = 310 nm per 6 ore.

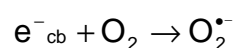
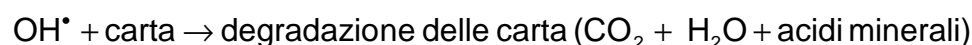
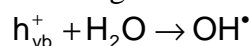
La carta così degradata è stata poi trattata, per 4 ore e per 48 ore, con una sospensione di alga Spirulina Subsalsa stimolata a produrre composti sequestranti da una soluzione di Hg(NO₃)₂ 10⁻¹⁰ mol/L.

Metodi

Fotosensore a biossido di titanio (valutazione della permanenza ambientale)

Il TiO₂ è un catalizzatore della degradazione fotoossidativa di molti composti organici, fotoattivato da UV 350 nm, agisce come fotocatalizzatore della degradazione della carta. Infatti la sua irradiazione UV con un'energia ≥3,2 eV, porta alla promozione di elettroni dalla banda di valenza alla banda di conduzione con conseguente produzione di lacune elettroniche (Hidakaa et al. 1997, Mills et al., 1997, Vamathevan et al. 2002) (3,2 eV) porta alla promozione di elettroni dalla banda di valenza alla banda di conduzione con conseguente produzione di lacune elettroniche in quella e di siti elettronici in questa:

Il meccanismo principale della fotodegradazione consiste nella produzione di radicali, in particolare idrossilici ottenuti dalla ossidazione dell'acqua in corrispondenza delle lacune elettroniche e superossido ottenuti dalla riduzione dell'ossigeno da parte degli elettroni promossi. Questi radicali reagiscono con la carta degradandola ossidativamente.



Durante questo processo il pH diminuisce.

Il TiO₂ può anche fungere da indicatore di pH (Campanella et al. 2004, 2005a, 2005b, 2006).

L'andamento rilevato per queste curve (potenziale del TiO₂ vs tempo di irradiazione) è caratterizzato dapprima da un andamento decrescente e poi quando l'ossidazione della carta procede da un aumento tanto più rapido quanto

più rapido è il processo ossidativo. Un esempio di curva sperimentale è riportato in Figura 1.

La permanenza della carta viene valutata attraverso l'indice di persistenza ambientale P_{amb} (Campanella et al. 2004, 2005a, 2005b, 2006):

$$P_{amb} = \frac{\Delta t}{s_{TiO_2}}$$

Δt = tempo di ritardo

s_{TiO_2} = pendenza della curva potenziale vs tempo di irradiazione del fotosensore a TiO_2

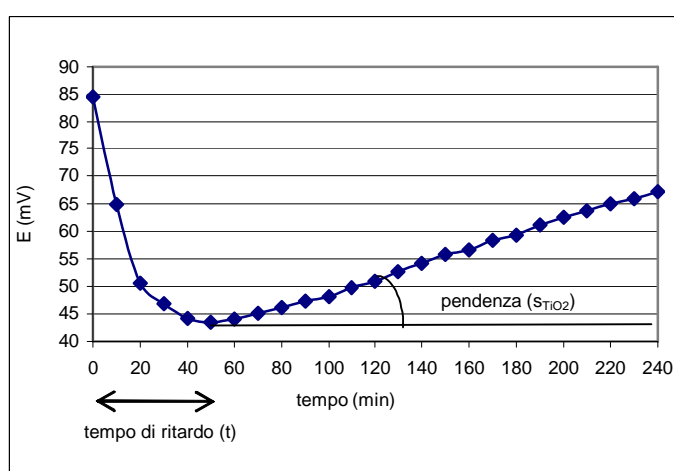


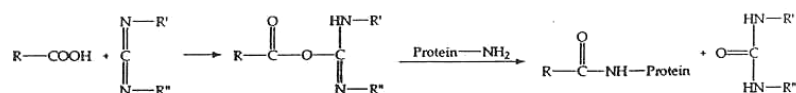
Figura 1: Tipico andamento del potenziale del biossido di titanio in funzione del tempo di irradiazione UV a 350 nm per un composto organico.

Il tempo necessario per osservare il cambiamento di pendenza (tempo di ritardo) è correlato all'inizio della degradazione della carta che porta a CO_2 ed alla produzione di acidi minerali. La velocità di crescita del potenziale del TiO_2 (o di diminuzione del pH) è assunta come velocità di mineralizzazione.

Biosensore enzimatico a glucosio ossidasi (valutazione del grado di carbossilazione)

Con l'invecchiamento artificiale la cellulosa della carta subisce delle trasformazioni chimiche, che provocano rotture dei legami nelle catene polimeriche, e ossidazione con formazione di gruppi carbossilici e produzione di radicali (Campanella et al. 2001). I gruppi carbossilici si possono legare in modo covalente a catalizzatori chimici, come gli enzimi, con formazione di legami ammidici. Con un dischetto della carta che si vuole testare, contenente l'apposito enzima, così immobilizzato, si realizza un biosensore enzimatico, avente come trasduttore un elettrodo di Clark (elettrodo amperometrico a diffusione gassosa) per la determinazione dell'ossigeno, accoppiato al dischetto di carta in esame, sulla quale è stato immobilizzato covalentemente l'enzima glucosio ossidasi. Il biosensore misura l'attività enzimatica, che viene correlata alla quantità di enzima legato chimicamente al dischetto di carta e quindi all'aumento del grado

di ossidazione del campione di carta. L'immobilizzazione chimica della glucosio ossidasi sui campioni di carta analizzati, invecchiati e non, è stata effettuata secondo un procedimento, riportato in letteratura, (Campanella et al., 1992, 2001), che implica l'impiego di carbodiimmide;



quest'ultima agisce da ponte, legando la carta alle catene proteiche dell'enzima, grazie alla presenza dei gruppi carbossilici formatisi a causa della degradazione della cellulosa. Maggiore sarà il degrado della carta, maggiore sarà il numero di gruppi carbossilici, presenti nella cellulosa della carta, maggiore sarà l'attività enzimatica immobilizzata che viene registrata. La concentrazione dei gruppi carbossilici nella molecola prodotti dalla degradazione ossidativa della cellulosa della carta viene determinata al crescere del tempo di invecchiamento.

L'attività enzimatica immobilizzata viene misurata aggiungendo il corrispondente substrato: nelle nostre esperienze si sono utilizzati glucosio ossidasi e glucosio rilevando la diminuzione della concentrazione di ossigeno disciolto in seguito alla reazione enzimatica (Figura 2):

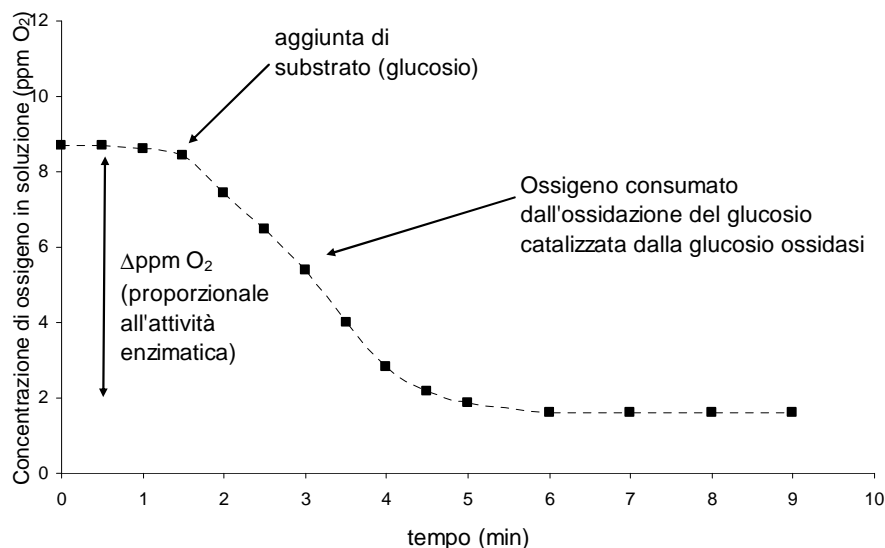
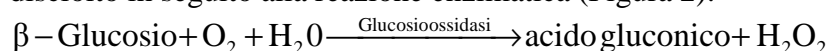


Figura 2: Andamento della diminuzione della concentrazione di ossigeno disciolto in seguito alla reazione enzimatica.

Apparecchiature

L'invecchiamento artificiale della carta è stato effettuato con il Veterometro QUV

Weathering Tester - Model QUV/spray QPanel LAB-Products.

Le misure con il fotosensore a biossido di titanio sono state eseguite su una sospensione di 200,1 mg di campione di carta finemente tagliata (le dimensioni

delle particelle di carta sono circa $\leq 1,0 \pm 0,2 \text{ mm}^2$) e di 50 mg di TiO_2 in 105 mL di acqua utilizzando un potenziometro Orion modello 420 A pH Meter, per la determinazione del potenziale del biossido di titanio, irradiato da luce UV con il Polight (sorgente luminosa di alta intensità).

Le misure con il biosensore a glucosio ossidasi sono state effettuate, su dischetti circolari di carta di circa $8,0 \pm 0,1 \text{ mm}$ di diametro e di peso $10,0 \pm 0,5 \text{ mg}$, utilizzando un elettrodo amperometrico di Clark mod. 970899 Orion per la determinazione dell'ossigeno, interfacciato ad un potenziometro Crison mod. GLP 22.

Risultati e Discussione

I risultati degli effetti dei tre differenti procedimenti di invecchiamento artificiale sulla carta comune per fotocopie e del trattamento con la sospensione di *Spirulina Subsalsa* sono riportati in Tabella 1.

L'effetto di riparazione sulle catene cellulose danneggiate è stato determinato, sui campioni di carta trattati e non, attraverso gli indici di valutazione della permanenza ambientale e del grado di carbosilazione correlato all'attività enzimatica immobilizzata. Entrambi gli indici sono influenzati sia dal tipo di trattamento di invecchiamento artificiale, sia dal tempo di contatto con la sospensione di *Spirulina Subsalsa*.

Tabella 1: Risultati dei test di persistenza ambientale ed enzimatico su carta sottoposta a 3 differenti procedimenti di invecchiamento artificiale e poi ad un trattamento di riparazione con alghe.

Tipi di carta	P_{amb} (min^2/mV)	Attività enzimatica ($\text{mol O}_2/\text{m}$ in g) 10^{-3}
carta non trattata	333 ± 15	0.244 ± 0.001
carta invecchiata in veterometro per 6 h	43 ± 5	0.297 ± 0.001
carta invecchiata in veterometro per 6 h, poi con alghe e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ per 4 h	100 ± 10	0.295 ± 0.004
carta invecchiata in veterometro per 6 h, poi con alghe e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ per 48 h	185 ± 10	0.281 ± 0.003
carta trattata con TiO_2 (50 mg in 100 mL di acqua) e Polilight per 6 h	130 ± 10	0.411 ± 0.006
carta trattata con TiO_2 e Polilight per 6 h, poi con alghe e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ per 4h	430 ± 20	0.351 ± 0.005
carta trattata con TiO_2 e Polilight per 6 h, poi con alghe $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ per 48 h	438 ± 25	0.291 ± 0.004
carta trattata con HCl 0.1 M per 30 min	6.0 ± 0.5	0.306 ± 0.005
carta trattata con HCl 0.1 M per 30 min, poi con alghe e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ per 4 h	10 ± 1	0.291 ± 0.004
carta trattata con HCl 0.1 M per 30 min, poi con alghe e $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 10^{-10} \text{ M}$ per 48 h	307 ± 15	0.283 ± 0.003

I campioni di carta presentano caratteristiche di comportamento nei confronti dei processi di invecchiamento simili: la persistenza ambientale diminuisce dopo tutti e tre i tipi di 'invecchiamento artificiale, durante il quale si verificano i principali fenomeni di danneggiamento della carta. La sospensione di Spirulina Subsalsa (stimolata a produrre composti sequestranti da una soluzione di $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 10^{-10} mol/L) determina un effetto di protezione ed un aumento di stabilità, già evidente dopo 4 h e significativo dopo 24 h, della carta dai processi degradativi della cellulosa, dovuti all'invecchiamento artificiale, con valori più alti di persistenza ambientale sulla carta trattata rispetto a quella non trattata.

Il grado di carbossilazione aumenta dopo tutti e tre i tipi di invecchiamento artificiale, durante il quale si verificano i principali fenomeni di danneggiamento della carta. La sospensione di Spirulina Subsalsa determina un effetto di protezione ed un aumento di stabilità della carta dai processi degradativi della cellulosa, dovuti all'invecchiamento artificiale, con valori più bassi di attività enzimatica immobilizzata sulla carta trattata rispetto a quella non trattata.

Conclusioni

I campioni di carta presentano caratteristiche di comportamento nei confronti dei processi di invecchiamento simili: la persistenza ambientale diminuisce e il grado di carbossilazione aumenta dopo tutti e tre i tipi di invecchiamento artificiale, durante il quale si verificano i principali fenomeni di danneggiamento della carta.

La sospensione di Spirulina Subsalsa determina, sia dopo 4 h sia dopo 48 h, un effetto di risanamento della carta dai processi degradativi della cellulosa, dovuti all'invecchiamento artificiale, con incremento dei valori di persistenza ambientale e con diminuzione dell'attività enzimatica immobilizzata sulla carta trattata rispetto a quella non trattata.

BIBLIOGRAFIA

CAMPANELLA L., COCCO R., SAMMARTINO M. P., TOMASSETTI M., 1992 - *A new enzyme inhibition sensor for the organophosphorus pesticides analysis* Sci Total Environ, 123-124, 1

CAMPANELLA L.; ANTONELLI A.; FAVERO G.; TOMASSETTI M. 2001 - *New archeometric method for wood based on an enzymatic biosensor*. L'Actualité Chimique - Octobre 14 - 20.

CAMPANELLA L., BATTILOTTI M., COSTANZA C., 2004, *Studio della degradazione fotochimica della cellulosa della carta*. Ambiente, Risorse e Salute, n.99, Anno XXIII, settembre-ottobre, 6-12.

CAMPANELLA L., COSTANZA C., TOMASSETTI M. 2005a - *Trattamento della carta con antiossidanti. Protezione dai processi di invecchiamento*. LA CHIMICA E L'INDUSTRIA. vol. 87, pp. 84-89

CAMPANELLA L., BATTILOTTI M., COSTANZA C., 2005b - *Studies on simulated ageing of paper by photochemical degradation*. ANNALI DI CHIMICA. vol. 95, pp. 727-740

CAMPANELLA L., COSTANZA C., TOMASSETTI M. 2006 - *Determination of environmental persistence and thermogravimetric analysis of paper artificially aged by photoirradiation*. ANNALI DI CHIMICA. Vol. 96, pp. 575-585

HIDAKAA H., SHIMURAA T., AJISAKAA K., HORIKOSHIA S., ZHAOB J., SERPONE N. 1997 - *Photoelectrochemical decomposition of amino acids on a TiO₂/OTE particulate film electrode*, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 109, 165-170.

MILLS A., LE HUNTE S., 1997 - *An overview of of semiconductor photocatalysis*, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 108, 1-35.

PAWLIK-SKOWROŃSKA B, PIRSZEL J, KALINOWSKA R, SKOWROŃSKI T, 2004. *Arsenic availability, toxicity and direct role of GSH and phytochelatins in As detoxification in the green alga Stichococcus bacillaris*. Aquat. Toxicol. 70:201-212

VAMATHEVAN V., AMAL R., BEYDOUN D., LOW G. AND MCEVOY S., 2002 - *Photocatalytic oxidation of organics in water using pure and silver-modified titanium dioxide particles*, J. Photochem. Photobiol., A, 148, 233-245

Anexo VI

Autores: Alicia de Lera Santín

Título: “LAS CARACTERÍSTICAS DEL PAPEL EN LA EDAD MEDIA”

Tipo de publicación: Publicación en prensa, actas de las XI JORNADAS DE ESTUDIOS HISTÓRICOS, “Mitificadores del pasado, falsarios de la Historia” En la Facultad de Letras de la UPV- EHU

Vitoria, el 3, 4 y 5 de noviembre de 2009.

LAS CARACTERÍSTICAS DEL PAPEL EN LA EDAD MEDIA

INTRODUCCIÓN

El papel inventado por los chinos fue mejorado e introducido por los musulmanes en al-Ándalus. Los papeles hispano-árabes tienen ciertas características que los diferencian de los papeles musulmanes y los europeos. En esta comunicación realizaremos un repaso de la historia y difusión del papel hasta España. Conoceremos su composición y características. Y, veremos algunas de las técnicas de identificación empleadas para el estudio de materiales y datación de obras de arte.

I - HISTORIA DEL PAPEL

I-1 Invención

La invención del papel es atribuida al ministro chino Cai Lun (T'Sai Lun) en el año 105 d.C., que bajo las órdenes del emperador Ho-Ti tenía como objetivo encontrar un soporte para la escritura que fuera de fácil manejo, no abultase mucho, ligero y cómodo de transportar. Para ello retomó un material de abrigo que ya existía, inventado por Han Hsin (247-194 a.C.)⁴⁵¹. Este tejido o tipo de papel compuesto por una pasta proteínica, proveniente de trapos de seda desmenuzados, servía como guata entre dos tejidos, para abrigar a la gente que no tenía demasiados medios económicos para costearse tejidos de calidad. Pero, existen descubrimientos que revelan que este soporte fue utilizado como material de escritura unos 100 años a.C. En el desierto de Gobi, fue hallado un papel escrito con un pincel muy fino y pintura a base de

⁴⁵¹ Descubrimiento (en 1986) en una tumba de la ciudad de Tianshui, Gansu, de fragmentos de papel compuestos por una pasta proteínica del siglo II a.C. Collings, T. Milner, D. "A New Chronology of Papermaking Technology" from *The Paper Conservator*, Vol. 14, 1990, pp. 58-59.

laca⁴⁵², pegado sobre tabletas de bambú o madera de tamarindo. Suponemos, pues, entonces que T'sai Lun perfeccionó la fabricación del papel favoreciendo su desarrollo y haciendo, de un soporte ya existente, un material apto para la escritura.

I-2 Su difusión por el mundo

La composición y método de fabricación fue un secreto hasta que en el siglo VIII (año 751), soldados musulmanes apresaron a artesanos papeleros chinos en la batalla de Samarcanda -o batalla de Talas⁴⁵³-. Los musulmanes tenían orden de no matar a los obreros chinos para poder obligarlos a desvelar el secreto de la fabricación del papel. De esta manera, obtuvieron la tan codiciada receta de este soporte y la expandieron por toda la ruta de la seda -Oriente medio y África del norte- y así llegó a Europa por España.

Los molinos de papel se fueron construyendo por diferentes ciudades: Samarcanda, Damasco, Bagdad, El Cairo, Sudán, Fez, Melilla, España árabe, Corona de Aragón y Europa.

El primer molino papelerero documentado en España se sitúa en Xátiva (1056). Pero, diferentes historiadores sostienen que el papel debió de entrar en España por Córdoba y que fue en este lugar donde se construyó el primer molino papelerero. Muchos de los artesanos que trabajaban en estos molinos fueron emigrando a otros países para poder tener material en su lugar de origen, extendiéndose este arte primero por Italia, luego por Francia, etc. A pesar de ello, España tuvo el predominio de la exportación papelera durante tres siglos.

Paralelamente a esta difusión del papel por Oriente y Occidente, hemos de saber que en América intertropical, los mayas y posteriormente los aztecas sabían fabricar una especie de papel, soporte para la escritura, constituido por las cortezas de las higueras y más plantas. En el 660

⁴⁵² Museo-Molino papelerero de Capellades, 4ª ed., Ed. Museu-Molí Papere de Capellades, Capellades, 1983.

⁴⁵³ http://es.wikipedia.org/wiki/Batalla_del_Talas y <http://www.futuropasado.com/?p=346>

Huematzin elaboró un códice que trataba de la Tierra y del Cielo. Entre el año 900 y 1000 se escribió el almanaque sagrado de 45 páginas las cuales están en forma de paraviento y posee una cubierta ornamentada con turquesas y jade. Tras huir los mayas de los aztecas, éstos difundieron la fabricación por Honduras, Nicaragua y Perú.

I-3 Papel en España

Teóricamente el papel fue introducido en España por los musulmanes en el siglo XI, pero según lo escrito por el autor árabe-español Ibn-Abdrabbini (860- 940), esto ocurrió a principios del siglo X. Por otro lado, Ibn-al-Abbar o Ben-al-Abbar en su obra

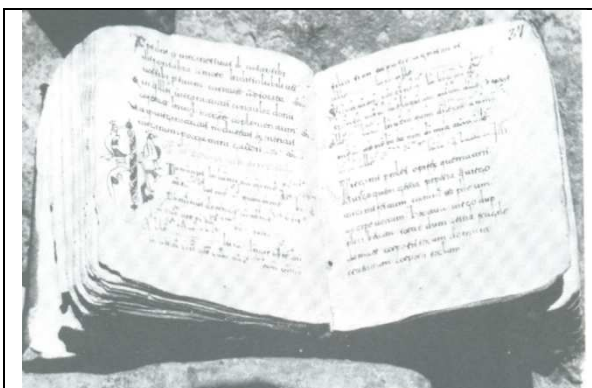


Fig. 1 Breviario de Silos. Historia del Papel en España. Diputación provincial de Lugo.

titulada "*Takmila*" nos relata que el califa cordobés Al-Hakam II (961-976) protegió al papelero tunecino Ibrahim-ben Salim que vivía en Córdoba y le llamaban el "papelero africano". Este califa que gobernaba en el al-Ándalus en el siglo X, amaba los libros y creó una biblioteca de 400.000 volúmenes en Córdoba. Para ello necesitó escribanos, copistas y por supuesto un soporte económico: el papel. Por esta razón no es tan descabellado suponer que existieran molinos papeleros en Córdoba, bajo el puente romano aprovechando unos molinos de trigo⁴⁵⁴.

⁴⁵⁴ *El papel, Historia, su fabricación, su uso*. Ed. Escuela grafica salesiana, Barcelona –sarría, 1984, pp.13-22

A pesar de estos relatos, el papel más antiguo de Europa, se encuentra en el Monasterio de Santo Domingo de Silos y es el Misal mozárabe (1040-50). Éste códice de 159 hojas es titulado *Breviarum et missale Mozarabicum*⁴⁵⁵ ⁴⁵⁶o como aparece en el catálogo de la Abadía de Silos (XVII) “Misal Toledano” de pergamino de trapo.

A partir del siglo XI está documentado que la fabricación del papel se realizaba en Xátiva, famosa por la calidad de su papel. El escritor árabe El Edrisí testimonió en sus escritos que los papeles fabricados en Xátiva eran exportados a Oriente y a Occidente, y los fabricantes de papel eran protegidos según unas ordenanzas árabes, para salvaguardar la calidad del lino de dicha ciudad y por consiguiente de sus papeles.

I-4 Fabricación del papel en la Edad Media

Los musulmanes introdujeron mejoras técnicas como la utilización de la energía hidráulica, variaron la composición del papel y perfeccionaron la forma papelera⁴⁵⁷. Todo ello, con el fin de disminuir el coste de fabricación y producir en grandes cantidades.

⁴⁵⁵ RUIZ LASALA, I.: *De la piedra al papel pasando por el papiro, el pergamino y la vitela*, Ed. Gobierno de Aragón, Zaragoza, 2008, p.30-31,37-46.

⁴⁵⁶ VIVANCOS GÓMEZ, M.: *Glosas y notas marginales de los manuscritos visigóticos del monasterio de santo domingo de silos* Ed. Studia silensia XIX, abadía de silos, Burgos, 1996.

⁴⁵⁷ *Los manuscritos árabes en España y Marruecos*, p. 295
http://books.google.es/books?id=GOD2FfTuFw0C&pg=PA300&lpg=PA300&dq=tinta+metal-g%C3%A1licas&source=bl&ots=dynpOk_Y6O&sig=w1Qk1sV6UEjX1GanqK06dITLlw&hl=es&ei=TkqeSt3ZAc7B-QbwpvDaCw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5#v=onepage&q=&f=false

En Europa, los trapos o fibras seleccionados eran fermentados en tinas o pudrideros llenos de agua. Posteriormente se trituraban en unas cubetas mediante el uso de mazas metálicas o batanes accionados hidráulicamente por máquinas, mientras un chorro de agua constante ayudaba a la completa trituración⁴⁵⁸. De esta manera se conseguía una pasta densa. El proceso de maceración se repetía hasta obtener la homogeneidad y finura deseadas.

Una vez obtenida la pasta deseada, un primer operario introducía la forma o tamiz⁴⁵⁹ en la tina y al sacarla, sacudía enérgicamente en varias direcciones para entrelazar las fibras y escurrir el agua, consiguiendo un estrato de pasta uniforme. Un segundo operario vaciaba la forma y depositaba entre filtros de lana, el nuevo papel formado, creando pilas de altura regular. Un tercer obrero prensaba los folios para exprimir el agua del papel y posteriormente los secaban en tendedores, pasándolos al baño de cola y gelatina. Se volvían a prensar y se dejaban secar al aire libre. Una vez secos se aplanaban y alisaban.

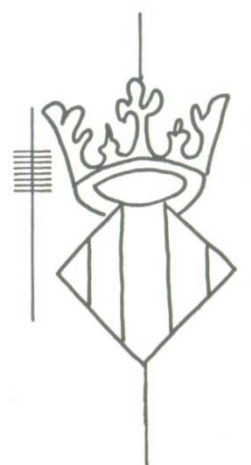


Fig. 2 Filigrana Catalana 1443 reproducidas en "Paper and watermarks in Catalonia" Oriol Valls

I-5 La filigrana

Durante el siglo XIII el molde chino fue reemplazado por una malla metálica (finos alambres sujetos por otros más gruesos transversales).

⁴⁵⁸ Según algunos estudiosos, en los papeles españoles de esa época podemos hallar sobre la superficie hebras de hilos visibles y su grosor puede variar de 400 a 3000 micras. Y al trasluz vemos las formas de verjurado irregular: corondeles poco tensados y puntizones poco marcados. En España la trituración de los trapos se realizaba mediante las muelas de molinos harineros o de aceite, separando irregularmente las fibras y provocando que éstas resultaran ásperas, flácidas y de hidratación escasa.

⁴⁵⁹ La forma o tamiz estaba constituida por una tela metálica y un marco postizo de altura diferente según el grosor de la hoja que se desease. En China la forma se fabricaba con cañas de bambú.

De esta manera se conseguía un papel más fino y con una marca al agua que se podía ver a contraluz, llamada “vergé” o “verjurado”. Pronto la adornarían con dibujos, nombres, símbolos...que se convertiría en símbolo de la fábrica y símbolo de calidad del papel⁴⁶⁰.

No se sabe a ciencia cierta si fue en Bolonia o en Fabriano donde se inventó la filigrana. Lo cierto es que Bolonia posee un papel datado en 1282 con una cruz griega. En España tuvimos que esperar hasta el principio del siglo XIV para ver aparecer la filigrana.

Dibujos: al principio los dibujos eran toscos y solían ser animales: toros, corderos, águilas, palomas...; partes de animales o del cuerpo: corazones manos, cabezas, etc.; objetos: campanas, anclas; círculos, cruces, estrellas y otros emblemas. Más adelante aparecerían letras

^{461,462}

II - COMPOSICIÓN DEL PAPEL MEDIEVAL

II-1 Materia prima –las fibras-

El papel fabricado en China antes del año 105 d.C., estaba compuesto por fragmentos de tela o de hebras de seda de los capullos de los gusanos que quedaban una vez lavados. Posteriormente a ese año, comenzaron a utilizar diferentes materiales como cortezas de plantas (gampi⁴⁶³, kozo, mitsumata, etc.), redes de pesca inservibles y velas de barcos, cortezas de madera, fibras de bambú, desechos de trapos, ropa de lino, cáñamo y ramio (esta última es una hierba china que fue muy empleada para vestir, debido a sus fibras finas, resistentes y de aspecto brillante).

⁴⁶⁰ Base de datos de filigranas: <http://www.ksbm.oeaw.ac.at/wz/wzma.php>, www.paperhistory.org, <http://www.bernstein.oeaw.ac.at/>

⁴⁶¹ *El papel, Historia, su fabricación, su uso*. Ed. Escuela grafica salesiana, Barcelona –sarria, 1984, p. 31.

⁴⁶² BRIQUET, C.: *Les filigranes : dictionnaire historique des marques du papier*, 1991.

⁴⁶³ De esta planta sólo se utiliza la corteza. Es difícil de cultivar por su crecimiento lento por lo que se recurría a recolectarla del bosque. Contiene una sustancia viscosa, el mucílago. <http://www.virtualginza.com/washiplant.htm>

Los musulmanes variaron y mejoraron la composición del papel para disminuir el coste de fabricación. Las fibras empleadas eran mezclas de lino, cáñamo y raramente algodón. Gracias a esto, conseguían que el papel fuera más ligero, menos rugoso y más barato que el pergamino. En el tratado árabe “Umdar al-Kuttab” (1025)⁴⁶⁴, la elaboración del papel sólo se realizaba mediante el uso del cáñamo. No obstante, gracias a análisis microscópicos, se han encontrado fibras de ramio, lo que nos da a entender que reciclaron papeles de la época de Tsai-Lun. Pero hemos de añadir que la composición del papel dependía de los recursos de cada lugar.

En España y más tarde en el resto de Europa, se utilizarán las fibras vegetales de los trapos de lino, cáñamo o esparto, llamándolos por esta razón papeles de trapo. El lino era muy abundante en el Levante de la Península y debido a su aspecto esponjoso se le llamaba “papel de algodón”. Pero, hasta el siglo XVIII, el algodón no fue un componente primordial.

A partir de la invención de la imprenta por J. Gutemberg en el año 1450, surgieron problemas de abastecimiento, lo que provocó que se optara por la utilización de plantas y por último también madera, en el siglo XIX.

II-2 Encolantes

La función de los adhesivos es dar resistencia y solidez al papel, mejorar la apariencia y por otra parte, permite la escritura al evitar que la naturaleza hidrófila del papel absorba y difunda las tintas, manteniéndolas en superficie.

T’sai Lun añadió una sustancia gelatinosa que se produce al hervir las algas agar-agar. Este gel se unía a las fibras de seda creando un papel resistente, flexible e impermeable, apto para la escritura. Más tarde

⁴⁶⁴ *El papel, Historia, su fabricación, su uso*. Ed. Escuela grafica salesiana, Barcelona –sarria, 1984, pp.13-22.

fueron añadidas el norio y el tororo⁴⁶⁵, que eran materiales unificadores y protegían las fibras y evitaban que enmoheciesen.

Los musulmanes utilizaban como encolante, la cola vegetal de almidón de arroz que posteriormente se empleó también por toda Europa.

Más tarde, en 1337 en Fabriano, se sustituyó este apresto por gelatina. Este adhesivo de origen animal se obtenía haciendo hervir desechos de pieles, curtidos o menudillos de diversos animales. Este encolante se conocía como “alum de roca” (porque debido a la poca atracción de la celulosa con esta gelatina se añadía sulfato de alúmina)⁴⁶⁶.

II-3 Blanqueantes

El blanqueante que se usaba en la Edad Media era la cal. Este sistema fue introducido por los musulmanes.

II-4 Tintas

Para conocer la autenticidad de un papel, deben estudiarse las tintas de la obra para averiguar si existe algún anacronismo.

La tinta creada en China fue introducida en Europa y mejorada por los musulmanes. En la Edad Media eran empleadas dos tintas: las de carbón y las metaloácidas. En Oriente –Asia y Próximo Oriente- se usaban las de carbón; en Oriente Medio y norte de África ambas y en Europa Occidental las ferro-gálicas⁴⁶⁷. Según la época y lugar, la composición de las tintas variaba⁴⁶⁸. Las ferro-gálicas⁴⁶⁹ en el mundo andalusí y países mediterráneos tenían en común agallas, agua, goma y vitriolo⁴⁷⁰. Las agallas⁴⁷¹ se empleaban para obtener el colorante negro. Solían cocer y macerar las nueces de agallas para conseguir el negro

⁴⁶⁵ Museo-Molino papelerero de Capellades, 4ª ed., Ed. Museu-Molí Papere de Capellades, Capellades, 1983, p.22.

⁴⁶⁶ Museo-Molino papelerero de Capellades, 4ª ed., Ed. Museu-Molí Papere de Capellades, Capellades, 1983, p.34.

⁴⁶⁷ S. KROUSTALLIS: *El soporte de la lengua*, 2008, p.147

⁴⁶⁸ ZERDOUN BAT-YEHOUDA, M. : *Les encres noires au moyen age*, Ed. CNRS, Paris, 1983, pp. 123-143.

⁴⁶⁹ También se les puede llamar ferrotánicas, metalotánicas, metalogálicas o metaloácidas.

⁴⁷⁰ Descripción dada en el libro “*Contemplació en Deu*” de Ramón Llull escrito en 1272-74

⁴⁷¹ Las agallas de robles de Alepo eran de gran calidad.

de sus taninos vegetales. La goma arábica era empleada para impedir que la tinta se resecase. Aportaba viscosidad para mantener en suspensión otras sustancias y de esta manera hacía más fácil la escritura. El vitriolo era un mordiente usado para fijar la tinta. Estaba compuesto por sulfato de diversos metales. Según los gustos de cada escriba, solían añadir diferentes componentes para dar a la tinta diferentes características; las cáscaras de granada y/o nuez, azúcar, alumbre, vidrio triturado y tinta de carbón u otro colorante (índigo) son algunos de ellos.

Existen relaciones entre el color de la tinta, su procedencia y época de fabricación. La siguiente tabla resume los datos proporcionados por Kroustallis de diferentes autores⁴⁷²:

PROCEDECENCIA	ÉPOCA	COLOR DE LA TINTA
EUROPA CONTINENTAL	Siglos IV-VI	Tono marrón amarillento o marrón oliva
	A partir del siglo VII	Marrón
	Siglo VIII (puntualmente)	Tono verdoso
ITALIA		Tono grisáceo o amarillento
	XV y XVI	Matiz verdoso ⁴⁷³
IRLANDESES, ANGLO SAJONES BAJA ALEMANIA ZONAS DE INFLUENCIA INSULAR		Tono gris oscuro o marrón oscuro
SUR DE EUROPA		Tinta más negra
ESPAÑA	Siglos XIV y XV	El Tono más negro ⁴⁷⁴

Tabla 1. Tonalidad de las tintas según época y procedencia.

En los textos árabes era común utilizar tintas de colores para subrayar, resaltar o enriquecer algunos textos. Los pigmentos de estas tintas eran semejantes a los empleados para teñir alfombras y tejidos de seda, siendo los colorantes vegetales los más usados en la Edad Media.

⁴⁷² Tabla realizada a partir de los datos extraídos de S. KROUSTALLIS pp.147-148 de varios autores como Bischoff. *Paléographie. De l'antiquité romaine et du moyen âge occidental*. Paris: Grans Maruels Picard, 1985, pp. 23-24 y las referencias 20 y 21.

⁴⁷³ Dato extraído del artículo de KROUSTALLIS y que hace referencia a E. RUIZ GARCÍA, p.98

⁴⁷⁴ Y otro dato más del autor D. CARVALHO: *Forty Centuries of ink*. New York, p.7

Colorantes Color	Composición /origen vegetal	uso
rojo	Rubia (planta)	Tintura tejidos
	Hiedra (planta)	Laca roja
	Palo de Brasil (planta)	Tintorerías y laca para pintar
	Sangre de dragón (planta)	Tintorerías
Rojo- morado azulado	Folium o tornasole (planta)	Iluminadores medievales. Su color variaba dependiendo de su alcalinidad.
azul	Índigo (planta)	Tintorerías
	Pastel (planta)	
amarillo	Azafrán (planta)	Tintorería, prácticas pictóricas
	Celidonia (planta)	En algunos procesos de imitación de crisografía
Amarillo verdoso	Gualda (planta)	Laca en iluminación de manuscritos
verde	Suco (Diferentes plantas)	Tintorerías
Colorantes	Origen animal	Uso
rojo	Púrpura -de moluscos-	Alto coste, en Bizancio lo usaban para firma de emperadores
rojo	Quermes (insectos: coccus ilicis)	
amarillo	Hiel de animales	Imitación de la crisografía

Tabla 2. Colorantes de origen vegetal y animal.

Tintas de color	Pigmentos/composición mineral	Uso
Rojas	Minio (óxido de plomo de color rojizo anaranjado)	Principal, letras iniciales, títulos, resaltar un texto importante.
	Cinabrio (mineral de sulfuro de mercurio o mercurio y sulfuro)	
Azules	Lapislázuli: tenía un alto precio lo reservaban para obras de gran lujo y su uso era excepcional	
	Azurita (carbonato de cobre)	
Blancas	Cerusa (carbonato de plomo)	Fines ornamentales
Amarillas	Oropimente (arsénico y azufre)	Fines ornamentales. Uso venenoso e incompatible con parte de los pigmentos y colorantes

verdes	Verdigrís o cardenillo (acetato de cobre)	Fines ornamentales. Se desaconsejaba por ser muy corrosivo e incompatible con pigmentos como la cerusa o oropimente.
--------	---	--

Tabla 3. Tintas.

III - Exámenes científicos

En muchas ocasiones, el estudio del estilo, iconografía, propiedades paleográficas y la comparación con otros libros de la época, no es suficiente para conocer la autenticidad de una obra. Es necesario entonces recurrir a la ciencia para conocer la composición y poder compararla. Existen varios tipos de análisis: los químicos, los microscópicos y los instrumentales que miden las propiedades físicas o físico químicas.

III-1 Análisis químicos

Para los test siguientes se debe tener cuidado, porque los productos son corrosivos y es obligatorio el uso de guantes.

III-1-1 Composición fibrosa del papel

Para conocer la composición de las fibras de un papel podemos efectuar pruebas con diferentes reactivos colorantes. Es necesario encontrar o coger un pequeño fragmento de papel porque el reactivo mancha. Otra opción es conseguir mecánicamente unas cuantas fibras, añadir el reactivo y observarlas al microscopio.

Existen dos tipos de pruebas⁴⁷⁵:

- 1- Colorante de Herzberg o cloruro de zinc⁴⁷⁶
- 2- Floroglucinol⁴⁷⁷

⁴⁷⁵ LIENARDYA, A., VAN DAMME, P.: *Inter folia: Manuel de conservation et de restauration du livre*, Ed. Institut royal du Patrimoine artistique, Bruxelles, 1989, pp. 28-30

⁴⁷⁶ El colorante de Herzberg o el cloruro de zinc se prepara de la siguiente manera: 40gr de Cloruro de zinc y 20ml de agua destilada. Una vez frío, se mezcla con 4,2gr ioduro de potasio, 0,2gr de yodo y 10ml de agua destilada. Se decanta después de un día de reposo.

Tipo de fibras	Color con Herzberg	Color con floroglucinol
Papel de pasta química de madera y otras materias ligno-celulósicas blanqueadas yute, paja, alfa bambú	Azul violáceo o violeta	incoloro
Ligno-celulósicas: Pasta mecánica, yute y paja no blanqueados	Amarillo	púrpura
Fibras orientales: Gampi, mitsumata	Amarillo, amarillo verdoso	
Celulosa pura: Lino, algodón... Papel de trapos	Rojo marrón, color rojo vino	incoloro

Tabla 4. Reconocimiento de fibras.

III-1-2 Reconocimiento de otras sustancias⁴⁷⁸:

- El almidón

Suele detectarse con Lugol⁴⁷⁹. Se extrae una pequeña muestra y se disuelve en 1-2ml de agua destilada. Se calienta y se añade el lugol. En presencia de almidón, aparece una coloración azul-violeta intensa.

- Polisacáridos como Gomas vegetales: goma Arábica, de tragacanto...

Añadimos una gota de ácido clorhídrico a un poco de material previamente extraído y se calienta al baño maría. Al sólido seco se añaden dos gotas de agua para disolverlo. Una vez seco se añade dos gotas de una solución de 1g de cloruro de trifeniltetrazolio en 10ml de

⁴⁷⁷ Se prepara con 1gr de clorhidrato de floroglucina en 50ml de alcohol de 90°. Añadir 25ml de ácido clorhídrico (d=1,19)

⁴⁷⁸ Pruebas descritas por Paolo Cremonesi en "Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo" pp.32-36.

⁴⁷⁹ Si no se compra preparada, se puede fabricar: 2,6g de ioduro de potasio (KI) en 5ml de agua destilada y 0,13g de yodo (I₂), se disuelve y se añade agua hasta los 100ml.

agua destilada y una solución de 2,5g de hidróxido de sodio (NaOH) en 50ml de agua destilada. Se calienta todo al baño maría y una vez seco si aparece una coloración roja significa que hay presencia de polisacáridos.

- La cola animal

Esta prueba debe realizarse con guantes para no contaminar la muestra. Es necesaria una cantidad mínima de material que se colocará en un tubo de ensayo donde se introducirá un papel de filtro del diámetro del tubo que sobresaldrá un centímetro por encima. Posteriormente se añade una gota de un reactivo (0,5 g de 4-dimetilaminobenzaldeido en 10ml de ácido clorhídrico concentrado), se calienta el tubo con un bunsen y si el papel absorbente se colorea de violeta, esto nos indica que existe cola animal.

- Colofonia⁴⁸⁰ (usado a partir del siglo XIX)

Test de Raspail. Una pequeña cantidad de papel se coloca sobre un cristal de reloj y se añade una solución concentrada de azúcar. Se elimina el exceso de solución con papel absorbente y echamos una gota de ácido sulfúrico concentrado. Después de un minuto, en presencia de colofonia, aparece un color violeta. Es recomendable confrontar el color con otro papel sin azúcar.

- Tintas

Para las tintas existen diferentes pruebas: Para las ferroácidas podemos utilizar el test de Hierro II⁴⁸¹ donde un papel impregnado previamente con batofenantrolina da una coloración rosacia en presencia de Fe⁺².

⁴⁸⁰ <http://es.wikipedia.org/wiki/Colofonia>

⁴⁸¹ Podemos encontrar un artículo sobre este proceso en <http://www.crcr.cnrs.fr/IMG/pdf/testdufer.pdf>

- Otras pruebas⁴⁸²

Elemento	prueba	resultado
Determinación de presencia de carbonatos	En medio ácido	Efervescencia por el desprendimiento de dióxido de carbono.
Plomo (Pb)	Ataque con ácido clorhídrico	Precipitación PbCl ₂ soluble en agua caliente
Plata (Ag)	Ataque con ácido clorhídrico	Precipitación blanca de cloruros insolubles AgCl
	+ amoniaco en disolución	Cloruro de plata se solubiliza
Mercurio (Hg)	Ataque con ácido clorhídrico	Precipitación blanca de cloruros insolubles Hg ₂ Cl ₂
	+ amoniaco en disolución	El precipitado se oscurece (negro)

Tabla 5. Reconocimiento de diferentes elementos con pruebas microquímicas.

III-2 Examen microscópico de las fibras:

Gracias a la morfología en sección transversal y longitudinal de cada fibra podremos conocer la composición del papel. Podemos emplear microscopios ópticos o microscopio electrónicos de barrido (MEB/SEM) para reconocer fibras y componentes presentes en la muestra.



Fig.3 Fotografía microscópica del lino⁴⁸⁴ microscopio electrónico (MEB)

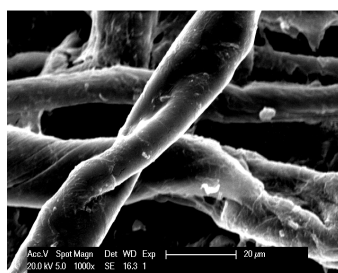


Fig.4 Fotografía microscópica de algodón. Microscopio electrónico (MEB)



Fig. 5 Dibujos⁴⁸³ de la morfología de diferentes fibras.

⁴⁸² Tabla realizada a partir del libro de GÓMEZ, M^a L.: *La restauración, Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte.* (4^a ed.), Ed Cátedra, Madrid, 1998(1^aed.), 2004 (4^aed.), pp. 194-195.

⁴⁸³ LIENARDYA, A., VAN DAMME, P.: *Inter folia: Manuel de conservation et de restauration du livre*, Ed. Institut royal du Patrimoine artistique, Bruxelles, 1989, p. 34.

⁴⁸⁴ <http://www.educared.net/aprende/anavegar4/comunes/premiados/E/167/paginalino.htm>

III-3 Métodos instrumentales

Existen otro tipo de métodos instrumentales que miden la propiedad física o físico química. Para el papel hemos escogido algunos métodos interesantes para conocer la composición de un papel:

- Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR): Identifica compuestos orgánicos: adhesivos, consolidantes, aglutinantes, colorantes, fibras...

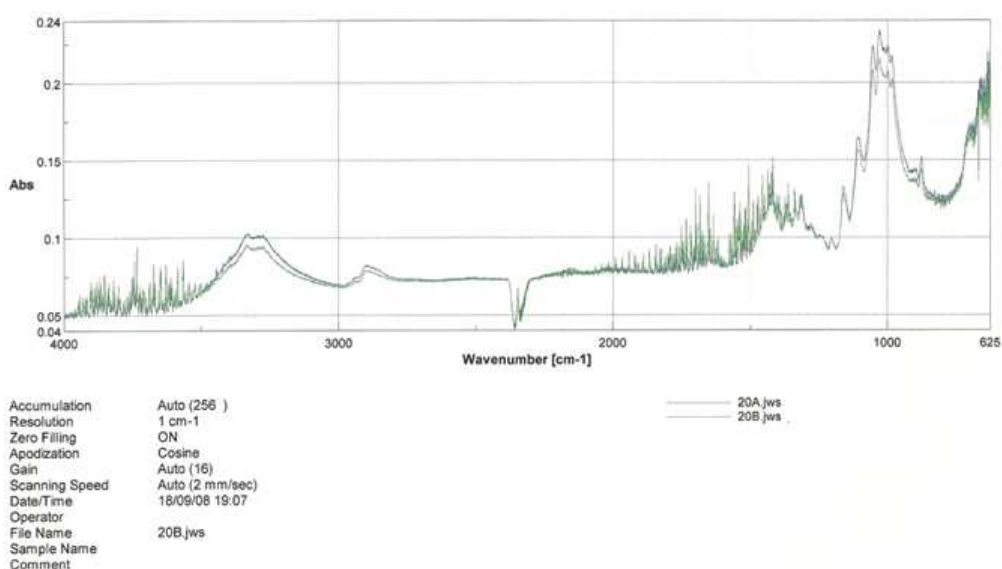


Fig.6 Espectroscopia de dos fibras de algodón. Se suelen realizar comparativas para ver diferencias entre fibras.

- Espectroscopia RAMAN: Identifica granos de pigmentos, cargas, tintas de carbón, compuestos minoritarios en muestras muy pequeñas.
- Cromatografía: Separa los productos orgánicos existentes en mezclas por su movilidad entre una fase móvil y una estacionaria. Cada uno se desplaza a una velocidad característica dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas individuales.
- Difracción de rayos X: Identifica pigmentos

- Fluorescencia por dispersión de energías de rayos X. Analiza pigmentos directamente sobre la superficie
- Espectroscopia de masas: Revela la naturaleza de los elementos.

La **cromatografía de gases** combinada a la **espectrometría de Masa** (GC-MS) da una respuesta exacta de la composición de un papel.

Como inconvenientes: el precio y la destrucción de un micro-fragmento de la obra.

CONCLUSIÓN

Para la autenticación de un papel de la época medieval, es necesario conocer la composición y características de un papel medieval, estudiar la iconografía, propiedades paleográficas y recurrir a la ciencia. Existen diversas pruebas para el reconocimiento de los diferentes materiales constituyentes de una obra. Elegir cuál es la más adecuada suele estar limitado por el elevado coste de los métodos instrumentales y debemos recurrir a análisis menos costosos como los microquímicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. BANIK, G., CREMONESI, P., DE LA CHAPELLE, A., MONTALBANO, L.: *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo.*, Ed. Il prato, Padova, 2003.
2. BARRET, T.: *Japanese Papermaking, traditions tols and techniques*, 2º ed., Ed. Weatherhil, new york, 1992.
3. BISCHOFF: *De l'antiquité romanine et du moyen âge occidental*. Paris: Grans Maruels Picard, 1985
4. BRIQUET, C. : *Les filigranes : dictionnaire historique des marques du papier*, Ed. Hildensheim, Georg Olms, 1991.
5. CARVALHO, D.: *Forty Centuries of ink*. New York: Burt Franklin, 1971.
6. COLLINGS, T., MILNER D.: "A New Chronology of Papermaking Technology", Ed. *The Paper Conservator*, Vol. 14, 1990.
7. COPEDE, M.: *La carta e il suo degrado*, ed. Nardini, Firenze, 1991.
8. GAYOSO CARRIRA, G.: *Historia del papel en España* Tomo1, Ed. servicio publicaciones diputación provincial de Lugo, Lugo, 1994.
9. GÓMEZ, Mª L.: *La restauración, Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*. (4ª ed.), Ed Cátedra, Madrid, 1998(1ªed.), 2004 (4ªed.).

10. HUNTER, D.: *Papernaking the history and technique of an ancient craft*, ed. Cover publications, inc., New York, 1974 (2ªed).
11. LIENARDYA, A., VAN DAMME, P.: *Inter folia: Manuel de conservation et de restauration du livre*, Ed. Institut royal du Patrimoine artistique, Bruxelles, 1989.
12. RUIZ LASALA, I.: *De la piedra al papel pasando por el papiro, el pergamino y la vitela*, Ed. Gobierno de Aragón, Zaragoza, 2008.
13. VIVANCOS GÓMEZ, M.: *Glosas y notas marginales de los manuscritos visigóticos del monasterio de santo domingo de silos* Ed. Studia silensia XIX, abadia de silos, Burgos, 1996.
14. ZERDOUN BAT-YEHOUDA, M. : *Les encres noires au moyen age*, Ed. CNRS, Paris, 1983.
15. VVAA.: *Art on paper mounting and housing*, Ed. Archetype puplications and the british museum, London, 2005.
16. VVAA.: *Beato de Liébana, códice del Monasterio Cisterciense de San Andrés de Arroyo* Ed. Moleiro, Barcelona, 1998.
17. VVAA.: *El soporte de la lengua*, Ed. Patronato Santa María le Real de Nájera, IPHE, Logroño, 2006.
18. *El papel, Historia, su fabricación, su uso*. Ed. Escuela grafica salesiana, Barcelona –sarría, 1984.
19. *Museo-Molino papelero de Capellades*, 4ª ed., Ed. Museu-Molí Papere de Capellades, Capellades, 1983.
20. www.ahhp.es
21. http://books.google.es/books?id=GOD2FftuFw0C&pg=PA300&lpg=PA300&dq=tinta+metal-g%C3%A1licas&source=bl&ots=dynpOk_Y6Q&sig=w1Qk1sV6UEjX1GanqK06dlTTLw&hl=es&ei=TkqeSt3ZAc7B-QbwpvDaCw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5#v=onepage&q=&f=false
22. <http://www.ksbm.oeaw.ac.at/wz/wzma.php>, www.paperhistory.org ,
<http://www.bernstein.oeaw.ac.at/>
23. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lino2.jpg>
24. <http://www.crcc.cnrs.fr/IMG/pdf/testdufer.pdf>
25. <http://www.educared.net/aprende/anavegar4/comunes/premiados/E/167/paginalino.htm>
26. <http://www.virtualginza.com/washiplant.htm>