

## INTRODUCCIÓN

Desde hace años, los restauradores son conscientes de la alta toxicidad de los múltiples productos que emplean y sus posibles efectos. No sólo son perjudiciales para el medio ambiente y la obra de arte, sino también para el restaurador que trata con estas sustancias; ya que hay una clara incidencia de enfermedades cancerígenas y otras de diversa índole, motivadas por dichos productos altamente tóxicos.

La primera parte de esta tesis trata de buscar una alternativa a la toxicidad de los productos de restauración con el estudio del uso actual de enzimas.

Las enzimas son un sistema más inocuo que muchos productos empleados en restauración. Su utilización se centra sobre todo en la eliminación de sustratos en limpiezas o, para la separación de materiales adheridos imposibles de separar con otros métodos más convencionales: adhesivos, proteínas, almidones y triglicéridos.<sup>[9,1,2]</sup> También existe la posibilidad de emplearlas para la datación de obras de arte<sup>[3]</sup>, como biocidas<sup>[4]</sup>, etc.

A pesar de estas ventajas, la utilización de enzimas en este territorio, es insuficiente por falta de información y conocimiento de su correcto manejo. Sin embargo, en Europa se han empleado desde hace ya varias décadas.

La utilización de enzimas en restauración surgió en los años sesenta cuando Sheridan<sup>[5]</sup> aplicó la tripsina para la eliminación de adhesivos proteicos.

---

<sup>1</sup> GRATTAN, D., et al., "The use of enzymes in partially non-aqueous media". *Conservation of Library and Archives Materials and the Graphic Arts*, Ed. G. Petherbridge, Butterworths, London, 1987, pp. 15-24.

<sup>2</sup> VAN DER REYDEN, D., "Recent Scientific Reserch in paper Conservation". *Journal of the American Institute for Conservation*, 31 (1), 1992, pp. 117-138.

<sup>3</sup> CAMPANELLA, L., ANTONELLI, A., FAVERO, G., TOMASSETTI, M., "New archeometric method for wood based on an enzymatic biosensor", *L'Actualité Chimique*, 2001, pp. 14-20.

<sup>4</sup> VALENTIN, N., et al., "Analyses of deteriorated Spanish glass windows: cleaning methods using gel systems" *Triennial meeting (11th), Edinburgh, 1-6 September 1996*, ICOM, Paris, 1996, pp. 851-856.

<sup>5</sup> SHERIDAN, J., "Enzymes, as they relate to the conservator of paintings", *exposition of painting conservation*, Ed. Brooklyn Museum, Nueva York, 1962.

Desgraciadamente pasaron dos décadas hasta observar un desarrollo en el empleo de hidrolasas en limpiezas y otros tratamientos de obras de arte.

O. Wendelbo & B. Fosse.<sup>[6]</sup>, F. Makes<sup>[7,8,9]</sup>, A. De La Chapelle<sup>[10]</sup>, R. Wolbers<sup>[11,12]</sup>, P. Cremonesi<sup>[6,13,14,15]</sup>, Belluci<sup>[9,10]</sup> o Banik<sup>[6]</sup> han sido grandes precursores en el uso de enzimas, inspirando a otros muchos restauradores e investigadores en el empleo de este tipo de proteínas. Estos estudiosos se han centrado sobre todo en el uso de las hidrolasas. No obstante, existen diferentes tipos de enzimas: las transferasas, liasas, isomerasa, ligasas (sintetasas), oxirreductasas, que tienen diferentes funciones, como por ejemplo la capacidad de crear enlaces<sup>[16]</sup>. Esta función sirvió para reflexionar sobre la posibilidad de consolidar con enzimas, materiales relativamente simples desde su estructura, como el soporte de papel, realizado con fibras de celulosa.

Actualmente, los procesos tradicionales de la consolidación de materiales de celulosa se pueden realizar mediante geles celulósicos, consolidantes naturales y/o sintéticos, como por ejemplo los acrílicos, polivinílicos, poliamidas, etc., y

---

<sup>2</sup> WENDELBO, O., FOSSE, B., "Protein Surgery. A Restoring Procedure Applied on Paper", *Restaurator*, 1970, pp. 245-248.

<sup>7</sup> MAKES, F., *Enzymatic consolidation of paintings*, Goteborg: Department of History of Art and Architecture University of Goteborg, 1979.

<sup>8</sup> MAKES, F., "Enzymatic consolidation of a painting: Seventeenth century landscape from Skokloster Palace", *Science and technology in the service of conservation. Preprints of the contributions to the Washington congress*, Ed. International Institute for Conservation, London, 1982, pp. 135-138.

<sup>9</sup> MAKES, F., *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)*, Acta universitatis gothoburgensis, Göteborg, 1988.

<sup>10</sup> BANIK, G., CREMONESI, P., DE LA CHAPELLE, A., MONTALBANO, A., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Ed. Il prato, Padova, 2003.

<sup>11</sup> WOLBERS, R., *Cleaning painted surfaces: Aqueous methods*, Ed. Archetype Publication, London, 2000.

<sup>12</sup> WOLBERS, R. C., *Abstracts of Papers of The American Chemical Society*, 2000, p. 220.

<sup>13</sup> BELLUCI, R., CREMONESI, P., "L' uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti", Ed. Kermes, arte e tecnica del restauro (26), 1994, pp. 45-64.

<sup>14</sup> 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*, 44 (4), 1999, pp. 278-281.

<sup>15</sup> CREMONESI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova 2002.

<sup>16</sup> LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4º Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, pp. 211-212.

no plantean muchos de ellos una alta toxicidad. No obstante, tiene diversos inconvenientes.

Los materiales que se utilizan son invasores, pueden bloquear la fibra, impidiendo sus movimientos naturales, o incluso pueden llegar a desnaturalizar el material.

Si existe un desequilibrio en la homogeneidad de la aplicación del consolidante, pueden crear tensiones -esto se llama efecto tampón o sello-.

Algunos de ellos pueden ser tóxicos durante su aplicación o eliminación, porque se deben usar disolventes.

En los soportes porosos como la celulosa, pueden llegar a ser irreversibles porque se introducen entre los intersticios de las fibras.

Por otra parte, muchos de ellos, con el tiempo, se vuelven quebradizos, muy rígidos, ácidos, se debilitan, amarillean y pierden su función sustentadora. Por este motivo los papeles tienen que ser tratados de nuevo, lo que les perjudica.

Por lo tanto, los procesos y materiales de consolidación que existen hoy en día en el mercado, provocan una gran insatisfacción generalizada en los restauradores.

Y por esta razón se buscó una alternativa y se decidió centrar la investigación en la hipótesis de que se podía suplantar el uso de consolidantes por alguna enzima. Ésta debía crear enlaces glucosídicos en las fibras de celulosa del papel y reforzar de esta manera este material desde el interior, sin introducir ningún material invasor que pudiese perjudicarlo a la larga.

## Antecedentes

Las enzimas se han utilizado en restauración desde hace décadas en Europa y resto del mundo.

Sheridan<sup>[17]</sup> como se ha mencionado anteriormente, usó por primera vez la enzima tripsina en 1962, para limpiar adhesivos proteicos. Sin embargo no se volvió a publicar nada sobre la aplicación enzimática en restauración hasta la década siguiente cuando Wendelbo y Fosse<sup>[18]</sup>, decidieron aplicar una enzima proteolítica en el mundo de la restauración. Esto ocurrió en 1970 y a partir de ahí hubo que esperar otra década hasta el comienzo de los múltiples estudios que se han realizado en el campo de la enzimología aplicada a la restauración.

Los estudios más destacados son por ejemplo, los de Segal y Cooper que aplicaban la  $\alpha$ -amilasa para retirar la pasta adhesiva de almidón, o la tripsina cuando los adhesivos de restauraciones antiguas eran de naturaleza proteica.

Banik<sup>[19,20]</sup> por su lado, tras varios años de estudios, creó una compresa de amilasas lista para utilizar en manuscritos de papel.

Otra investigadora es Ariane De La Chapelle, quien ha desarrollado diferentes aplicaciones para las enzimas; como por ejemplo el artículo escrito por ella y Patrick Choisy donde demostraron que era posible eliminar las manchas de foxing con peroxidases fúngicas en un medio acuoso sin utilizar métodos químicos.

En otro artículo de Ariane de La Chapelle *et al.*<sup>[21]</sup>, desarrollaron un método simple y fácil para detectar la presencia mínima de cola.

---

<sup>17</sup> SHERIDAN, J., "Enzymes, as they relate to the conservator of paintings", *exposition of painting conservation, Brooklyn Museum*, 1962.

<sup>18</sup> WENDELBO, O., FOSSE, B., "Protein "Surgey" A Restoring Procedure Applied on Paper" *Restaurator press* Vol. 1, , Denmark, 1970, pp. 245-248.

<sup>19</sup> BANIK, G., "Removal of Starch paste adhesives and relinings from paper vased objects by means of Enzyme poultices" *Materiali tradizionali ed innovativi nella pulitura dei dipinti e delle opere policrome mobili: atti del primo congresso internazionale colore e conservazione, Piazzola su Brenta (PD)*, 25-26 ottobre 2002, Ed. Il Prato, Padova, 2003, p.33-38.

<sup>20</sup> BANIK, G, CREMONESI, P.; LA CHAPELLE, A.; MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo* Il Prato, Padova, 2003.

<sup>21</sup> LA CHAPELLE, A; CHOISY, P; GALLO, F; LEGOY, D. «Emploi d'amylases et de protéases pour la restauration d'arts graphiques» *Materiali tradizionali ed innovativi nella pulitura dei dipinti e delle opere policrome mobili: atti del primo congresso internazionale colore e conservazione, Piazzola su Brenta (PD)*, 25-26 ottobre 2002, Ed. Il Prato, Padova, 2003.

Paolo Cremonesi también ha estudiado mucho este tipo de proteínas, y así lo demuestra en el libro <sup>[22]</sup> que ha publicado sobre el empleo de enzimas en limpiezas de pinturas policromas o en el artículo publicado junto a Roberto Bellucci y Ginebra Pignagnoli <sup>[23]</sup> donde demostraban de forma experimental que las lipasas eran capaces de hidrolizar sustratos no grasos como las películas acrílicas de Paraloid® B - 72.

Richard Wolbers creó gel con lipasas para eliminar capas de óleo sobre capas de resina natural.

En el ámbito español también existen investigadores que han publicado artículos de enzimas. Nieves Valentín <sup>[24]</sup>, Andrés Sánchez e Isabel Herraiz publicaron la utilización de una mezcla de lisozimas en un gel de agarosa que servía para desinfectar y limpiar los cristales de unas vidrieras infestadas de *Bacillus Subtilis*. Isabel Blasco Castiñeyra ha estudiado estos últimos años el uso de enzimas proteolíticas <sup>[25]</sup>.

La consolidación de la celulosa en restauración, siempre se ha efectuado mediante consolidantes naturales, sintéticos o mezcla de ellos <sup>[26]</sup>. El uso de enzimas para tal efecto en restauración de obras de arte es algo innovador. No obstante, en el ámbito de las ciencias químico-biológicas, se encuentran bastantes artículos relacionados con la síntesis de la celulosa mediante bacterias

---

<sup>22</sup> CREMOSI, Paolo *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome* Ed. Il prato, Padova, 2002.

<sup>23</sup> 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, pp. 278-281.

<sup>24</sup> 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, 1996, pp. 851-856.

<sup>25</sup> BLASCO I., DE LA VIÑA S., SAN ANDRÉS M., "La utilización de enzimas proteolíticas en procesos de limpieza de policromías. Importancia de la realización de estudios previos de caracterización de los preparados enzimáticos" *XV Congreso de Conservación y Restauración de Bienes Culturales*, Murcia, 2004, pp.203-212.

BLASCO I., DE LA VIÑA S., SAN ANDRÉS M., "Fundamentos y antecedentes de la utilización de enzimas en tratamientos de limpieza" *PH53 Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*, 53 especial criterios, 2005, pp.24-34.

<sup>26</sup> BAKER, C.A. "Methylcellulose et carboxymethylcellulose sodique: Étude par vieillissement accéléré des propriétés pour la conservation du papier » *IIC Xe Congrès International Paris 2-7 Septembre 1984*, SFIIC, Paris, 1984, p.53-57.

[27, 28, 29 y 30] o también mediante el uso de enzimas como la “*cellulose synthase*” que es capaz de biosintetizar la celulosa<sup>[31]</sup> y la enzima hidrolítica celulasa<sup>[32,33, 34]</sup> que biocataliza la síntesis de la celulosa en presencia del acetonitrilo. La utilización de una mezcla de un disolvente y un sustrato específico ( $\beta$ -cellobiose fluoride), provoca que esta enzima trabaje a la inversa de su naturaleza hidrolítica [Figura 2], creando uniones glucosídicas en el papel degradado [Figura1].

Estas dos enzimas tienen varios inconvenientes. La primera, la “*cellulose synthase*” es difícil de conseguir o hay que sintetizarla en un laboratorio, por lo que poner en marcha una investigación o cualquier restauración, sería económicamente inviable.

Por otro lado, la celulasa es fácil de conseguir y utilizar pero, el acetonitrilo es un disolvente tóxico y esta enzima en un momento dado puede hidrolizar y degradar la celulosa. Por lo tanto, se debía cambiar el disolvente para disminuir al máximo la toxicidad del tratamiento y conseguir que estas enzimas no actuaran nunca como hidrolasas.

---

<sup>27</sup> MÉNDEZ M., MEMBRILLO J., “Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias” *Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas* Vol. 7, nº 001, México, 2004, pp.26-34.

<sup>28</sup> CHÁVEZ- PACHECO J.L., *et al.* « Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter Xylinum*: Biosíntesis y Aplicación”, *Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas* Vol. 7, nº 001, México, 2004, pp.18-25.

<sup>29</sup> SHODA M, SUGANO Y., “Recent Advances in Bacterial Cellulose Production” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vol.10, nº1, 2005, pp.1-8.

<sup>30</sup> CHAWLA P.R., *et al.* « Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications”, *Food Technology Biotechnology* Vol. 47, nº2, 2009, pp.107-124.

<sup>31</sup> <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/ongres/tspires/cellulose.htm>

<sup>32</sup> KOBAYASHI S., SHODA S., “Chemical síntesis of cellulose and cello-oligomers using a hydrolysis enzyme as a catalyst” *Int. J. Biol. Macromol.* Vol. 17 nº 6, 1995, pp.373-379.

<sup>33</sup> SHODA S., FUJITA, M., KOBAYASHI S., “Glycanase-Catalyzed Synthesis of Non-natural Oligosaccharides” *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* Vol.10 No. 54, 1998, pp.279-289.

<sup>34</sup> SHODA S., KOHRI M., KOBAYASHI S., “Glycosidase-catalyzed synthesis of oligosaccharides through intermediate analogue substrates”. *Chemistry and Biology Research Signpost Kerala, India*, 2005.

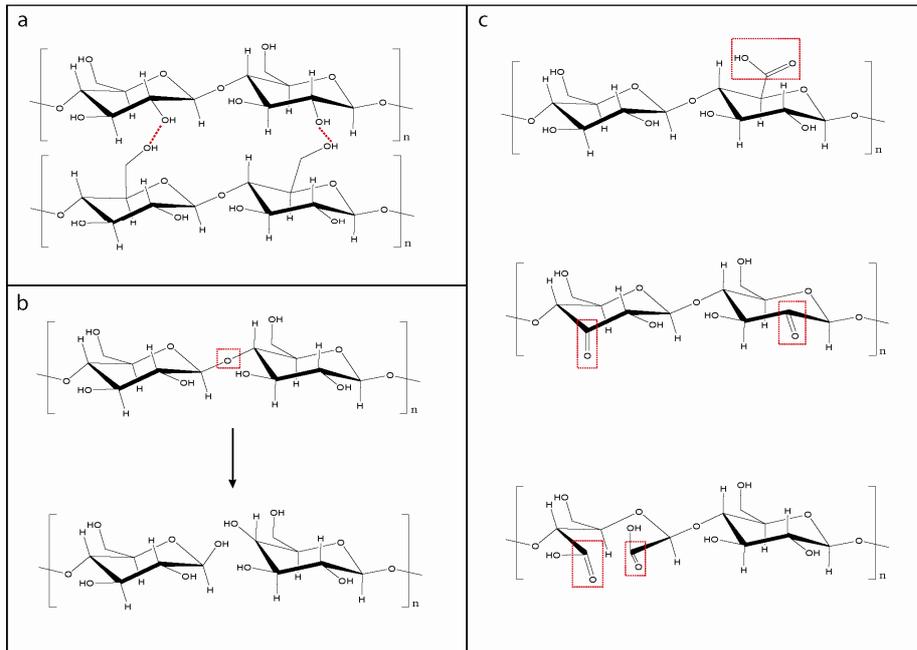


Figura 1 a) Estructura de los polímeros de homosacáridos y puentes de hidrogeno (en rojo) de las fibras de celulosa, b) hidrólisis que se produce durante el envejecimiento de las fibras de celulosa y c) posible reacción de oxidación de las fibras de celulosa.

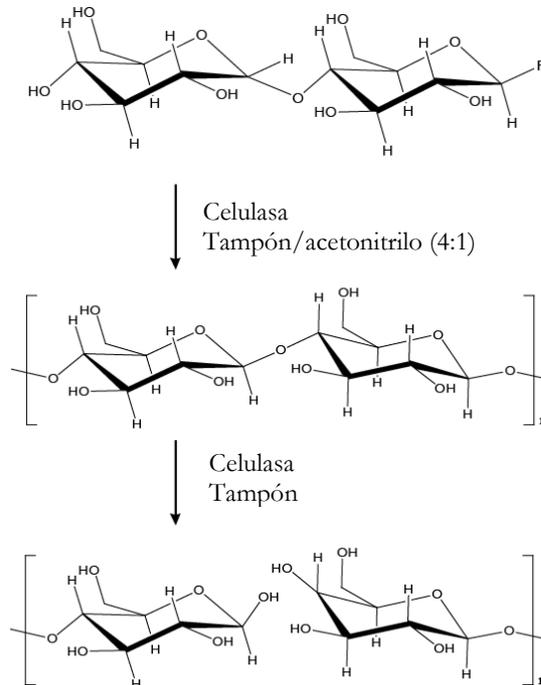


Figura 2. Las dos posibles reacciones que se pueden producir por la catálisis de las celulasas que dependen de la solución utilizada.

## Hipótesis de trabajo y objetivos

Por una parte, la hipótesis principal de esta Tesis es que se pueden consolidar soportes celulósicos, como el papel, con enzimas. Las fibras se reforzarían creando enlaces glucosídicos sin tener que añadir ningún material extraño a los soportes de muchas obras de arte.

La aplicación de los consolidantes tóxicos sería limitada a casos puntuales y sólo cuando fuera realmente necesario.

En el caso que fuera posible nuestra hipótesis, se lograría un avance en el campo de la Restauración y Consolidación de las Obras de Arte, porque sería una alternativa novedosa, potencialmente favorable para el Patrimonio, con materiales biológicos o más inocuos –como son las enzimas–.

Reforzaríamos las fibras de celulosa sin añadir ningún agente extraño que pudiera ser perjudicial para su conservación en un futuro.

Dotaríamos de mayor fuerza y resistencia a la fibra. De esta manera la podríamos manipular sin temor.

No aplicaríamos adhesivos (naturales o sintéticos, tóxicos o inocuos) si no fuera estrictamente necesario.

Por otra parte, los objetivos que se plantean en esta tesis son:

- Profundizar en los conocimientos de biotecnología sobre enzimas y sus características.
- Conocer el estado de la cuestión: Búsqueda de información sobre la utilización actual de las enzimas en procesos de restauración y conservación de obras de arte.
- Investigación de las características, la patología y métodos de consolidación de los soportes celulósicos.
- Averiguar las partes positivas y negativas de los tratamientos históricos, materiales y técnicas de consolidación.

- Búsqueda de un método seguro y funcional para la consolidación de materiales celulósicos con enzimas.
- Aplicación de métodos de análisis científicos para la identificación del envejecimiento de los soportes celulósicos.
- Puesta en marcha de un protocolo mediante enzimas para ver la degradación de materiales celulósicos.
- Colaborar con diferentes laboratorios científicos en España y el extranjero según nuestras necesidades.