

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, el saber dudar a tiempo.

Aristóteles

MÉTODO DE CONOCIMIENTO DE LA DEGRADACIÓN DEL PAPEL

Uno de los objetivos principales de esta investigación era la consolidación de la celulosa. Pero antes de poder abarcar este tema en profundidad, se debía emplear técnicas de reconocimiento del estado del papel. Para esto, se emplearon un test enzimático con glucosa oxidasa en Roma y se desarrolló otro método enzimático en Lyon, para poder llevar a buen término este proyecto de consolidación celulósica.

I Método enzimático en Roma

En el laboratorio de Química de la Universidad de “La Sapienza” en Roma, se tuvo en primer lugar, que envejecer varios papeles y posteriormente, medir su degradación con un electrodo de Clark ^[431] y la enzima glucosa oxidasa ^[432]. Los papeles empleados “extra strong” fueron envejecidos de tres formas diferentes:

1. Con una máquina de envejecimiento acelerado “veterometro” ^[433] durante 6 horas.
2. Con la Polilight® (UVA) y un catalizador (TiO₂) durante 6 horas.
3. Con ácido clorhídrico HCl 0.1 mol/L durante 30 minutos.

Posteriormente, se utilizó un sistema enzimático y el electrodo de Clark para conocer si el papel había sido degradado e intentar posteriormente consolidarlo con un sistema experimental. El único inconveniente que tiene este tipo de test con la glucosa oxidasa y el electrodo de Clark es que es destructivo y se tarda un día en obtener los resultados.

⁴³¹ El electrodo de Clark lee la difusión gaseosa de oxígeno gracias a un electrodo amperométrico

⁴³² Ver el método en la parte de métodos.

⁴³³ Veterómetro es la palabra italiana que designa la cámara de envejecimiento. Hemos decidido no poner el acento sobre la ó (de veterómetro) porque deseamos escribirla en su idioma original.

I.1 Resultados del test enzimático de Glucosa Oxidasa y el electrodo de Clark

Los siguientes gráficos muestran los resultados obtenidos en la prueba con el electrodo de Clark y la glucosa oxidasa en las muestras de papel.

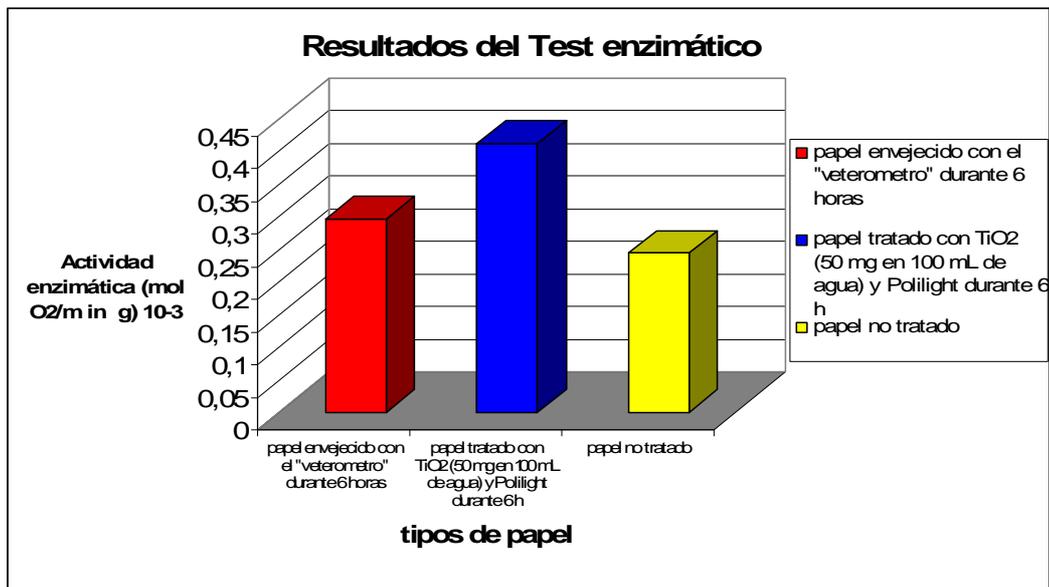


Gráfico 1. Resultados del test enzimático con el electrodo de Clark. El aumento de la actividad enzimática es signo de mayor degradación del papel. Los tratamientos de envejecimiento acelerado han envejecido correctamente los papeles.

Se observa una clara degradación de los papeles envejecidos aceleradamente (rojo y azul), si se compara con el papel de referencia que no ha sido tratado (en amarillo). Existe una clara diferencia entre los papeles envejecidos con el “veterómetro” y el TiO₂. Queda claro que el dióxido de titanio es un catalizador de la degradación del papel. Ahora queda esperar los resultados después del tratamiento para saber si el papel es consolidado.

Este gráfico demuestra la eficacia y sensibilidad del sistema para conocer el estado de degradación de los materiales celulósicos. Se observa la existencia de variación de la degradación en los diferentes papeles según el método de envejecimiento acelerado empleado.

II Métodos enzimáticos empleados en el laboratorio de Lyon

La primera parte de la investigación realizada en Lyon estaba basada en la búsqueda de un método enzimático para conocer la degradación de la celulosa. De esa manera se podía saber si el envejecimiento acelerado que se realizaba a los papeles era efectivo. Posteriormente, este sistema revelaría si el método enzimático de consolidación de celulosa funcionaba o no.

Como se ha mencionado con anterioridad en el capítulo de Materiales y Métodos, los sistemas enzimáticos miden los grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) que se forman con los años en los materiales celulósicos. En Lyon se creó otro sistema enzimático para conocer la degradación del papel con la enzima peroxidasa histidina (HRP-His) -en vez de glucosa oxidasa- y la cámara CCD de Fujifilm ^[434]. Para ello, tuvimos que ir experimentando poco a poco hasta llegar a unos resultados más o menos convincentes.

II.1 Primer método experimental de medida del envejecimiento del papel con enzimas glucosa oxidasas (GOD).

Los primeros intentos para conseguir un método de medida del envejecimiento del papel con enzimas, estaban basados en la aplicación de la enzima glucosa oxidasa (GOD) y sacar posteriormente una fotografía con ayuda de la cámara CCD. Teóricamente cuanto más negra sale la fotografía, más grupos carboxílicos están presentes en el papel, lo que significa que está más degradada la celulosa.

⁴³⁴ Los detalles sobre utilización y funcionamiento de la cámara CCD están descritos con anterioridad.

II.1.1 Primera fotografía con la cámara CCD y con una concentración de GOD de 1mg/ml.

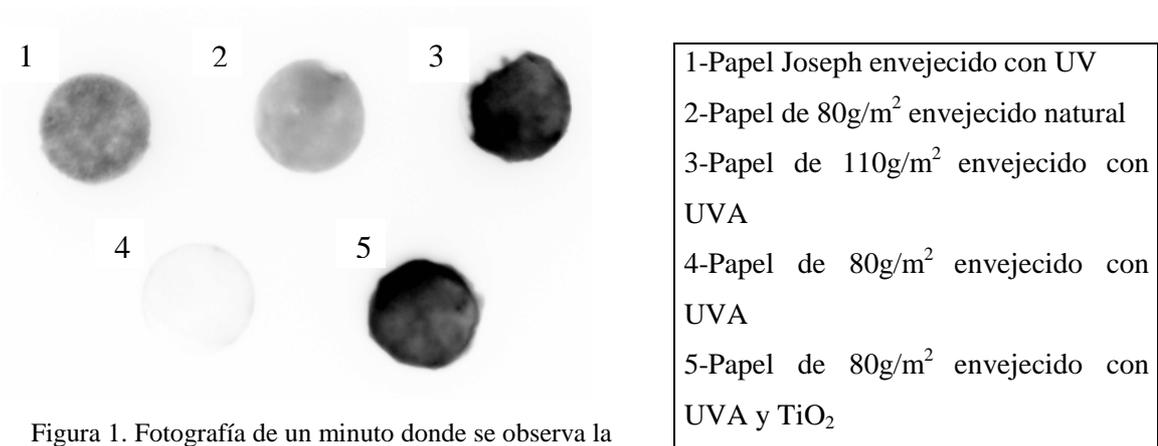


Figura 1. Fotografía de un minuto donde se observa la diferencia de degradación.

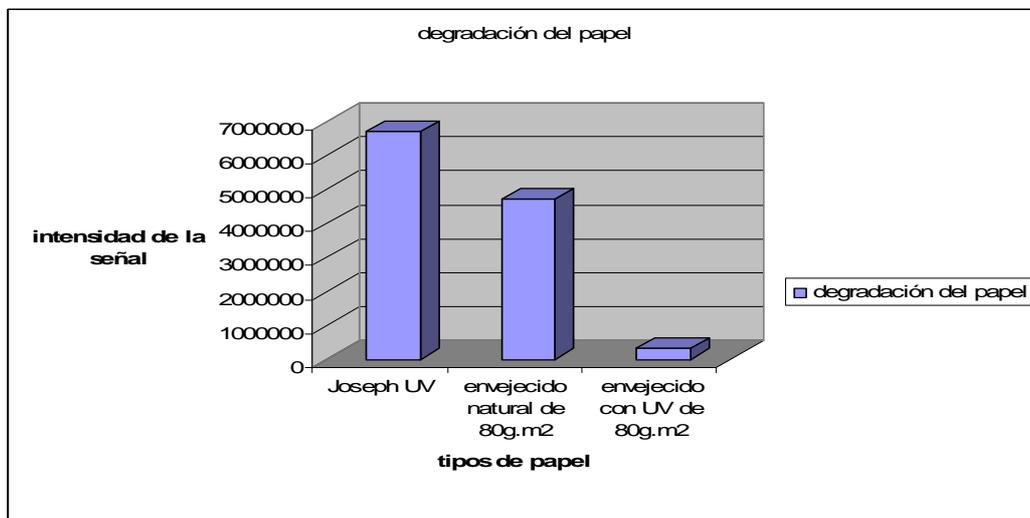


Gráfico 2. Gráfico del primer test

El gráfico de los tres papeles menos degradados, deja observar que la degradación efectuada al papel de 80 g/m² es insuficiente para medirlo con la cámara CCD.

En la fotografía se ven ciertas diferencias con el verdadero estado del papel. El papel envejecido de forma natural estaba en un estado de degradación bastante superior al resto de papeles, sin embargo en la fotografía aparece menos degradado. Por otra parte el papel de 80g/m² casi no aparece. Puede que la solución enzimática se haya

inhibido por alguna razón o que sea un error a la hora de la manipulación de la técnica.

II.1.2 Variación de la concentración de GOD (1 mg/ml) en el test enzimático

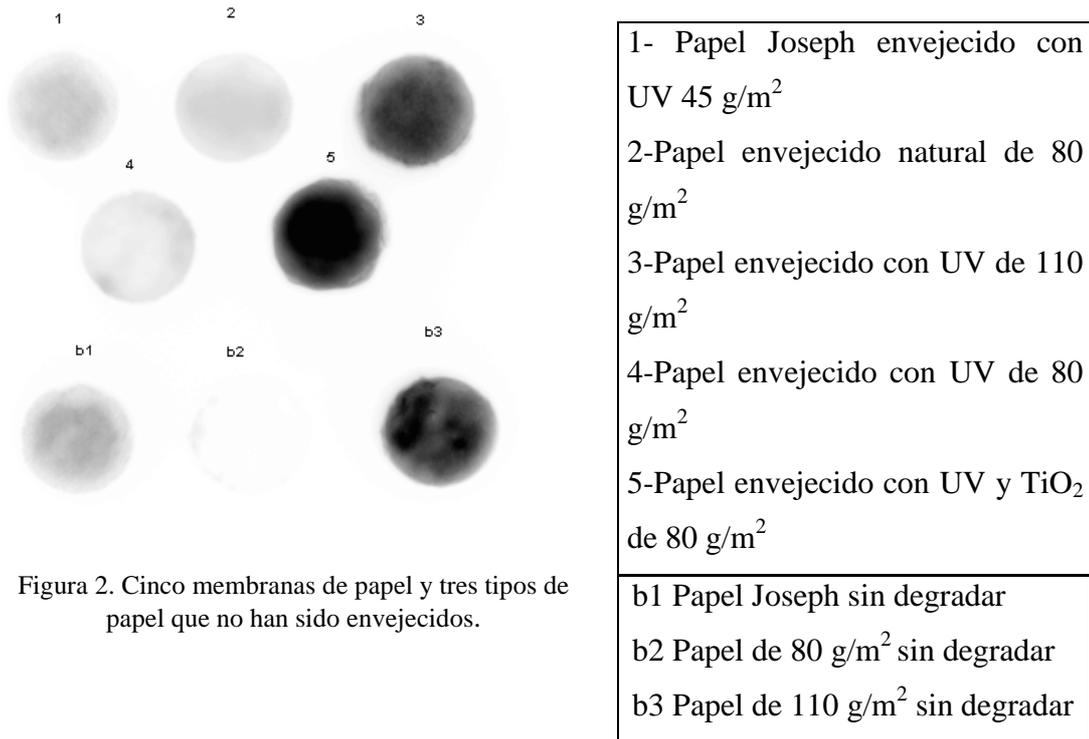


Figura 2. Cinco membranas de papel y tres tipos de papel que no han sido envejecidos.

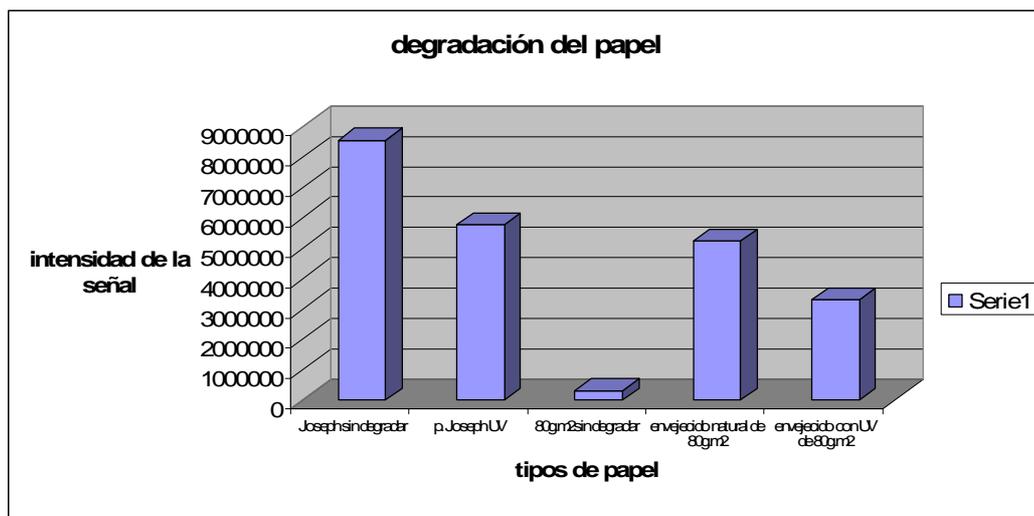


Gráfico 3. Gráficos de los resultados del test

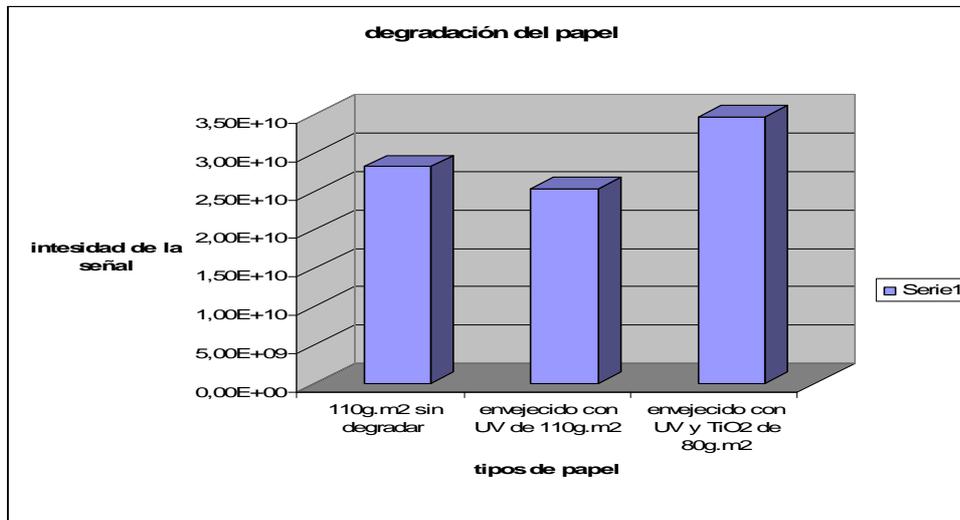
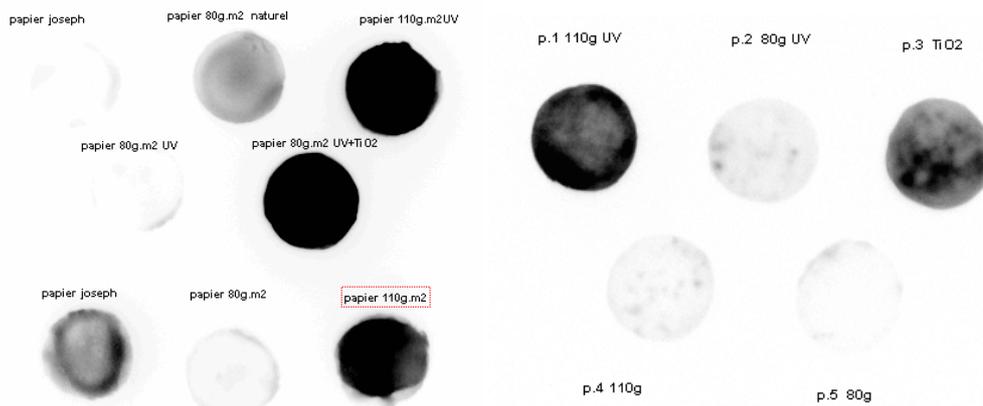


Gráfico 4. Gráficos de los resultados del test

Esta vez los resultados parecen estar más acordes con el estado del papel. A pesar de esto, se continuará investigando para mejorar este sistema y conseguir que sea totalmente efectivo. Para ello, se variará la concentración de glucosa oxidasa, como se ve en las siguientes fotografías de un minuto de exposición en la cámara CCD:

II.1.3 Variación de la concentración de GOD (de 0,2 mg/ml.)



Figuras 3 y 4. Exposición de 1 minuto en la cámara CCD

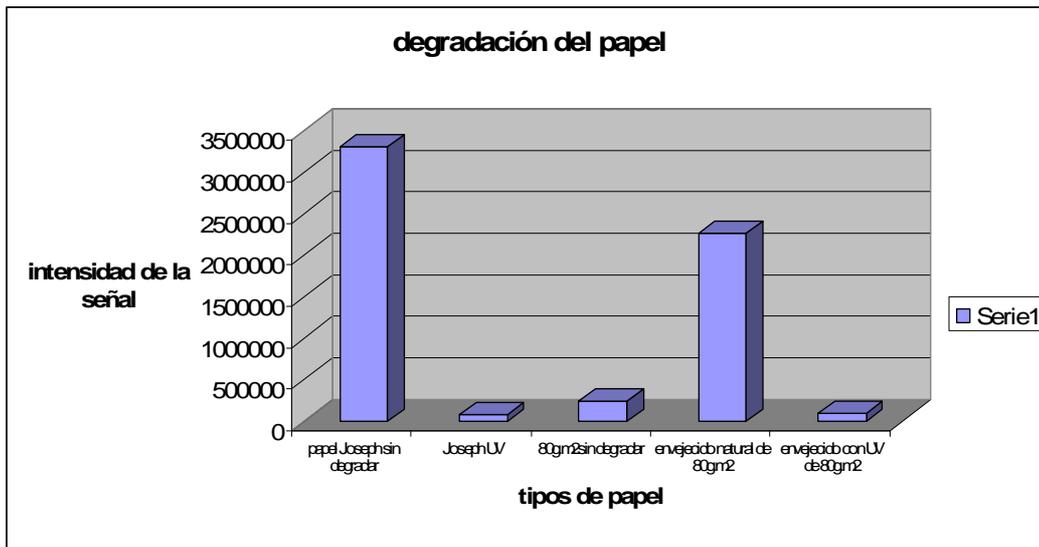


Gráfico 5. Gráfico del test enzimático

Los resultados obtenidos no son del todo satisfactorios. Por alguna razón que se desconoce, sobre algunos papeles, la enzima GOD no tiene efecto y sobre otros papeles reacciona demasiado.

Como se puede observar, el papel sin degradar de 110g/m² aparece muy degradado.

II.1.4 Diferente exposición de rayos UVA para el envejecimiento acelerado de nuestros papeles

La siguiente prueba consiste en testar la evolución de la degradación en 12 fragmentos de papel envejecidos progresivamente con rayos ultravioletas. Cada papel había recibido 30min más de radiación ultravioleta. Después de ver la fotografía de la cámara CCD, se observará la tabla de datos que se obtienen con este sistema y se verá cómo cuantificamos los resultados.

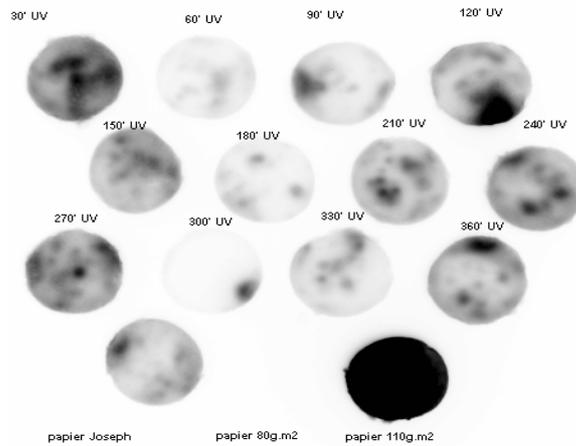


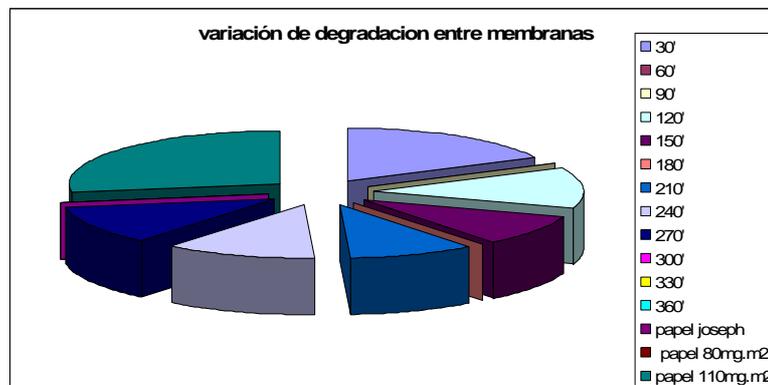
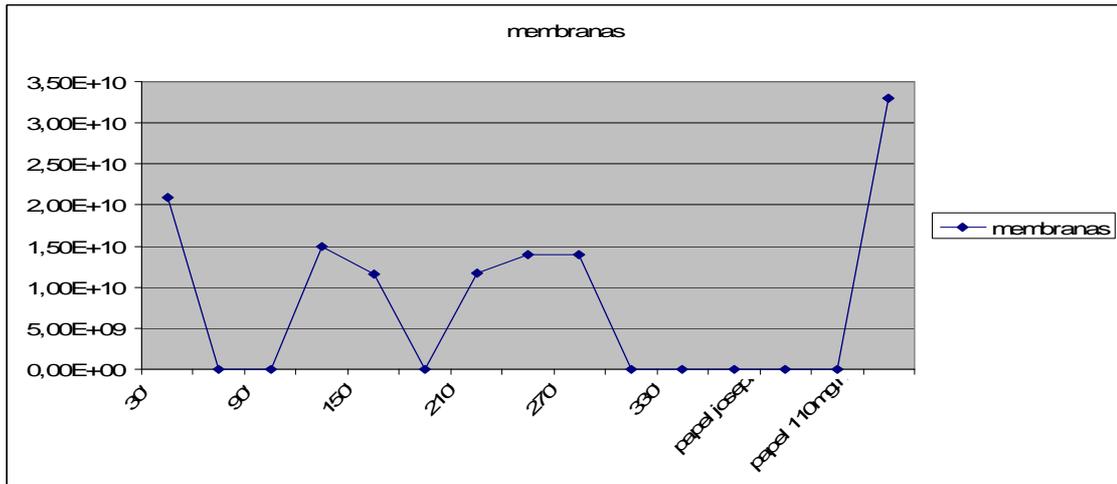
Figura 5. Fotografía de 5min de exposición en la cámara CCD de papeles degradados con UV y 3 membranas sin degradar

- Cuantificación de los resultados

Los siguientes resultados son la cuantificación de la imagen fotográfica de la cámara CCD. De esta manera nos permite ver con más claridad la actividad enzimática sobre cada membrana de papel.

NO.	AU	Área (mm2)	AU-BG	Ratio	% of Grp	AU/mm2	(A-B)/mm2	Min.	Max.	S.D.
1	2.102e+007	55.16	2.093e+007	-----	13.59	380961.17	379334.12	4688.00	16122.00	2345.85
2	3385259.00	55.16	3295505.00	-----	2.14	61367.52	59740.47	625.00	4326.00	823.78
3	4196031.00	55.16	4106277.00	-----	2.67	76065.08	74438.03	814.00	8440.00	1220.97
4	1.505e+007	55.16	1.496e+007	-----	9.72	272868.36	271241.31	2406.00	16130.00	4256.77
5	1.163e+007	55.16	1.154e+007	-----	7.50	210809.48	209182.43	2624.00	10417.00	1871.85
6	3183288.00	55.16	3093534.00	-----	2.01	57706.21	56079.16	667.00	5421.00	965.06
7	1.176e+007	55.16	1.167e+007	-----	7.58	213135.79	211508.74	2464.00	12826.00	2283.62
8	1.407e+007	55.16	1.398e+007	-----	9.08	255081.33	253454.28	3323.00	13211.00	2213.11
9	1.402e+007	55.16	1.393e+007	-----	9.05	254206.34	252579.29	3723.00	14658.00	1710.27
10	1159182.00	55.16	1069428.00	-----	0.69	21013.49	19386.45	261.00	7456.00	698.45
11	5970091.00	55.16	5880337.00	-----	3.82	108225.00	106597.95	1235.00	6225.00	1183.08
12	9564454.00	55.16	9474700.00	-----	6.15	173383.13	171756.08	2406.00	14108.00	2029.82
13	6925711.00	55.16	6835957.00	-----	4.44	125548.35	123921.30	1655.00	8990.00	1306.49
14	284457.00	55.16	194703.00	-----	0.13	5156.60	3529.55	86.00	241.00	28.53
15	3.307e+007	55.16	3.298e+007	-----	21.42	599427.17	597800.12	16092.00	16135.00	3.75
16	89754.00	55.16	-----	-----	-----	1627.05	-----	18.00	83.00	9.86B

Tabla1. Datos para la cuantificación de las imágenes sacadas con la cámara CCD



Gráficos 6 y 7. Gráficos de la variación de la degradación

II.1.5 Nuevo proceso de lavados en el test enzimático para la medida de degradación de la celulosa.

Los resultados obtenidos hasta ese momento no mostraban con exactitud el envejecimiento real de los papeles. A partir de ese momento variamos el protocolo de actuación antes de las medidas de este método y a veces después. Los papeles fueron lavados después (o antes) de ponerlos en contacto con las enzimas. Empleamos papeles envejecidos en Roma para comparar nuestro test enzimático con el de Roma.

II.1.5.1 Nuevo proceso (lavado después de la enzima):

- Aplicación:

Deposición de 50 μ L de GOD (Glucosa Oxidasa) sobre cada fragmento de papel durante 1 hora. La concentración de la enzima GOD será diferente según nuestras necesidades variando de 5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,2 mg/ml hasta 0,04 mg/ml.

- Lavado:

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

- Resultados de la cámara CCD

Resultados para una deposición de enzima con una concentración de 0,04mg/ml. Los resultados son los siguientes:

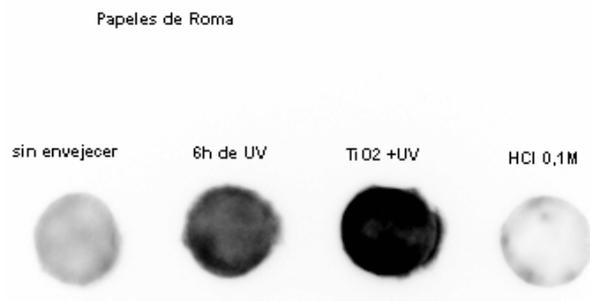


Figura 6. Fotografía CCD de 1minuto de exposición.

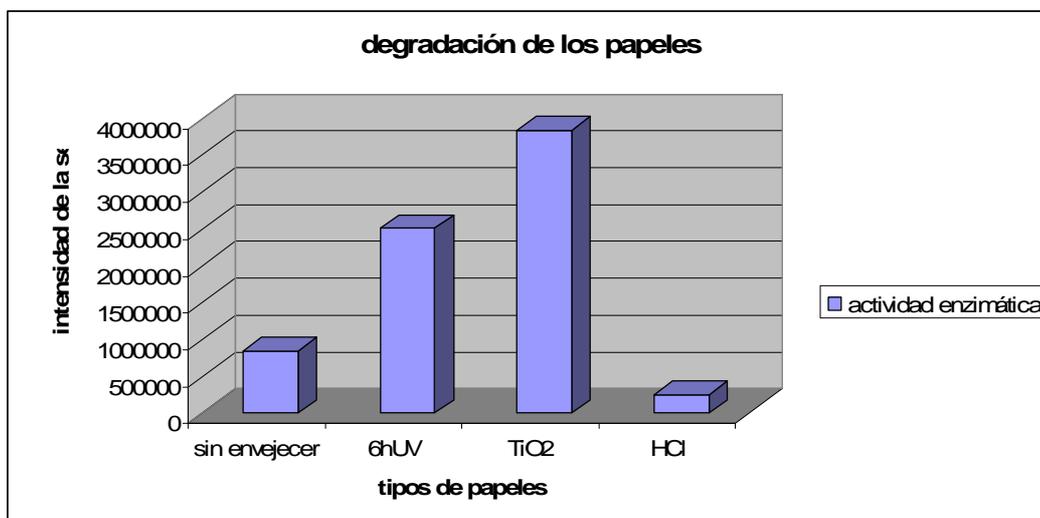


Gráfico 8. Gráfico con los resultados del test

Según se observa, el resultado del ácido clorhídrico no debería ser así. Por lo tanto, este sistema debe ser mejorado hasta obtener un sistema efectivo. No obstante, se repitió el mismo sistema tiempo después para contrarrestarlo con otros.

- Repetición de los análisis tiempo después

Tiempo después a la aplicación de la enzima glucosa oxidasa, como sistema de conocimiento de la degradación del papel, se repitió con el mismo protocolo que el anterior descrito: Se aplicó la enzima GOD y se realizaron dos lavados durante 15 minutos, con el tampón fosfato 0,1M pH 7.

- Resultados:



Figura 7. Fotografía con los papeles con GOD y 1min de exposición

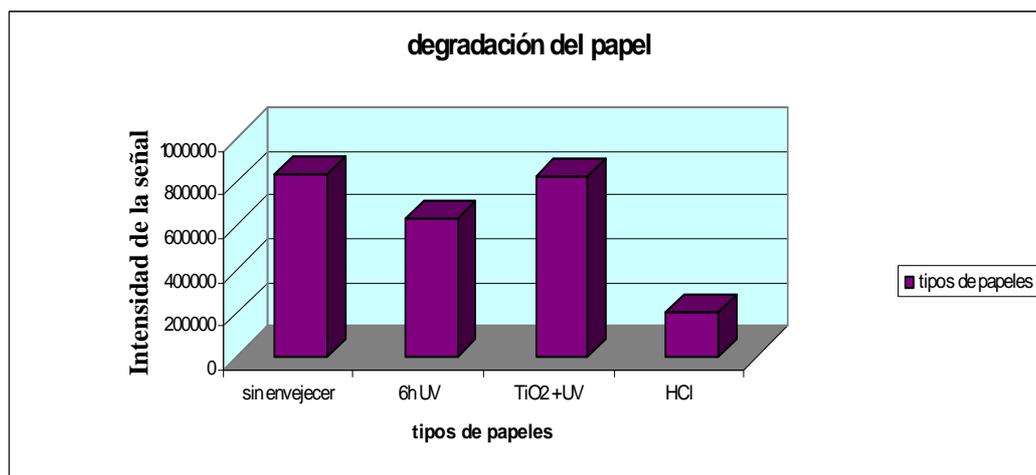


Gráfico 9. Gráfico de los resultados

Se observa que los resultados son los mismos excepto para el papel sin envejecer, que aparece muy oscuro, es decir, muy deteriorado. Esto puede ser debido a una contaminación ambiental del laboratorio de enzimología. En pruebas posteriores se

comparan papeles guardados al vacío y otros al aire libre y su resultado con el test enzimático.

II.1.5.2 Comparativa del mismo proceso pero sin lavado previo.

Algo sucedía para que los resultados fueran tan erróneos. Por esa razón, se decidió no realizar el lavado y comparar los resultados entre los dos sistemas.



Figura 8. Papeles sin lavar antes de depositar 0,04mg/ml de GOD. Foto de un minuto de exposición en la cámara CCD

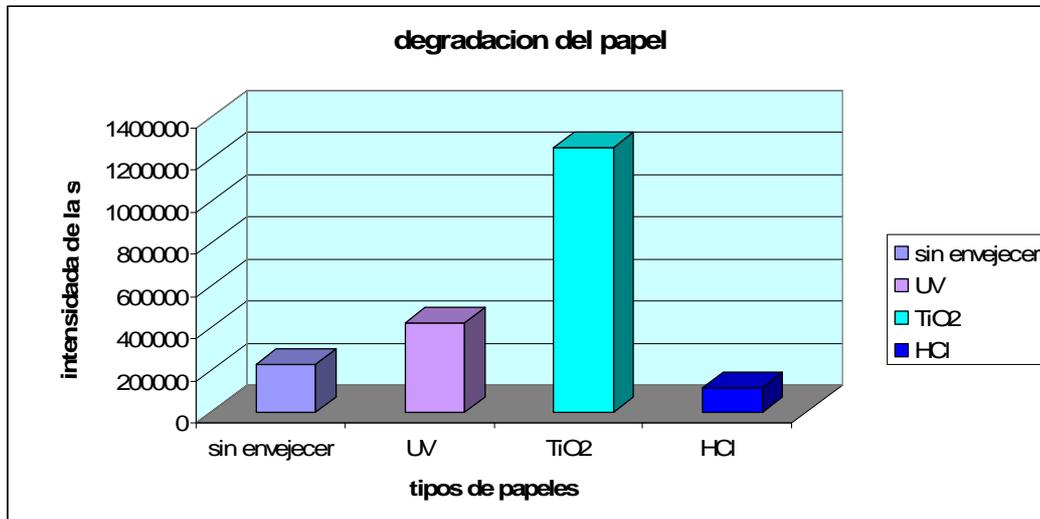


Gráfico 10. Gráfico de los resultados

Los resultados en ambos casos (con lavado y sin lavado) son prácticamente similares y parecidos a los resultados obtenidos en Roma. No obstante, este sistema no funcionó en los papeles envejecidos con el ácido clorhídrico. Suponemos que el pH del papel puede reducir la actividad enzimática al ser inferior a pH 4, es decir inferior al pH óptimo para la actividad enzimática de la glucosa oxidasa.

II.1.5.3 Lavados antes y después de la deposición de la enzima:

En pruebas posteriores se realizó la comparativa entre los papeles lavados y sin lavar durante 20 minutos con en el tampón Fosfato 0,1 M pH7 y NaCl 1 M, y posteriormente sólo con tampón fosfato 0,1 M durante 20 min. De esta manera se averiguaba cuál de los métodos era mejor para este test.

- Resultados con una concentración de 0,2 mg/ml de enzima GOD:

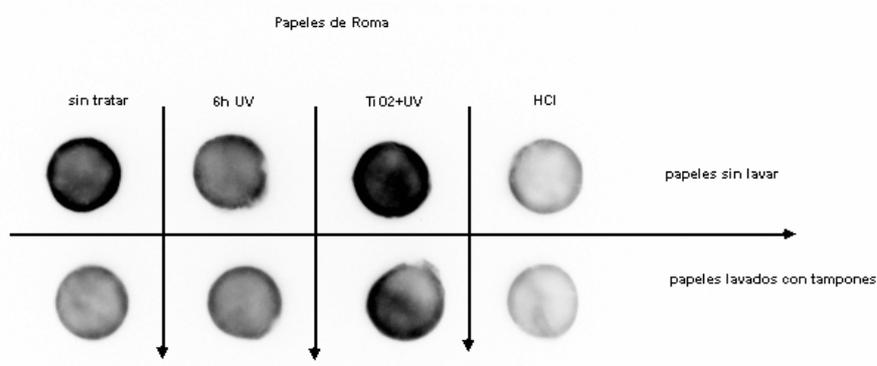


Figura 9. Fotografías CCD de 1 minuto de exposición y 0,2 mg/ml de GOD

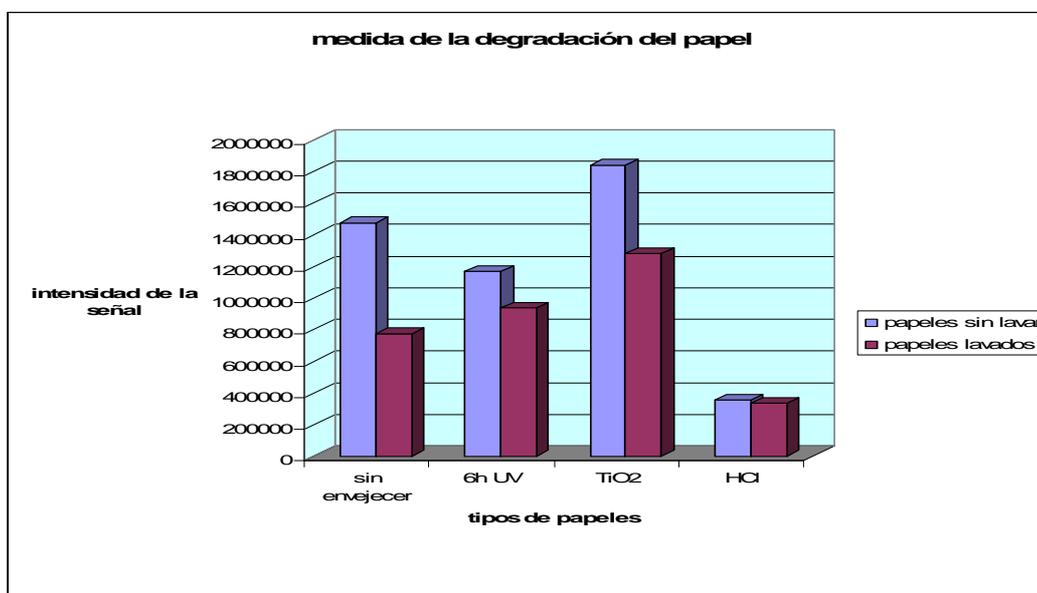


Gráfico 11. Gráfico de los resultados de los papeles lavados y sin lavar. Se observa que sigue sin ser exacto el método enzimático para conocer la degradación del papel.

II.2 Método con la enzima peroxidasa HRP

El método de medida fallaba para los papeles envejecidos artificialmente con ácido clorhídrico (HCl). Por este motivo, se sustituyó la enzima glucosa oxidasa por la peroxidasa. El protocolo para esta enzima fue exactamente el mismo que con la enzima GOD, siendo los papeles lavados antes y después de aplicar la enzima.

- Primeros resultados del test con peroxidasa

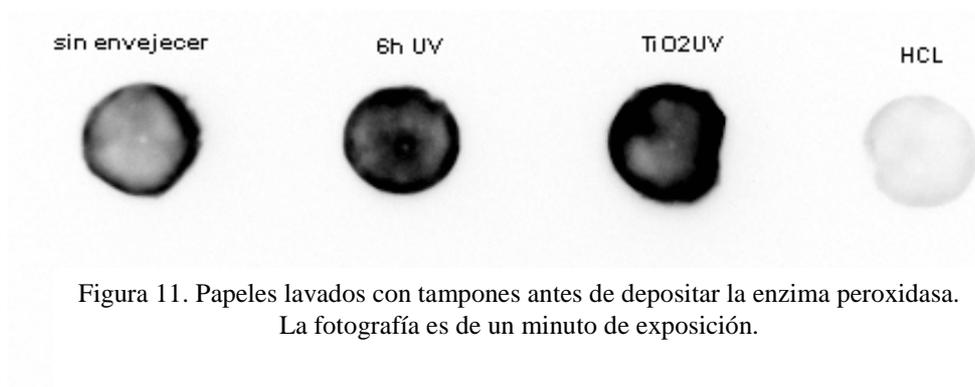


Figura 11. Papeles lavados con tampones antes de depositar la enzima peroxidasa. La fotografía es de un minuto de exposición.

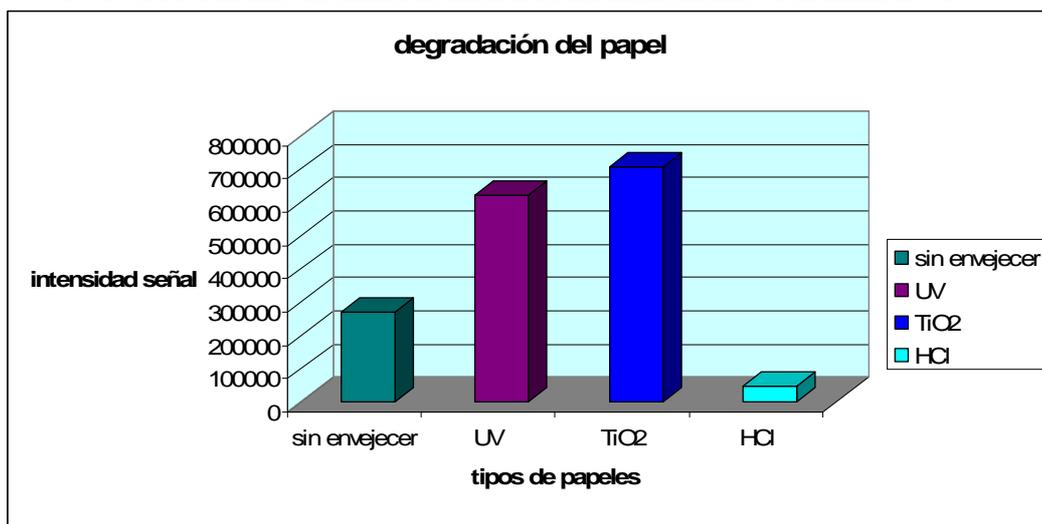


Gráfico 12. Gráficos de los primeros resultados del test con peroxidasa

○ **Observaciones**

Los resultados obtenidos con la glucosa oxidasa y la peroxidasa son similares a los logrados en Roma excepto en los papeles envejecidos con ácido clorhídrico. Los gráficos revelan que los lavados son necesarios para obtener unos resultados adecuados, pero éstos son insuficientes para conseguir que el test funcione con papeles degradados químicamente y con un pH muy ácido. Estos resultados provocaron que se planteara otra vez, la variación en el protocolo del método enzimático.

II.2.1 Variación en el protocolo del método enzimático con peroxidasa.

Fase de activación.

Debido a la poca exactitud de los resultados para el papel envejecido con ácido clorhídrico, se decidió emplear una mezcla de sustancias que sirvieran de puente entre el papel y la enzima peroxidasa. Este puente será denominado fase de activación.

El protocolo a seguir es el siguiente:

- Lavados:

Los lavados son exactamente los mismos que en procesos anteriores, es decir, lavado de 20 minutos con en el tampón Fosfato 0,1M pH7 y NaCl 1M, y posteriormente sólo con tampón fosfato 0,1M durante 20 min.

- Activación:

Esta fase consiste en depositar sobre cada fragmento de papel 50µL de una solución de EDC 50nM y de NHS ^[435] 50nM durante media hora, funcionando de puente entre

⁴³⁵ EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N ethylcarbodiimide hidrohchloride) NHS (N-hydroxysuccinimide)

la enzima y los grupos de ácido carboxílico que han sido formados tras la oxidación del papel.

- Lavado:

Después de la activación, las membranas se lavaban durante 10 minutos con agua destilada.

- Inmovilización de la enzima:

Posteriormente, se deposita sobre cada membrana de papel 50 μ L de peroxidasa con una concentración de 0,04 mg/ml. Este proceso durará una hora. El tampón empleado para la solución enzimática es el tampón carbonato 0,1 M pH 9.

- Lavados:

Los lavados de los fragmentos de papel serán efectuados dos veces el tampón fosfato 0,1 M pH 7 durante 15 minutos cada lavado.

- Medidas:

Antes de depositar las membranas dentro de la caja negra de la cámara, se depositará 50 μ L de una solución ^[436] con luminol previamente preparada.

- Resultados:



Figura 12. Papeles lavados y activados antes de la aplicación de peroxidasa.
Fotografía de 1minuto en la cámara CCD.

⁴³⁶ Solución compuesta por 1 mL de tampón VBS, 5 μ L de H₂O₂, 40 μ L de Luminol y 20 μ L de p-iodofenol 10 nM.

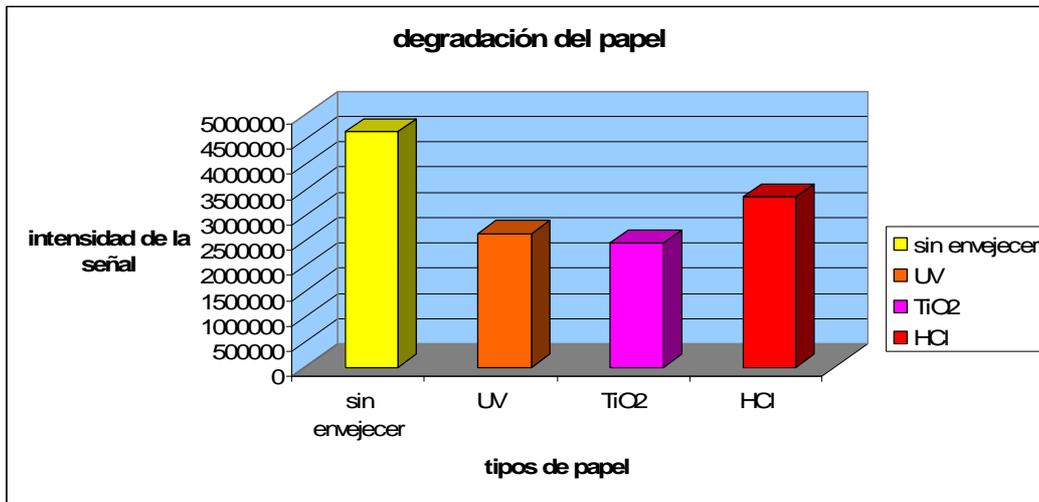


Gráfico 13. Gráfico de los resultados del test. El papel sin envejecer aparece como el más degradado y el resto de resultados son más o menos coherentes.

Misteriosamente, el papel sin envejecer aparecía más envejecido que el resto de papeles degradados aceleradamente. Este fenómeno era imposible, por lo que hizo pensar que este test mide otro tipo de sustancias a parte de los grupos carboxílicos. Por este motivo, se decidió comparar los dos test de peroxidasa y glucosa oxidasa, y saber cuál daba mejores resultados.

II.2.2 Comparación del test de peroxidasa y el test de glucosa oxidasa:

En la próxima medida se repite el mismo proceso empleado y descrito anteriormente con la enzima peroxidasa y se contrastan los resultados de estos test con los de la glucosa oxidasa.

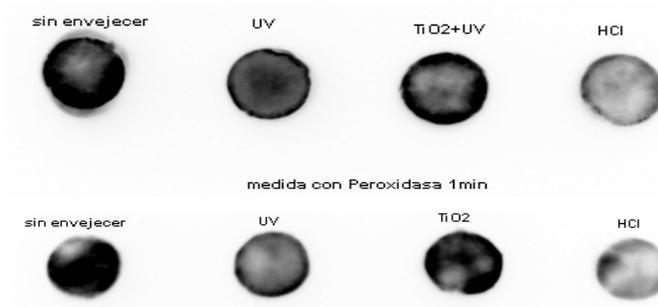


Figura 13. Papeles medidos con GOD y peroxidasa. Un minuto de exposición en la cámara CCD.

- Resultados para la peroxidasa:

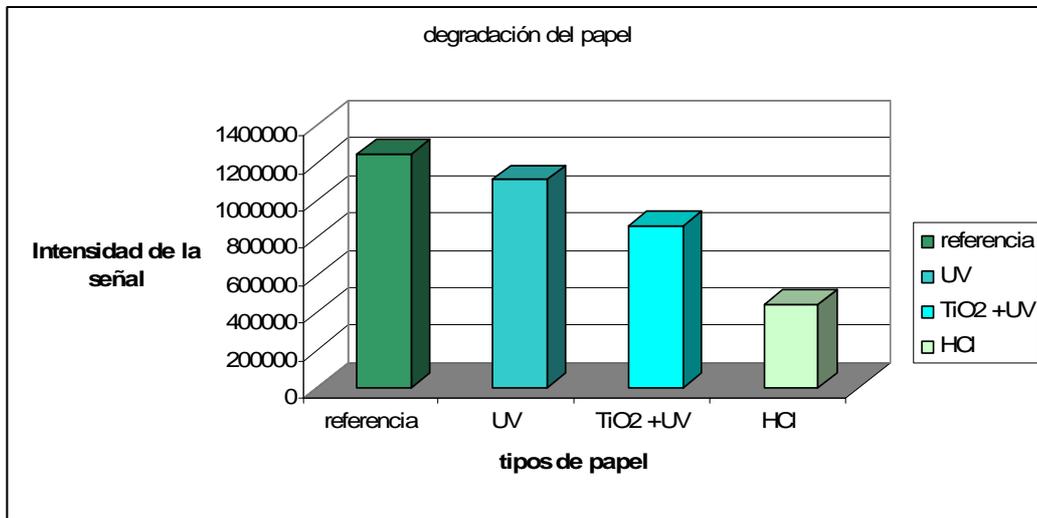


Gráfico 14. Gráfico de los resultados

- Resultados obtenidos con la Glucosa Oxidasa:

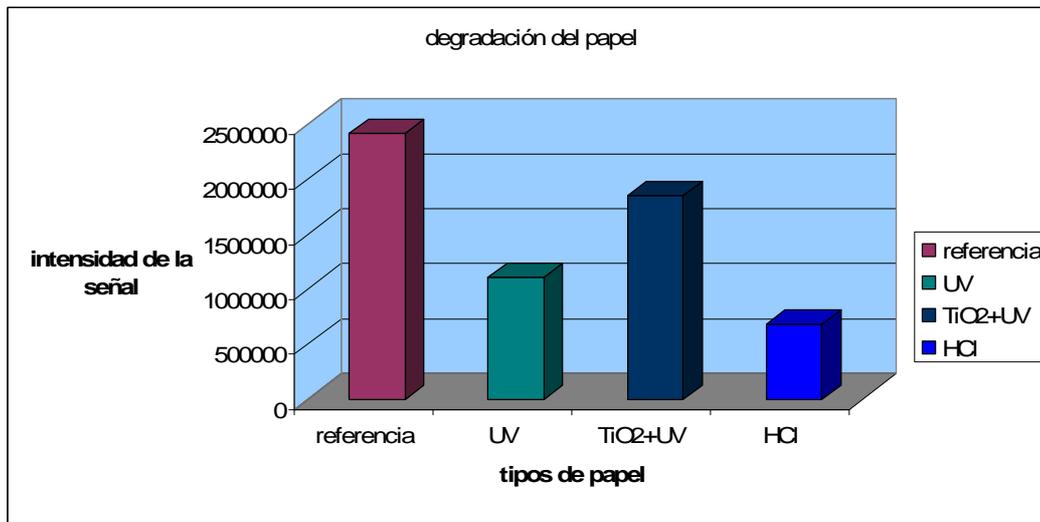


Gráfico 15. Gráfico de los resultados con la enzima GOD

Observaciones

Tanto para el método con la peroxidasa como para el método de la glucosa oxidasa, los resultados difieren bastante de la realidad. Para el primero, se cree que el mal funcionamiento reside en la posible existencia de aldehídos en todos los papeles menos el tratado con ácido clorhídrico. En el artículo “Degradazione fotochimica della cellulosa della carta”, podemos leer que la celulosa y otras sustancias presentes

en el papel poseen muchos grupos alcoholes que pueden ser oxidados en grupos aldehídos, cetonas y ácidos. Éstos al poco de ser formados pueden reaccionar con los grupos alcohólicos que han sido oxidados para formar esteres. Y este método no busca esteres sino grupos carboxílicos.

Para el método de la glucosa oxidasa, los resultados son parecidos a los obtenidos en pruebas anteriores, excepto para los papeles sin envejecer, que habían cambiado.

II.2.3 Renovación del papel de referencia

A la vista de lo sucedido con el papel sin envejecer de Roma, se decidió analizar un nuevo papel de Francia sin envejecer, que era similar al tratado en Roma. Se describe a continuación el protocolo para las siguientes pruebas.

- Protocolo de la nueva prueba:

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

- Resultados:

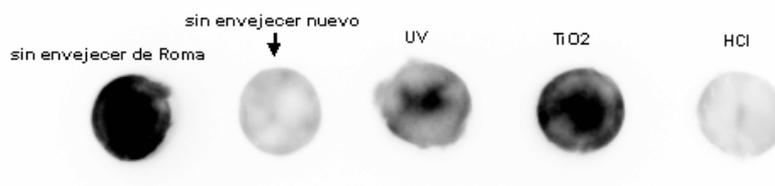


Figura 14. Fotografía de un minuto de exposición. Aplicación de GOD.

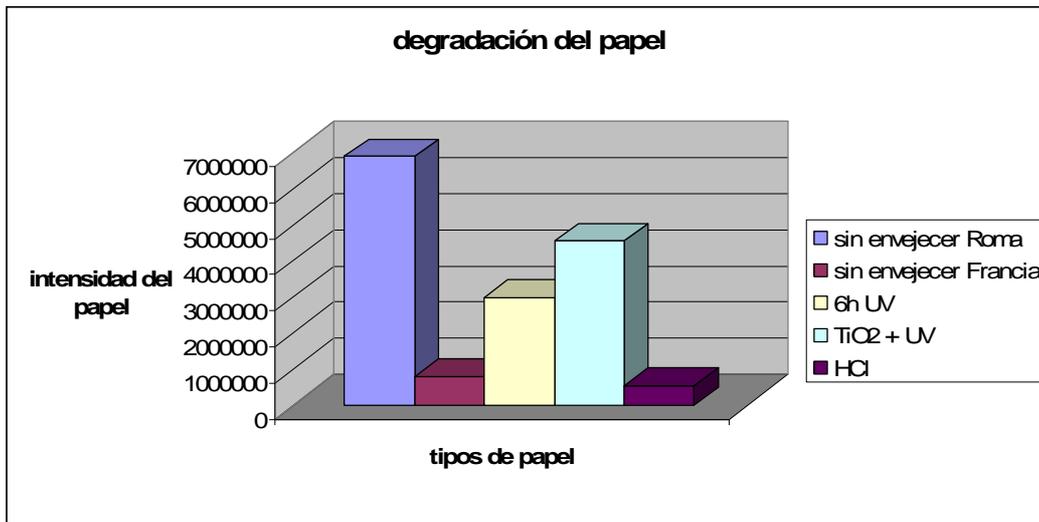


Gráfico 16. Gráfico de los resultados donde se comparan los papeles sin envejecer de Roma y de Francia. Visiblemente, el papel de Roma aparece muy envejecido en este test aunque la realidad sea lo contrario.

Viendo el resultado del estado del papel, cabe dos posibilidades: el test enzimático no funciona correctamente con papeles expuestos a contaminantes y por lo tanto con papeles con sustancias químicas o el test no es totalmente fiable. Por esta razón, se repite la prueba con el papel sin envejecer que tampoco ha sido expuesto a contaminantes:

- Repetición del mismo test

El protocolo empleado para esta medida es el mismo que el anterior.

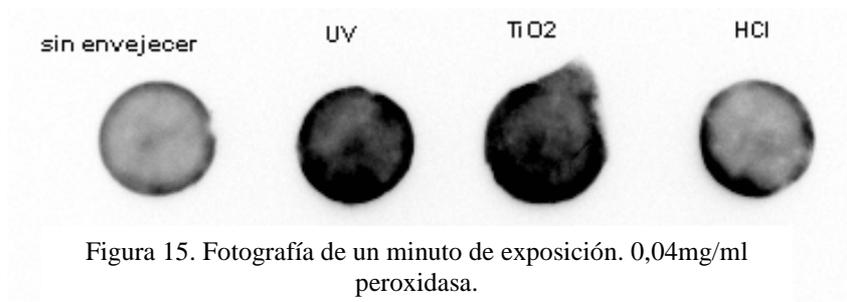


Figura 15. Fotografía de un minuto de exposición. 0,04mg/ml peroxidasa.

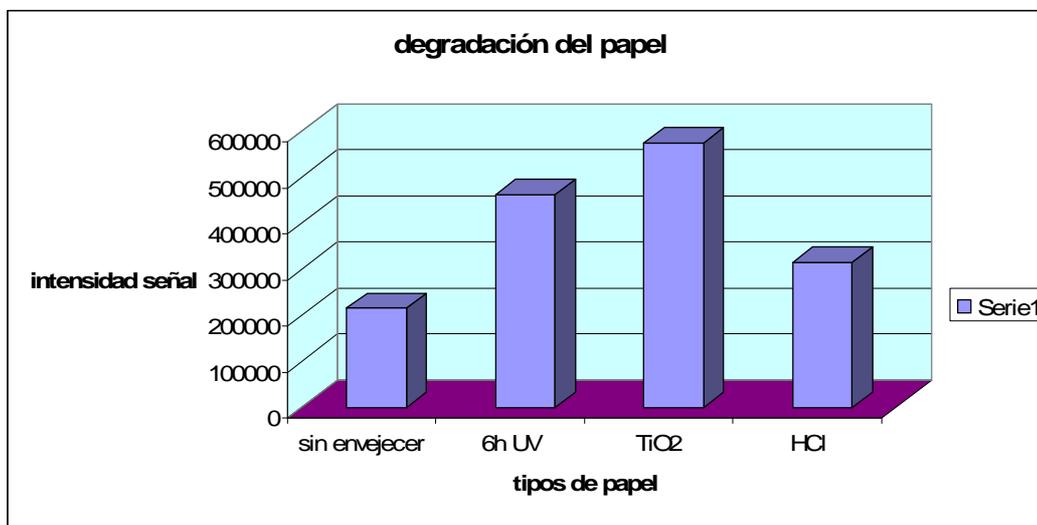


Gráfico 17. Gráfico con los resultados. El resultado para el papel sin envejecer es correcto. Sin embargo, para el papel envejecido con HCl, el resultado es incorrecto.

Observaciones

Las pruebas realizadas muestran cómo el papel sin envejecer de Roma, y conservado en el laboratorio de enzimología de Lyon, ha sufrido un cambio químico. A pesar de haber sido conservados los papeles entre papel aluminio, se supone que las sustancias químicas del laboratorio han podido influir en este resultado.

Las últimas pruebas muestran que no hemos resuelto el problema con los papeles con un pH ácido.

II.3 Nuevo protocolo de medida de la degradación con la enzima HRP-HIS.

II.3.1 Protocolo de actuación

Este método ha sido ya explicado en el capítulo de métodos. De todos modos, se vuelve a enumerar los pasos a seguir, antes de obtener un resultado con la cámara CCD.

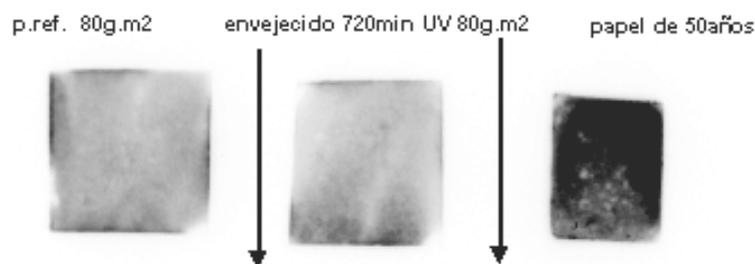
1. Introducción de cada fragmento de papel en tubos de ensayo con 500 μL de NiCl_2 , durante 30 min. Esta sustancia sirve de puente entre la enzima y los grupos carboxílicos del papel.
2. Se lava los papeles con un 1 ml de tampón VBS durante 20 min.
3. Se aplica 500 μL de la enzima HRP-His/10000 en tampón VBS, durante 30 min.
4. Se realizan dos lavados de 20min. con 1mL de tampón VBS
5. Se procede a realizar la medición con la cámara CCD. Sobre cada membrana depositaremos 40 μL de una solución compuesta por por 1mL de tampón VBS, 5 μL de H_2O_2 , 40 μL de Luminol y 20 μL de p-iodofenol 10 nM.

II.3.2 Cambio de formato de los fragmentos de papel

En pruebas anteriores, se obtuvo en los fragmentos de las fotografías de la cámara CCD un oscurecimiento en toda la periferia de los papeles. Por este motivo se decidió sustituir el formato circular por otro rectangular y disminuir la zona de oscurecimiento de las membranas de papel de las fotografías de la cámara CCD.

Incluimos en las pruebas un papel de más de 50 años y envejecido de forma natural para contrarrestar los resultados con los de nuestros papeles envejecidos artificialmente.

Resultados:



16. Fotografía de 10 segundos en la cámara CCD

Observaciones

Aparentemente al observar la fotografía de la cámara CCD, da la impresión que el papel envejecido con rayos ultra violetas, está menos degradado que el papel de referencia. Pero, tras realizar la cuantificación numérica de la actividad enzimática, los resultados son los siguientes:

Nº	AU	Area (mm2)	AU-BG	% of Grp	AU/mm2	(A-B)/mm2	Min.	Max.	S.D.
1	808446.00	25.01	561842.00	18.90	32320.67	22461.75	613.00	1082.00	82.60
2	942639.00	25.01	696035.00	23.41	37685.54	27826.62	668.00	1516.00	179.51
3	1962192.00	25.01	1715588.00	57.70	78446.01	68587.09	1115.0	3162.00	347.28

Tabla 2. Resultados cuantificables

La cuantificación numérica de la actividad enzimática pone en evidencia los verdaderos resultados de la prueba. Tras este último método enzimático para conocer

la degradación de los papeles, se pueden comenzar las pruebas para la consolidación con cierta garantía de que los resultados son los correctos.

El siguiente gráfico nos muestra de forma más sencilla y evidente los resultados de la cuantificación numérica de la actividad enzimática y por lo tanto el estado de degradación de cada fragmento de papel.

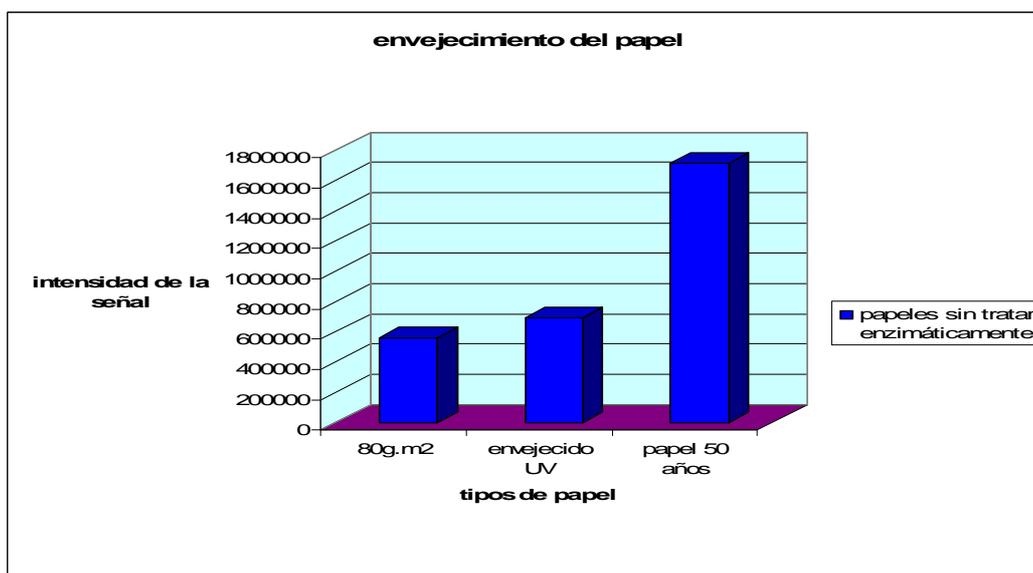


Gráfico 18. Resultados de la cuantificación numérica y estado del papel. Los resultados son coherentes y concuerdan con la realidad.