

Capítulo I. Las enzimas

Las puertas de la sabiduría nunca están cerradas.

Benjamin Franklin

Las enzimas

Para utilizar enzimas en restauración, es necesario entender qué son, cómo funcionan, en qué condiciones, etc. Sin estos conocimientos, no comprenderemos cómo actúan y no sabremos manipularlas correctamente. En restauración de obras de arte, muchos de los profesionales evitan emplearlas por la falta de información, conocimiento y experimentación con enzimas. Muchos de ellos tienen miedo por los posibles efectos que pueden ocurrir después de su empleo. No obstante, tampoco conocen hasta dónde penetran los disolventes en la superficie de una obra y qué efecto tienen sobre ésta y en su propia salud a corto y largo plazo. Por estos motivos, realizamos una búsqueda de información relacionada con enzimas, en libros especializados de enzimología y de restauración.

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica ^[69] que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado y, actúan como catalizadores ^[70,71] de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos. Muchas de las enzimas no trabajan solas, se organizan en secuencias, también llamadas rutas metabólicas, y muchas de ellas tienen la capacidad de regular su actividad enzimática ^[72].

⁶⁹ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p. 15.

⁷⁰ Los catalizadores son sustancias que aumentan la velocidad o proporción de las reacciones químicas sin que ellas cambien en el proceso (ni el enzima ni la reacción).

⁷¹ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p. 25.

⁷² LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica* 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 190.

I.1 Estructura de las enzimas

Para comprender cómo funcionan las enzimas, es necesario saber qué son y conocer la importancia de su estructura.

Las enzimas son proteínas globulares formadas por una o más cadenas polipeptídicas^[74] plegadas, creando una “hondonada” donde encaja el sustrato y tiene lugar la reacción. Esta zona de la enzima se denomina centro activo y sólo unos pocos aminoácidos están implicados en él.

La proximidad de los aminoácidos^[75] en el centro activo está determinada por la estructura terciaria, aunque también pueden ocupar posiciones adyacentes en la estructura primaria. En una enzima con estructura cuaternaria, los aminoácidos del centro activo pueden encontrarse incluso en diferentes cadenas.

La configuración tridimensional del centro activo es complementaria a la del sustrato y posee una distribución complementaria de sus cargas sobre la superficie de unión. Es decir, si una región del sustrato tiene una carga negativa, la zona correspondiente del centro activo tendrá una carga positiva y viceversa.

En 1894, Emil Fischer, un químico alemán, comparó la especificidad de la enzima con una llave y su cerradura^[76]. Pero, estudios posteriores sugirieron que el centro activo es más flexible que el ojo de una cerradura: la unión entre la enzima y el sustrato altera la conformación de la enzima, ajustando el centro activo al sustrato. Se

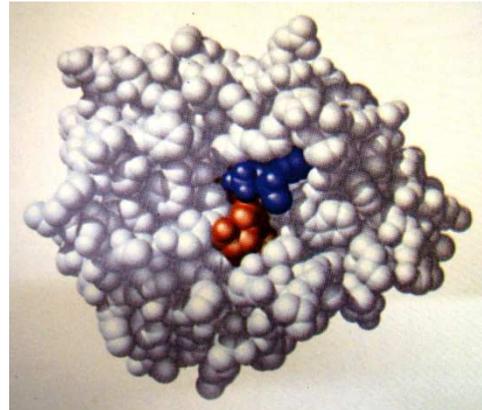


Figura 1^[73]. Enzima con un sustrato (azul) unido al centro activo (hondonada) con un amino ácido clave del sitio activo (rojo).

⁷³ Fotografía del libro *Principios de bioquímica*. Muchos de los datos mencionados en este capítulo están extraídos de este libro. LEHNINGER, NELSON, COX, *Principios de Bioquímica*, 2º Edición, Ed. Omega, Barcelona, 1995, p. 191.

⁷⁴ Los polipéptidos (péptidos grandes) están formados por aminoácidos (más de 10 amino ácidos por péptido). Cuando los polipéptidos son lo suficientemente grandes y tienen estructuras tridimensionales estables podemos hablar de proteínas.

⁷⁵ Un aminoácido está formado por un amino (-NH₂) y un grupo carboxílico (-COOH ácido)

⁷⁶ ALDABE, J., HUETO, A., JUNI, J., LÓPEZ, P., *Biología*, Ed. Erein, 1998, p. 125.

piensa que este cambio inducido puede crear cierta tensión en las moléculas reactivas y facilitar de esta manera la reacción.

I.2 Mecanismo de acción de las enzimas. Catálisis enzimática.

I.2.1 Energía de activación

En toda reacción química se produce la transformación de unas moléculas iniciales denominadas sustratos (S) en las reacciones bioquímicas, en unas sustancias finales o productos (P). Esta transformación necesita, en la mayoría de las reacciones, un aporte inicial de energía que aumenta la energía cinética de las moléculas y éstas, reaccionan permitiendo que un mayor número de ellas, choquen con suficiente fuerza para superar su repulsión mutua y debilitar los enlaces químicos que poseen. La energía que deben poseer las moléculas para iniciar la reacción se conoce con el nombre de energía de activación [Figura 2] ^[77].

I.2.2 El catalizador

Un catalizador disminuye la energía de activación necesaria para una reacción, porque forma una asociación pasajera con las moléculas que reaccionan ^[78]⁷⁹. Esta asociación aproxima a las moléculas que reaccionan y, favorece tanto la ruptura de enlaces existentes, como la formación de otros nuevos. Cuando existe un catalizador en la energía de activación, esta reacción puede suceder rápidamente sin o con poca adición de energía. El catalizador no sufre ninguna alteración permanente en el proceso y puede volver a utilizarse.

Gracias a las enzimas, las células son capaces de desarrollar reacciones químicas a gran velocidad y a temperaturas relativamente bajas.

⁷⁷ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica* 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 194.

⁷⁸ ALDABE J.- HUETO A. - JUNI J. - LÓPEZ P., *Biología*, Ed. Erein, 1998, p. 125.

⁷⁹ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p. 27.

I.2.3 Reacciones enzimáticas

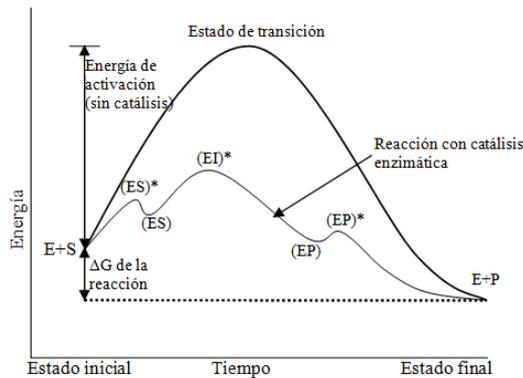


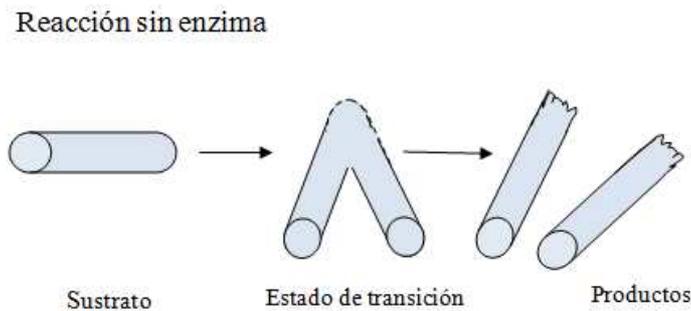
Figura 2^[80]. Gráfico de la diferencia de energía que necesita una reacción no catalizada (línea más gruesa) y la misma reacción con catálisis enzimática (línea fina). (ES) significa la unión de la enzima y el sustrato, (EI) la enzima con el compuesto intermedio y, (EP) la enzima con el producto. Los asteriscos significan los estados de transición correspondientes a cada complejo ES, EI y EP.

En estas reacciones, la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES). Después tiene lugar la transformación del sustrato (S) en producto (P), liberándose el producto (P) y quedando libre la enzima (E) para una nueva unión con el sustrato ^[81].



Las enzimas, como los demás catalizadores, aceleran la reacción sin

alterar la posición de equilibrio. En una reacción química ^[82] tenemos:



⁸⁰ Gráfico del libro LEHNINGER, NELSON, COX, *Principios de Bioquímica*, 2ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 1995.

⁸¹ En algunas ocasiones el producto inhibe la enzima, regulando de esta forma la actividad enzimática.

⁸² LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 193.

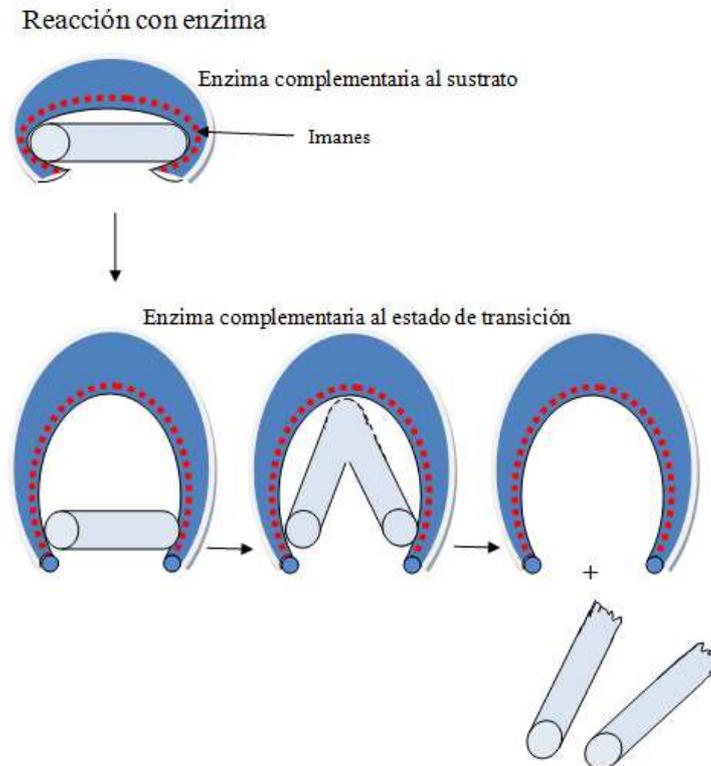


Figura 3. Esquemas de la reacción enzimática ^[83].

I.2.4 La constante de equilibrio

La constante de equilibrio K , se produce en las reacciones enzimáticas y siempre tiene un valor constante fijado por la relación entre las velocidades en uno u otro sentido, independientemente de que el catalizador esté o no presente. La catálisis hace disminuir considerablemente el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ^[84].

$$K = \frac{[P]}{[S]}$$

K = constante de equilibrio

$[P]$ = concentración de producto

$[S]$ = concentración de sustrato

⁸³ Esquema similar al que encontramos en el libro LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica* 4ª Edición Ed. Omega Barcelona 2006, p198.

⁸⁴ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 195.

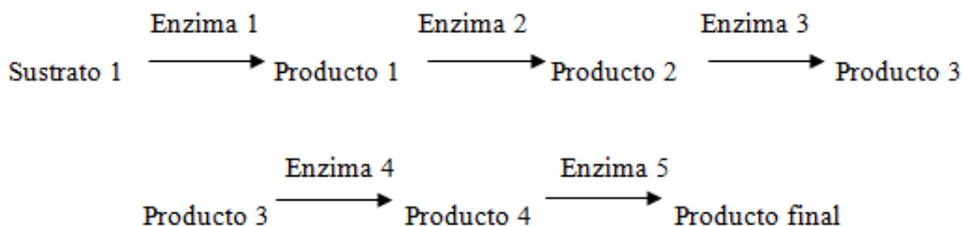
I.3 Regulación de la actividad enzimática

I.3.1 Rutas metabólicas

En los seres vivos, las maneras para regular la actividad enzimática son diversas. Existen rutas metabólicas que están formadas por grupos de enzimas que actúan conjuntamente en el metabolismo celular. Las enzimas trabajan en serie, formando vías enzimáticas, de forma que el producto de una enzima constituye el sustrato de la siguiente.

Todas las rutas metabólicas pueden ser controladas por enzimas reguladoras. Éstas varían su actividad dependiendo de ciertas señales y normalmente la primera enzima de la ruta es la reguladora. Ésta se llama el punto de compromiso de la vía.

La actividad de estas enzimas se modula por diferentes moléculas señal, que generalmente son metabolitos de poco peso molecular o cofactores.



Las vías enzimáticas suponen ventajas para las células^[85].

Por una parte, los grupos de enzimas que constituyen una vía común pueden segregarse dentro de la célula e incluso, si están ubicadas en las membranas, pueden estar alineadas en secuencia.

Otra ventaja es la escasa acumulación de productos intermedios. Cada producto tiende a ser usado en la siguiente reacción de la vía enzimática.

⁸⁵ ALDABE, J., HUETO, A., JUNI, J., LÓPEZ, P., *Biología*, Ed. Erein, 1998, p. 126.

I.3.2 Cofactores y coenzimas

1. Cofactores

Muchas enzimas necesitan para una correcta actividad enzimática la adición de cofactores, que son determinados iones minerales (magnesio, zinc, cobre, etc.).

En algunos casos, los enlaces entre los iones y los radicales de ciertos aminoácidos ayudan a mantener la estructura terciaria o a estabilizar la estructura cuaternaria de la proteína ^[86].

2. Coenzimas

Las moléculas orgánicas que actúan como cofactores se denominan coenzimas. Éstas se unen de manera temporal o permanente a la enzima en una zona bastante próxima al centro activo.

Cuando la enzima es activada por una coenzima, el conjunto se denomina holoenzima, y cuando la inactiva, apoenzima ^[16 y 87].

Algunas enzimas que contienen o requieren elementos inorgánicos como cofactores	
Fe ²⁺ o Fe ³⁺	Peroxidasa
Cu ²⁺	Citromo oxidasa
Se	Glutación peroxidasa
Ca ²⁺	α-amilasa

Tabla 1. Ejemplos de enzimas que requieren cofactores

⁸⁶ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4º Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, pp. 191-192.

⁸⁷ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p. 25.

I.3.3 Efecto de las concentraciones de enzima y de sustrato

La actividad enzimática viene limitada por diferentes factores como puede ser la concentración de enzimas, de sustrato y la disponibilidad de cofactores.

La velocidad de la reacción está relacionada directamente con la concentración de la enzima y esta velocidad es diferente para cada enzima. Cuando la concentración de la enzima es constante, la velocidad aumenta hasta alcanzar un máximo (V_{\max})^[88 y 89] aunque la concentración del sustrato siga aumentando. Todas las moléculas de enzima están ocupadas por moléculas de sustrato y la velocidad no puede aumentar [Figura 4].

Existe un periodo inicial denominado estado pre-estacionario que es cuando la enzima se mezcla con el gran exceso de sustrato y durante el cual, aumenta la concentración ES. Seguidamente aparece el estado estacionario donde ES permanece constante en el tiempo.

Las células regulan la velocidad de las reacciones enzimáticas mediante la regulación de las concentraciones de la enzima. Muchas enzimas son degradadas rápidamente y se sintetizan sólo cuando se necesitan. Otras, se segregan en forma inactiva y se activan cuando se necesitan.

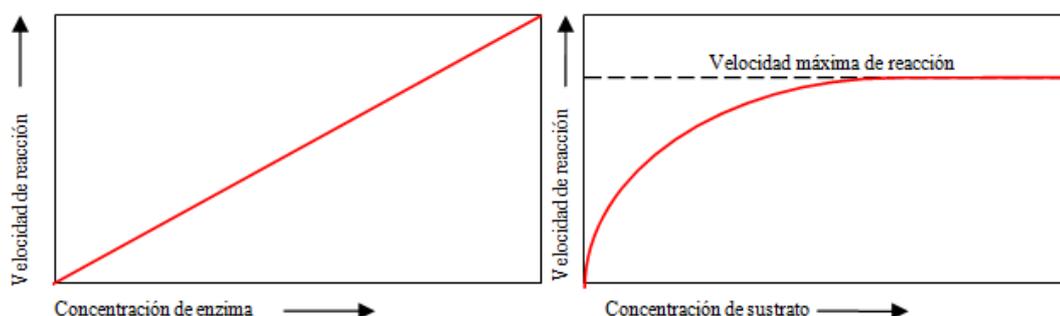


Figura 4. Efecto de la concentración de enzima y sustrato en la velocidad de reacción enzimática.

⁸⁸ V_{\max} : velocidad máxima. ALDABE, J., HUETO, A., JUNI, J., LÓPEZ, P., *Biología*, Ed. Erein, 1998, p. 126.

⁸⁹ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4^o Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 203.

I.3.4 Efectos de la temperatura y del pH

1. La temperatura

Cada enzima tiene una temperatura óptima de actuación. Por debajo y por encima de esta temperatura, la enzima ralentiza la velocidad de la reacción enzimática.

Se observa que muchas de las enzimas, duplican la velocidad de una reacción enzimática cuando se aumenta la temperatura de unos 10° C aproximadamente y luego cae muy rápidamente por encima de los 40° C [Figura 5] ^[90].

El aumento en la velocidad de reacción se produce porque con temperaturas más altas, existen más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar; la disminución de la velocidad de la reacción es debida a la desnaturalización de la enzima (la mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan por encima de 60 - 70°C).

2. El pH

La actividad enzimática también viene regulada por el pH de la solución enzimática. El pH óptimo o intervalo de pH de cada enzima es diferente y cuando varía, la conformación de la enzima se altera, produciéndose un cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo y llegando a no ser funcional ^[91].

Esto es debido a que la conformación de una proteína depende también, de las atracciones y repulsiones entre los aminoácidos cargados negativamente y los

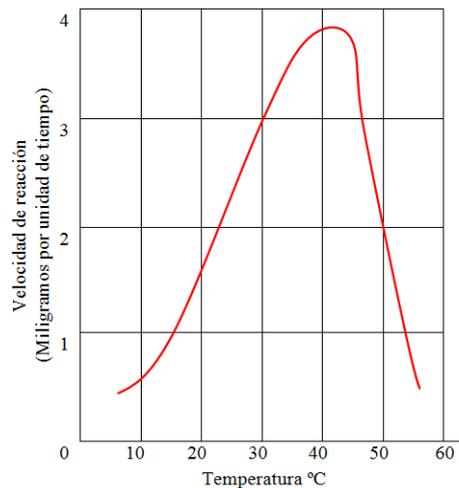


Figura 5. Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción enzimática

⁹⁰ Grafico obtenido del libro ALDABE, J., HUETO, A., JUNI, J., LÓPEZ, P., *Biología*, Ed. Erein, 1998, p. 128.

⁹¹ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, p. 212.

cargados positivamente. Además algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo del enzima.

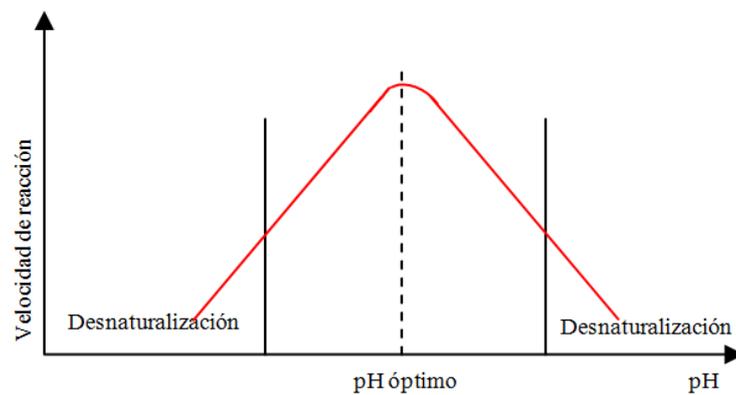


Figura 6. Efecto del pH en la velocidad de reacción enzimática

Las enzimas pueden tener dos tipos de curvas:

- La primera curva posible de la actividad enzimática es en pico. Esto significa que la enzima necesita un control riguroso del pH del medio en el que se encuentra. El 100% de su actividad se encuentra en un pequeño intervalo entorno a un pH determinado.

-La segunda posibilidad es que la enzima mantenga una actividad superior al 75% alrededor del pH óptimo.

Estas curvas experimentales suelen ser facilitadas por el fabricante o vienen en documentos técnicos.

I.3.5 Inhibición

Los inhibidores son sustancias que disminuyen, o incluso anulan, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas.

La inhibición puede ser de distintos tipos [Figura 7] ^[92]:

1. Reversible:
 - a) Competitiva
 - b) No competitiva
 - c) Acompetitiva
2. Irreversible

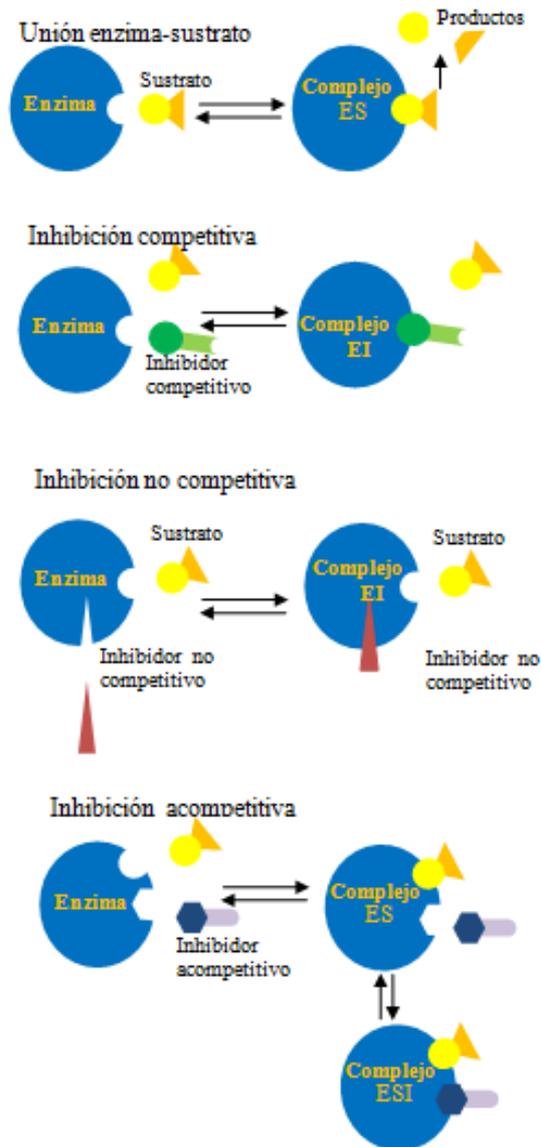


Figura 7. Tipos de inhibición

⁹² Figura inspirada en esquemas del libro LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, pp. 209-212.

I.3.5.1 Inhibiciones reversibles ^[93 y 94]

- Inhibición competitiva

Algunos compuestos inhiben la actividad enzimática ocupando temporalmente el centro activo de la enzima. Esta forma de regulación se conoce como inhibición competitiva, ya que el inhibidor (compuesto parecido al sustrato) y el sustrato compiten por unirse al centro activo. La inhibición competitiva es reversible. El resultado de la competencia en cada momento depende de cuántas moléculas de sustrato y de inhibidor estén presentes.

Por ejemplo, en una vía enzimática:



el producto final (E) puede tener una estructura similar al producto B y competir por el centro activo de la enzima Ez. Cuando E sea consumido por la célula, el centro activo de la enzima Ez estará disponible totalmente para B.

- Inhibición no competitiva

En la inhibición no competitiva, el inhibidor que no necesita parecerse al sustrato, se une a la enzima en un sitio distinto al centro activo. La unión del inhibidor no competitivo a la enzima, no bloquea la fijación del sustrato e inactiva la enzima, este presente o no el sustrato. Al igual que la inhibición competitiva, la inhibición no competitiva es reversible.

⁹³ CREMONESI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p. 31.

⁹⁴ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica* 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, pp. 211-212.

- **Inhibición acompetitiva o incompetitiva**

En la inhibición acompetitiva el inhibidor se fija a un sitio diferente al del sitio activo. Este inhibidor sólo se une a la enzima (E) cuando ya se ha formado el complejo ES enzima-sustrato. El inhibidor sólo se une al complejo (ES)

I.3.5.2 Inhibición irreversible

Algunas sustancias inhiben a las enzimas irreversiblemente, porque se unen permanentemente con grupos funcionales al centro activo o, porque desnaturalizan completamente a las proteínas. Los inhibidores suicidas o “inactivadores basados en el mecanismo”, son compuestos poco reactivos que en un inicio dejan que la reacción enzimática normal se realice, pero que al ser transformados, se convierten en compuestos muy reactivos que se combinan irreversiblemente con la enzima.

I.3.6 Otros Tipos de regulación enzimática

La actividad enzimática puede regularse de diferentes maneras. Se ha visto hasta el momento, el efecto de los cofactores, la temperatura, el pH y la inhibición. No obstante, existen otro tipo de reguladores expuestos a continuación:

I.3.6.1 Regulación por modificación covalente

La regulación covalente se produce por la unión covalente de un modulador a una enzima. Esta modificación covalente puede ser reversible cuando las enzimas modifican su función, uniéndose covalentemente a ciertas moléculas. (Fosfato, adenosina- monofosfato, ad.-difosfato, a grupos metilo....)

I.3.6.2 Por fijación a proteínas control

La proteína control bloquea la función de la enzima cuando se une a ella.

I.3.6.3 Por escisión proteica (se diferencia de las tres otras porque es irreversible)

La escisión proteica suele formar una enzima activa, partiendo de un precursor inactivo de la enzima, llamado zimógeno. La escisión de esta molécula conlleva a la activación de la enzima.

I.3.6.4 Interacciones alostéricas

La interacción alostérica ^[95] es un mecanismo con el cual, una enzima puede activarse o inactivarse temporalmente. Estas interacciones sólo ocurren cuando las enzimas poseen al menos dos sitios de unión. Uno sería el centro activo y el otro, conocido como centro regulador, sería el sitio donde se une el efector alostérico [Figura 8].

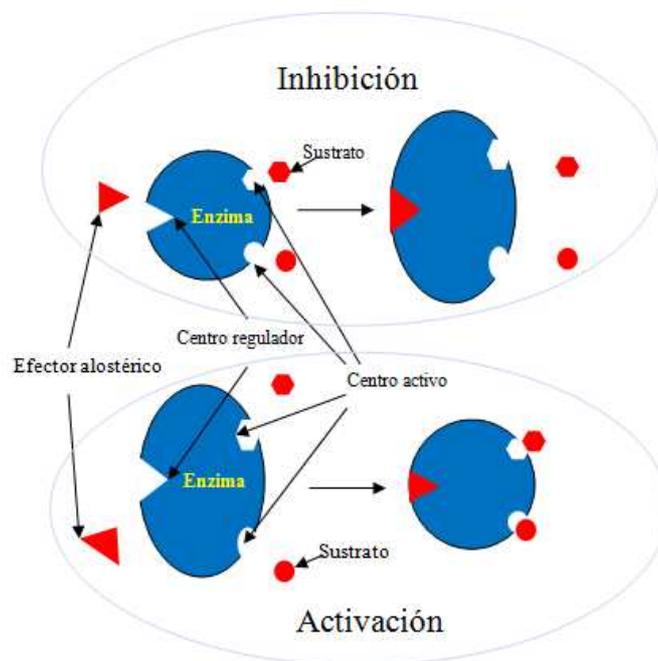


Figura 8. Inhibición y activación de una enzima

⁹⁵ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica* 4º Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006, pp. 225-228.

Las interacciones alostéricas suelen localizarse en puntos estratégicos de las vías enzimáticas, en los primeros pasos o en puntos de ramificación entre varias vías. A veces, el propio sustrato actúa de efector activador y su unión a la enzima induce cambios en la conformación del centro activo que favorecen la catálisis enzimática. Otras veces, el producto final de una secuencia de reacciones actúa como efector alostérico inhibiendo la función de una de las enzimas. Este proceso se denomina inhibición por retroalimentación o inhibición feed-back, y supone un ahorro energético, pues el exceso de producto final inhibe su propia síntesis en los primeros pasos.

I.4 Nomenclatura

Existen diferentes sistemas de clasificar las enzimas: numérica, funcional y sistemática. A continuación se ven los tres tipos de formas:

I.4.1 Numérica

A cada enzima se le asignan 4 números separados por puntos y precedidos por EC: EC 1.1.1.49.

El primer número designa la clase, el segundo la subclase, el tercero la subsubclase y el cuarto el orden en la lista.

I.4.2 Clases según su función

Las enzimas se pueden organizar clasificándolas según el sustrato sobre el que actúan y además se les puede añadir un sufijo –ASA. Por lo tanto en la tabla siguiente se exponen las enzimas clasificadas según la función que desempeñan.

<p>1-Oxirreductasas: estas enzimas producen reacciones de transferencia de e⁻ (electrones): Reacciones de oxidación-reducción:</p> $AH_2 + B \longrightarrow A + BH_2$
<p>2- Transferasas: estas proteínas transfieren grupos (transaminasas)</p> $A - X + B \longrightarrow A + X - B$
<p>3- Hidrolasas: consiguen reacciones de hidrólisis (en restauración de obras de arte se emplean sobre todo este tipo de enzimas)</p> $A-B + H_2O \longrightarrow A-OH + BH$
<p>4- Liasas: provocan reacciones de adición de grupos de dobles enlaces por eliminación de otros grupos. Son capaces de añadir o quitar algún grupo a un sustrato.</p> $A = B + X - Y \longrightarrow X - A - B - Y$
<p>5- Isomerasas: transferencia de grupos dentro de una misma molécula dando lugar a isomerasas. Convierten un isomero en otro.</p> $A \leftrightarrow B$
<p>6- Ligasas (sintetasas): formación de enlaces C-C; C-S; C-O; C-N Estas enzimas catalizan la formulación de un nuevo enlace por medio de hidrólisis de ATP</p> $A + B \longrightarrow A - B$

Tabla 2. Clasificación de enzimas según su función

I.4.3 Sistemática

Las enzimas pueden ser nombradas de forma sistemática, es decir que su nombre será formado por el nombre del sustrato sobre el que trabajan, el tipo de reacción que realizan y ASA. Este nombre puede ser fijo según la reacción que desempeñan.

Nombre del sustrato + tipo de reacción de los enzimas + ASA

Algunos ejemplos:

1. Deshidrogenasa:
Son oxido-reductasas en las que el aceptor de electrones es distinto del O₂
2. Oxidasas:
Son enzimas REDOX en los que el aceptor es el O₂ (Ej. glucosa oxidasa.)
3. Oxigenasa:
Cataliza la adición de O₂ al sustrato.

I.5 Tipos de enzimas utilizadas en la restauración ^[96]

I.5.1 Las hidrolasas

Existen gran variedad de enzimas que podrían ser empleadas en restauración. No obstante, casi siempre se emplean tres: las proteasas, las lipasas y las amilasas. Estas enzimas hidrolasas, catalizan la rotura de macromoléculas. Es decir, la acción específica de estas enzimas es degradar moléculas catalizando la hidrólisis de uniones de éteres (-C-O-C-), esterés (-CO-O-) y aminoácidos (-CO-NH-), y pueden representar una alternativa al uso de ácidos y álcalis para la eliminación de sustancias poliméricas envejecidas.

A continuación, se resume qué tipo de enzimas se emplean normalmente en restauración y cuáles son realmente sus funciones.

Enzimas	Hidrolizan	Tipo de uniones que degradan
Proteolíticas	Proteínas	aminoácidos (-CO-NH-)
Lipolíticas	materias grasas	esteres (-CO-O-)
Glicolíticas	Polisacáridos	éteres (-C-O-C-)

Tabla 3. Enzimas más empleadas en restauración de obras de arte.

I.5.2 Las proteasas o peptidasas (enzimas proteolíticas)

Estas enzimas rompen o hidrolizan las uniones peptídicas en los polipéptidos, creando fragmentos más pequeños e hidrosolubles: Oligopéptidos y raramente aminoácidos. Las clasificamos de la siguiente manera:

- **Las endopeptidasas y exopeptidasas**

⁹⁶ Mucha de la información expuesta en este capítulo, ha sido extraída del libro de CREMONESI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002.

Las endo-peptidasas hidrolizan uniones peptídicas en el interior de las cadenas proteínicas [figura 9], mientras que las segundas comienzan desde una extremidad de la cadena y se clasifican en carboxipeptidasas si parten de la extremidad ácida o aminopeptidasas si parten de la extremidad básica [figura 10]^[97].

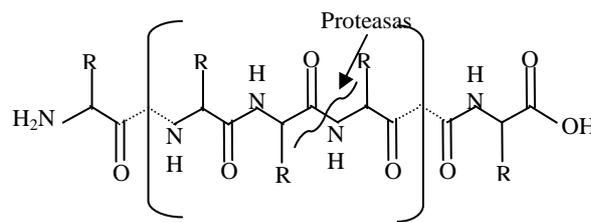


Figura 9. Endopeptidas

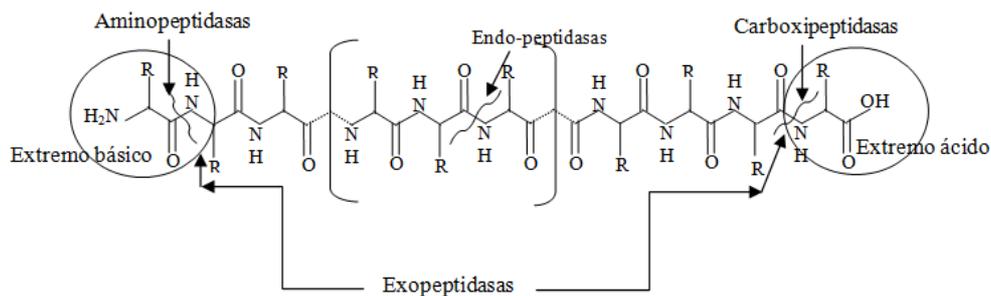


Figura10. Exopeptidasas y endopeptidasas

- **Las proteasas más empleadas en restauración^[98]**

Las proteasas poseen una extrema especificidad. Pueden reconocer en la macromolécula, uniones peptídicas particulares entre muchas del mismo tipo. En restauración se emplean diferentes tipos:

- a. La tripsina (EC.3.4.21.4)

⁹⁷ Esta información y figuras han sido extraídas del libro de CREMONESI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002.

⁹⁸ BANIK, G., CREMONESI, P., LA CHAPPELLE, A., MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Ed. Il Prato, Padova, 2003, p.43-44

Las tripsinas hidrolizan proteínas en el extremo carboxílico de sus residuos de lisinas y argininas, excepto cuando el residuo siguiente es una prolina.

Las tripsinas son endopeptidasas y el pH adecuado es de 7 y 8-8,4. Si se añade Ca^{2+} evitamos la autólisis ^[99].

b. La papaína (EC.3.4.22.2)

Hidrolizan su sustrato en fragmentos peptídicos muy pequeños. Estas enzimas necesitan cisteína para activarse y realizar la hidrólisis. El pH óptimo es neutro, pH 7,2, pero tolera variaciones entre 4 y 9,5. La temperatura también oscila entre 5 °C y 66 °C.

c. Colagenasa (EC.3.4.24.3)

Como su nombre indica, hidroliza colágeno. La colagenasa empleada en restauración proviene del *clostridium histoliticum*. Requiere para activarse un ión metálico bivalente, el Ca^{2+} . El pH^[100] adecuado es entre 6,5 y 8,8.

Por lo tanto, las proteasas son enzimas de la clase 3.4 y podemos encontrar a parte de las mencionadas anteriormente, las siguientes enzimas ^[101] proteolíticas:

- La aminopeptidasa (EC 3.4.1)
- La carboxipeptidasa (EC 3.4.2)
- La dipéptido hidrolasa (EC 3.4.3)
- La péptido hidrolasa (EC 3.4.3)

⁹⁹ BANIK, G., CREMONESI, P., LA CHAPPELLE, A., MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Ed. Il Prato, Padova, 2003, p. 43.

¹⁰⁰ Estas tres enzimas proteolíticas tienen un pH neutro o básico, sin embargo existen enzimas como la pepsina que necesitan un pH ácido 5-6 para conseguir la actividad enzimática óptima.

¹⁰¹ En el libro de CREMONESI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002 p. 34, existe una tabla resumen con las principales hidrolasas.

I.5.3 Las lipasas

Estas enzimas lipolíticas, tienen como función principal catalizar la hidrólisis de los triglicéridos, liberando gliceroles. Es decir que, al hidrolizar las uniones de los esteres de los triglicéridos, provocan que los productos creados puedan ser eliminados en un medio acuoso al ser más solubles [figura 11]. Los productos creados son monoglicéridos, diglicéridos o gliceroles. Estas enzimas suelen requerir un pH neutro o alcalino de 7-7,5 a 9.

La lipasa más empleada en el mundo de la restauración es la lipasa proveniente de *candida cylindracea*. Wolbers ^[102] y Cremonesi ^[103] entre otros, emplean esta lipasa para la limpieza de lienzos o la eliminación de Paraloid® B-72 ^[104].

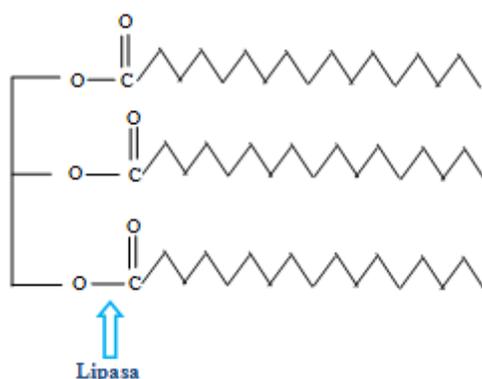


Figura 11. Hidrólisis de las uniones esteres de los triglicéridos con las lipasas

Las lipasas y esterasas, hidrolizan ésteres carboxílicos y son de la clase 3.1.1. Encontramos en libros de restauración los siguientes tipos ^[105]:

- Las lipasas (EC 3.1.1.3) que hidrolizan ésteres del glicerol.
- Las esterasas (EC 3.1.1.1) que rompen los ésteres carboxílicos
- Las esterasas (EC 3.1.1.2) que fragmentan uniones de ésteres fenólicos.

¹⁰² WOLBERS, R., *Cleaning painted surfaces*, Ed. Archetype Publications, London, 2000.

¹⁰³ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002.

¹⁰⁴ BELLUCCI, R., CREMOSI 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.

¹⁰⁵ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p. 34.

I.5.4 Las amilasas

Las amilasas, enzimas glucolíticas, hidrolizan los enlaces éter (glucosídicos) de las cadenas de los polisacáridos de las sustancias amiláceas, degradándolas a oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos, que son más solubles en medios acuosos [Figura 12] ^[106 y 107]. De esta manera conseguiremos eliminar el almidón de forma más sencilla.

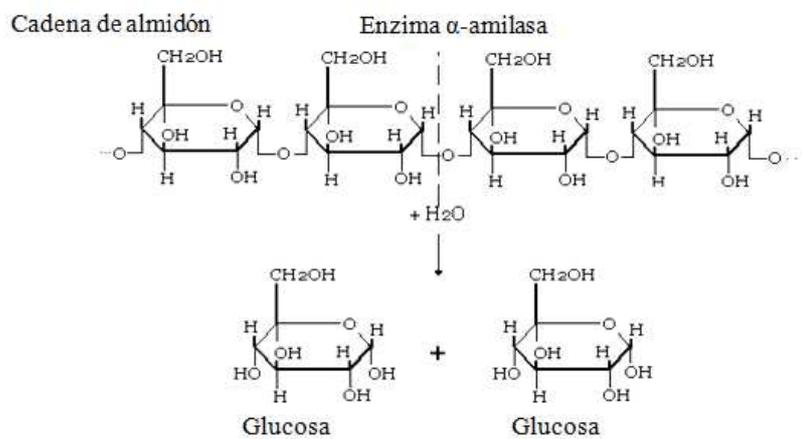


Figura 12. Hidrólisis del almidón con la amilasa

Al igual que las proteasas, las amilasas pueden hidrolizar las uniones glucosídicas internas de los polisacáridos (endo-amilasas) y las que se encuentran en las extremidades de las cadenas (exo-amilasas). Siendo las terminales más fáciles de degradar para las amilasas que las interiores.

También, se encuentran unas enzimas muy específicas llamadas glucoamilasas. Estas proteínas pueden degradar las uniones glucosídicas de las cadenas lineares que poseen uniones 1,4 glucosídicas y las uniones de las ramificaciones laterales con uniones 1,6 glucosídica.

Estas enzimas que hidrolizan enlaces glucosídicos son de la clase 3.2.1 y podemos encontrar diferentes tipos de amilasas:

¹⁰⁶ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il Prato, Padova, 2002, pp. 36-37.

¹⁰⁷ BANIK, G., CREMONESI, P., LA CHAPPELLE, A., MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Ed. Il Prato, Padova, 2003, pp. 39-40.

- Las α -amilasas (EC 3.2.1.1),
- las β -amilasa (EC 3.2.1.2),
- Las glucoamilasa (EC 3.2.1.3),
- Las 1,6-glucosidasas (EC 3.2.1.9, EC3.2.1.10, EC 3.2.1.b)

Las amilasas necesitan normalmente una temperatura de 30-39 °C, una concentración de 0,5 % peso/volumen ^[108] y un pH neutro de 6,5 a 7,5. No obstante, encontramos diferencias dependiendo del origen de la enzima. Por ejemplo la amilasa derivada de *A. oryzae* necesita un pH de 5 a 7 mientras que la extraída de la cebada su pH varía de 4,7 a 5,8.

Por otro lado, es importante saber que las amilasas necesitan en general iones de calcio para tener una actividad enzimática correcta.

Las amilasas derivadas de *B subtilis* (necesitan 150 ppm Ca^{2+}) y las de *B. licheniformis* (precisan 5 ppm Ca^{2+}) requieren además iones de sodio.

I.6 Origen de las enzimas

Todas las enzimas pueden ser sintetizadas o producidas por:

- Animales
- Plantas
- Microbios

A continuación vamos a resumir el origen de las enzimas empleadas en restauración.

I.6.1 Enzimas proteolíticas

Las proteasas pueden ser sintetizadas de diferentes maneras y tener una procedencia:

¹⁰⁸ Este porcentaje aparece en el artículo de GUPTA, C.B, "Recent development in the treatment of water damaged documents" *Conservation of manuscripts and documents: problems and prospects. Proceedings of the National Seminar held at Bharat Kala Bhawan, Varanasi, December 14 to 16, 1990* / Agrawal, O.P., Ed. INTACH, Lucknow, India, 1992, pp. 69-73.

1. De origen animal: la tripsina, pepsina, pancreatina, colagenasa y pronasa. Se consiguen a partir de los tejidos de diferentes organismos como el estómago o el páncreas. Las enzimas derivadas del estómago suelen tener un pH ácido por lo que se desaconseja su uso.
2. De origen vegetal: La papaína. Se obtiene de la papaya, de ahí su nombre, aunque también se pueden extraer de otros frutos como la piña o el higo.
3. De origen microbiano: Las proteasas de la bacteria *bacillus* o del hongo *Aspergillus*. Estas proteasas se sintetizan por medio de estos microorganismos, pero también de las levaduras.

I.6.2 Enzimas lipolíticas

Se obtienen de tres formas diferentes, como el resto de las enzimas ^[109]. En las enzimas lipolíticas encontramos:

- Lipasas

1. De origen animal, la lipasa extraída de tejidos del páncreas.
2. De origen vegetal, la lipasa derivada de germen de trigo, avena, etc.
3. De origen microbiano, sintetizadas por medio de varias especies de hongos, como el *Aspergillus*, *Penicillium* y levaduras y, de bacterias como el *Bacillus*.

- Esterasas

1. De origen animal: esterasas hepáticas
2. De origen vegetal: esterasas de germen de trigo y avena
3. De origen microbiano: esterasas microbianas y fúngicas de varias especies de bacterias y hongos.

¹⁰⁹ CREMOSI, P., *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002, p. 33.

I.6.3 Enzimas glicolíticas, amilasas ^[110].

1. De origen animal:

La amilasa salival o ptialina se obtiene de la saliva.

La amilasa pancreática se extrae de tejidos del páncreas.

No se debe emplear las enzimas producidas en el estomago porque necesitan mucha acidez para activarse y pueden provocar que los protoenzimas se activen.

2. De origen vegetal: existen amilasas que podemos conseguir de los tubérculos.

3. De origen microbiana:

La α -amilasa y β -amilasa se obtienen de diferentes microorganismos y hongos; de diversas bacterias sobre todo del *Bacillus* y de hongos, en particular el *Aspergillus*.

I.7 Manipulación de enzimas

I.7.1 Cuando deben aplicarse

La intervención enzimática puede resultar un método más seguro o de menor riesgo para la integridad de la obra respecto a otros métodos convencionales. No obstante, antes de aplicar las enzimas, se debe verificar que no es posible disolver el material deseado de otra manera, realizando diversas pruebas (descritas más adelante- tabla 3).

Para utilizar las enzimas sin ningún temor, se debe conocer de antemano la naturaleza química del estrato a eliminar y de los estratos subyacentes. Para ello es conveniente hacer un estudio estratigráfico para averiguar si el estrato que deseamos suprimir, posee o no la misma naturaleza que un estrato original subyacente, y si este

¹¹⁰ BANIK, G., CREMONESI, P., LA CHAPELLE, A., MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Il Prato, Padova, 2003, pp. 39-40.

último está protegido por otro estrato (como un barniz) que le pudiese preservar de la actividad enzimática.

Diferentes pruebas de solubilidad del material:

- 1- Test de solubilidad de Feller^[111], Wolbers o Cremonesi, para determinar un valor de polaridad en el cual el material es eventualmente soluble con disolventes Neutros.
- 2- Prueba de solubilidad con polaridad mayor (alcohol etílico)
- 3- Prueba de solubilidad con agua (disolvente polar)
- 4- Prueba de solubilidad con disolventes bipolares apróticos (acetona).

Tabla 3. Test de solubilidad que se deben realizar antes de la aplicación enzimática

Si el estado de conservación de la obra es muy malo, con múltiples craquelados y desconchados, se puede realizar una fijación con el fin de evitar el acceso de las enzimas a capas subyacentes ^[112].

Por otro lado, en el caso de que la superficie pictórica no admitiese ser mojada, por diferentes causas, las enzimas pueden ser aplicadas en geles o en microgotas disueltas en algún disolvente. Y si por el contrario, lo que sucede es que la capa pictórica es hidrófuga, el empleo de enzimas se realiza con un surfactante no iónico.

La utilización de un gel evita la migración rápida de la enzima, pero el tiempo de exposición del gel al sustrato que debemos suprimir y por tanto a la obra, debe ser el menor posible. Para ello, siempre debemos realizar diversas pruebas antes de aplicar la enzima sobre toda la superficie.

¹¹¹ FELLER, R., STOLOW, N., JONES E., *Picture Varnishes and Their Solvents*, Ed. National Gallery of Art, Washintong D.C., 1985.

¹¹² GARABELLI, G., “Unità di metodologia e applicazione di prodotti biologici nelle operazioni di restauro di sculture policrome”, *OPD restauro* N. 10, 1998, p. 47, 112-120, 132-133

I.7.2 Criterios para escoger una enzima

El siguiente esquema, nos indica los pasos ^[113] que debemos seguir para elegir un tipo de enzima específica [Tabla 4].

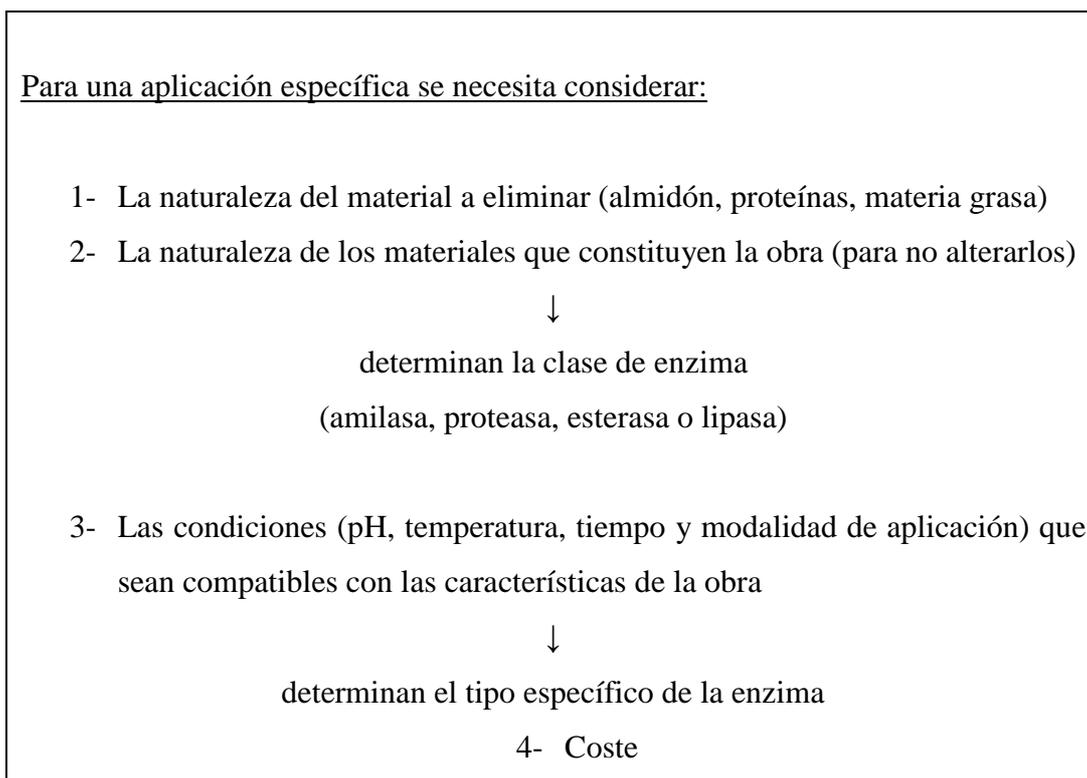


Tabla 4. Criterios para seleccionar una enzima, basados en información de Paolo Cremonesi ^[114].

Como podemos ver en el esquema, la naturaleza del sustrato a eliminar así como los materiales que constituyen la obra de arte, determinan el tipo de hidrolasa que debemos escoger. Es necesario e importante realizar este diagnóstico preliminar antes de la limpieza, aunque a la hora de la verdad, por motivos económicos, los restauradores no lo efectúen.

Una vez escogida la clase de hidrolasa, se elige el tipo comercial de la enzima compatible con las características de la obra. Esto dependerá las condiciones óptimas para la actividad enzimática de la proteína escogida.

¹¹³ Estos datos han sido recopilados del libro realizado por CREMONESI P., *L'uso del solventi organici nella pulitura di opere policrome*. Il prato. Saonara, seconda edizione, 2004

¹¹⁴ CREMOSI, Paolo, *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*, Ed. Il prato, Padova, 2002

I.7.3 Parámetros a tener en cuenta a la hora de escoger una enzima

1. Temperatura

A la hora de utilizar las enzimas en operaciones de restauración, debemos conocer su temperatura específica. En general, los catálogos dan información precisa de la temperatura óptima para cada tipo de enzima en particular.

Los catalizadores biológicos que operan en el interior de sistemas vivos, tienen una temperatura óptima de trabajo entorno a los 37-40 °C. Pero existen excepciones como enzimas producidas por microorganismos que son segregados al exterior del organismo mismo y que tienen una temperatura óptima de 25 °C.

2. Actividad específica

La actividad específica es la cantidad de sólido necesaria para hidrolizar una cantidad predeterminada de un cierto sustrato en un cierto tiempo y a una cierta temperatura.

A la hora de escoger una enzima, es necesario elegir la de mayor actividad, ya que esto significa que es necesario una menor cantidad de enzima para hidrolizar un sustrato, y por tanto, será menor la cantidad de enzima que deberemos eliminar después del tratamiento.

La actividad específica está expresada en unidad de sustrato transformado por miligramo de preparación enzimática, en condiciones estándar de temperatura y a un cierto valor de pH.

Cuanto más alto es el valor, mayor es la capacidad catalítica de una cierta cantidad de enzima. Algunos productos comerciales, como la lipasa y la pepsina, tienen una actividad específica muy elevada (hasta 1500-2000 unidad por mg) mientras que otros (sobre todo ciertas proteasas microbióticas) tienen valores muy inferiores (0,1-1 unidad por mg). En las preparaciones de baja actividad es muy importante acercarse lo máximo posible a las condiciones óptimas de trabajo (pH y temperatura).

3. El pH óptimo

Como hemos visto anteriormente, el pH es un factor importante ya que si éste no es el óptimo, entonces la actividad enzimática puede ser inferior a la adecuada. El pH viene especificado por los fabricantes en el propio bote o en la bibliografía especializada.

4. El coste

Cuanta mayor es la pureza, la especificidad y la actividad de la enzima, mayor es el coste. Aunque, los últimos adelantos en ingeniería genética, han permitido que se pueda adquirir una amplia variación de lipasas (sobre todo de origen microbiana) a bajo coste.

I.7.4 Interpretación de la información de la enzima

Se puede encontrar en los catálogos de productos químicos o en las páginas web, toda la información relacionada con cada enzima.

Cuando deseamos escoger una enzima en particular, podemos ver sus características en la página donde la queremos comprar. Por ejemplo, en la siguiente fotografía de la página SIGMA-ALDRICH^[115] vemos los detalles de la celulasa.

C9422 1 **Cellulase from *Trichoderma viride*** 2
 Sigma crude powder, 3-10 units/mg solid

★★★★★ 3
 Be the first to [write a review](#) 4

Price and Availability

Product Number	Your Price EUR	Available to Ship	Quantity	Actions
C9422-5KU	75.30	Fecha no disponible	<input type="text"/>	
C9422-10KU	136.20	31.05.2010	<input type="text"/>	

Synonym: 6 1,4-(1,3;1,4)-β-D-Glucan 4-glucano-hydrolase
 CAS Number: 9012-54-8 8
 Enzyme Commission (EC) Number: 3.2.1.4 ([BRENDA](#) | [IUBMB](#)) 7
 EC Number: 232-734-4 9
 MDL number: 10 [MFCD00081510](#)

Figura 13. Fotografía de la página SIGMA-ALDRICH con la información de la celulasa

¹¹⁵http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=es&N4=C9422|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

- 1- Nombre de la enzima
- 2- Fuente biológica (origen animal, vegetal o microbiano)
- 3- Código del producto (en el catálogo)
- 4- Forma física y pureza del producto comercializado.
- 5- Precio de esta enzima. Cuanto más difíciles son de conseguir más caras son.
- 6- Sinónimos del nombre de la enzima.
- 7- Nomenclatura EC específica para cada tipo de enzima. Pinchando sobre BRENDA o UBMB encontramos más información sobre esta enzima.
- 8- Numero CAS: es el código para la clasificación internacional de las sustancias químicas/ bioquímicas según el “*Chemical Abstract Registry Number*”. Sirve para identificar y buscar cada producto en bibliografía especializada.
- 9- Numero EC: Es el numero EINECS (European Inventory of Existing Comercial Chemicals) o numero ELINCS (European List of Notified Chemical Substances).
- 10- Número MDL. Es un número de identificación de cada reacción.
M indica la reacción, FCD es la base de datos que recopila la reacción. Los ocho dígitos son el número del producto.
- 11- Actividad específica

Una vez escogida y comprada la enzima, tenemos en los botes donde viene la enzima, toda la información relativa para el buen uso y rendimiento de esta enzima. A continuación vamos a mostrar la fotografía de un bote, donde podemos ver diferentes datos [Figura14].

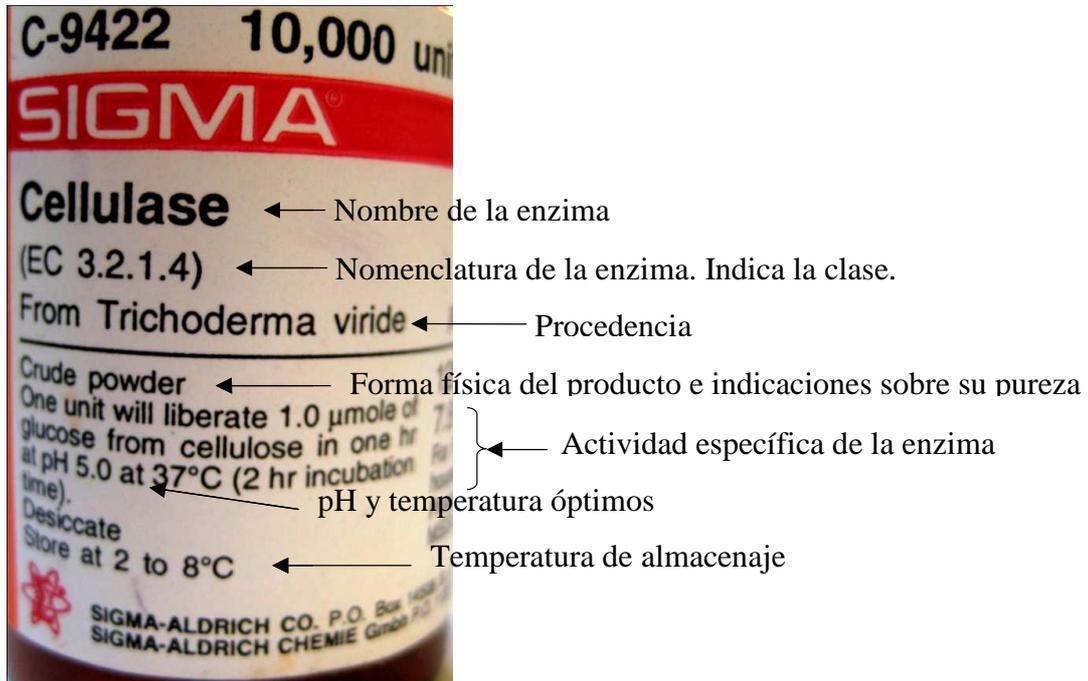


Figura 14. Fotografía de un bote de celulasa con información relativa a la enzima.

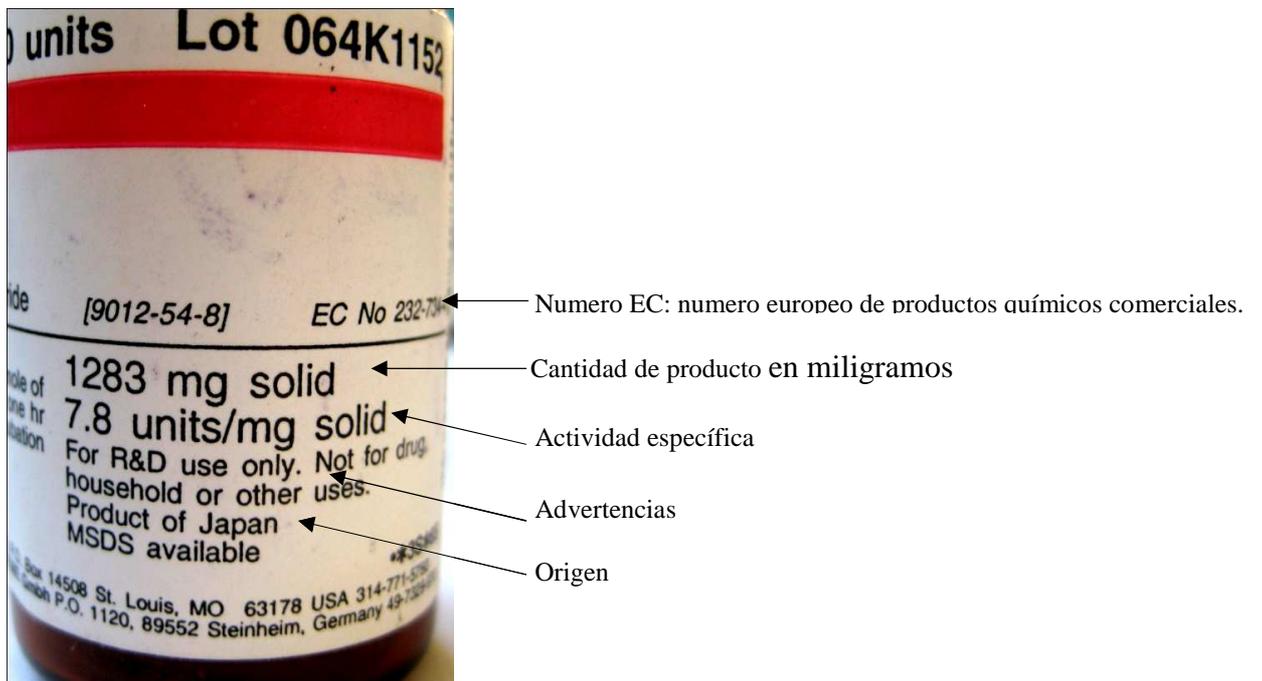


Figura 15. Segunda parte de la etiqueta de un bote de la enzima celulasa

I.7.5 Cálculo de la concentración de la enzima

Para calcular de antemano la concentración necesaria para cada enzima se realizará la siguiente operación ^[116]:

$$m_s = \frac{C_v \times V}{A_s}$$

m_s = gramos del enzima

V = milímetros de enzima en solución

C_v = concentración del enzima en unidades por ml en la solución

A_s = actividad del solido expresada en mg

Por ejemplo:

$$M_s = \frac{C_v (5 \text{ unidades/ml}) \times V (100 \text{ ml})}{A_s (1100 \text{ unidades/mg solido})} \times \frac{(1 \text{ g solido})}{(1000 \text{ mg solido})} = 0,00045 \text{ g solido}$$

Cuando la enzima viene en forma de solución

$$V_{\mu} = \frac{V \times C_v \times V_{BE}}{A_{BE}}$$

V_{μ} = volumen en μ l

V = mililitros de una solución de enzima

C_v =concentración unidades de actividad partido mililitros

A_{BE} es el número de unidades de actividad enzimática

V_{BE} es el volumen de enzimas concentrado

¹¹⁶ LEHNINGER, A., NELSON, D., COX, M., *Principios de Bioquímica*, 4º Edición, Ed. Omega Barcelona, 2006, pp. 204-208.

$$V_{\mu} = \frac{(10 \text{ ml solución}) \times (15 \text{ unidades/ml solución}) \times (35 \text{ ml volumen stock})}{(500,00 \text{ unidades})}$$

$$= 0,0105 \text{ ml} \times \frac{(1000 \mu\text{l volumen stock})}{1 \text{ ml volumen stock}} = 10,5 \mu\text{l}$$

I.7.6 Preparación de la solución o gel enzimático

Una vez observadas las características de la enzima, procedemos a prepararla en una solución o en un gel donde la enzima estará disuelta.

La actividad enzimática óptima está asociada a la particular forma espacial de la enzima. Esto obliga a prepararla siempre en un ambiente acuoso, ya sea en solución o en gel.

1- Tampón

Es recomendable preparar la solución enzimática directamente en el tampón más adecuado para cada enzima. No obstante, es posible mezclarla en primer momento con agua destilada exenta de iones metálicos pesados que puedan inhibir la enzima.

Si las enzimas han sido mezcladas con agua destilada, será necesario añadir después, el tampón para que el medio acuoso tenga un pH adecuado y constante. Estos buffers son necesarios para regular el pH cuando la solución enzimática está en contacto con otras sustancias (óleo o resinas naturales) con un pH diferente al necesario para que la actividad enzimática sea la correcta. Esta variación de pH puede disminuir o inactivar la actividad enzimática.

Los tampones más empleados en restauración son los siguientes:

Tampones que se utilizan con las enzimas	
Ambiente básico y neutro	Ambiente ácido
<p>- Tampón Tris o Trizma</p> <p>Permiten obtener valores de pH entre 7,2 y 9, sólo se varía la cantidad relativa de los dos componentes utilizados:</p> <p>La base Tris y su sal (cloro hidrato) Tris HCl.</p>	<p>- Tampón acético y acetato de sodio^[117 y 118]</p> <p>- Tampón fosfórico, compuesto de ácido fosfórico y sus sales sódicas , pH 5-5,5</p>

Tabla 6. Tampones empleados con enzimas

2- Cofactores

La adición de cofactores (iones metálicos), puede ser necesaria para la correcta actividad catalítica de algunas enzimas. Estos cofactores, como se ha visto con anterioridad, estabilizan la estructura de la enzima y sin ellos, la hidrólisis no se efectúa correctamente.

Por ejemplo, se sabe que algunas lipasas requieren la presencia de iones de calcio Ca^{2+} (como el cloruro de calcio) y que algunas amilasas necesitan iones de cloro en la solución.

3- Geles enzimáticos

Existe la posibilidad de aplicar las enzimas en gel. Esta opción suele estar relacionada con la obra y sustrato que se desea eliminar. A veces, es necesario aplicar la enzima en gel (porque la obra es sensible al agua), en un baño o de forma puntual.

Los geles o agentes gelificantes, son aptos para el buen funcionamiento de la actividad enzimática. Es aconsejable escoger los geles con alta viscosidad en concentraciones relativamente bajas (viscosidad de 4000 cps en concentraciones del 2-4 % peso/volumen), para reducir la cantidad de material sólido o residuos sólidos que puedan permanecer después de la limpieza.

¹¹⁷ 0,1ml de ácido acético (“glacial” 99,4-99,8% CH_3COOH de 1,05g/ml), 1,44g de acetato de sodio $NaC_2H_3O_2$ o 2,38g de acetato de sodio trihidratado $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ en un litro de solución

¹¹⁸ Solución tampón recomendada para el enzima amilasa a un pH de 5,75

Las cantidades de gel deben ser pequeñas porque la actividad enzimática disminuye con el tiempo y porque debemos evitar posibles proliferaciones de microorganismos en el gel.

El gel reduce la movilidad de la enzima, por lo que la viscosidad no debe ser elevada. No obstante, el tiempo de actuación no es muy elevado. Dependiendo de la enzima, este tiempo puede ser de 1 a 10 minutos o de 5 a 30 minutos. Siempre es necesario realizar unas pruebas previas para conocer el tiempo más adecuado para la limpieza de la obra.

Es recomendable cuando se limpia un estrato sobre un barniz, utilizar un pH alcalino para evitar la degradación del barniz y como consecuencia la degradación de la capa pictórica.

Los geles con un valor de pH ligeramente alcalino evitarán que el estrado de barniz sea agujereado llegando a atacar el color.

Agentes gelificantes idóneos para utilizar con enzimas ^[119]
<ul style="list-style-type: none">- Éter de celulosa como la Metilcelulosa (nombres comerciales: Benecel, Culminal, Glutofix, Methocel A, Tylose MB)- Hidroxipropilcelulosa (nombre comercial: Klucel G)- Agar-agar^[120]
Estos gelificantes son neutros y compatibles con todas las condiciones de pH
Atención a la carboximetilcelulosa de sodio (sal), puede no ser estable en condiciones ácidas.

Tabla 7. Diferentes tipos de geles utilizados en restauración

¹¹⁹ Existen muchos más geles que se utilizan con enzimas pero estos de la tabla son compatibles con los tratamientos de restauración y conservación de obras de arte.

¹²⁰ se conoce la utilización de agar-agar en algunos tratamientos con enzimas: 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.

4- Las enzimas

La adición de las enzimas al gel puede ser en forma de polvo o mezcladas en una solución y, siempre bajo una agitación suave para evitar desnaturalizarlas. Si observamos que la agitación es fuerte y se produce espuma, desecharemos esa muestra por haber desnaturalizado parte de las enzimas.

La concentración de las soluciones enzimática varía según el tipo de enzima y se calcula antes de la mezcla según las fórmulas que hemos visto con anterioridad. Puede variar entre 100-200 mg (con alta actividad específica) y 1 g (para las de baja actividad específica) de enzima en 100 ml de agua. También podemos preparar concentraciones de 0,5-1 g. de enzima en 100 ml de gel.

La solución enzimática se realizará a temperatura ambiente y, se suele recomendar que la mezcla se haga con materiales que no contengan iones metálicos (con cucharas de plástico o barritas de cristal), para no inhibir a la enzima. No obstante, no todas las enzimas se inhiben con iones metálicos, esto se puede averiguar en la base de datos de enzimas BRENDA ^[121].

Durante el calentamiento al baño maría de la solución enzimática, el recipiente permanecerá cerrado para que no se evapore el agua de la solución y varíe en exceso la concentración de la enzima.

La temperatura óptima de la solución varía dependiendo de la enzima. Un exceso de temperatura podría desnaturalizar la enzima irreversiblemente. Por tanto, para conseguir una temperatura constante y controlada, utilizaremos una placa con termostato de precisión.

En algunos geles, como los esteres de celulosa, puede producirse una precipitación que desaparece al enfriar ligeramente el gel y que no afecta a la actividad enzimática.

5- Adición de un tensoactivo

Es recomendable añadir un tensoactivo no iónico al gel enzimático para mejorar el contacto superficial con el sustrato y acelerar la reacción enzimática. La actividad

¹²¹ www.brenda-enzymes.org/ donde encontramos todo sobre enzimas (inhibidores, procedencia, temperatura y pH óptimos, etc.).

enzimática se ve ralentizada porque la enzima se encuentra en un medio acuoso y el sustrato está sólido o es hidrófobo como las ceras, resinas, óleos y por tanto, es difícil mojarlas.

El exceso de tensoactivo puede provocar efectos inhibidores en contacto con las enzimas. La proporción de tensoactivo añadido a la solución puede ser del 0,1 % en volumen/volumen para un tensoactivo líquido como el Tween 20, o peso/volumen para un sólido como el Brij 35 respecto al volumen del gel. La proporción debe ser estudiada y experimentada dependiendo de los casos.

6- Conservación del gel

El gel enzimático se conserva en el frigorífico a una temperatura de 2 a 8 °C hasta que se necesite emplearlo durante máximo de quince días. Cuando sea necesario su empleo, el contenedor deberá alcanzar la temperatura ambiente y deberá estar cerrado para que las enzimas no absorban la humedad ambiente. Paola Sartori aconseja mantenerlas entre 15 y 20 min fuera del frigorífico^[122], y en la documentación de algunos preparados enzimáticos te dicen que debes esperar mínimo, media hora.

I.7.7 Aplicación

A la hora de aplicar la solución enzimática, es necesario observar si las condiciones de trabajo son las más adecuadas.

Algunos productos enzimáticos trabajan a temperatura ambiente y no necesitan que la superficie de la obra pictórica esté templada. Sin embargo, si esto fuera necesario, con una simple lámpara incandescente de 50 W, mantenida a una distancia de seguridad, se puede calentar superficialmente la superficie hasta 35-40 °C y, por otro lado, mantener caliente la solución enzimática al baño maría. Nunca deberemos

¹²² SARTORI, P., “Gli enzimi nella pulitura dei dipinti”, *Progetto restauro*, Anno 2, N. 2, 1996, pp. 35-37.

sobrepasar los 45-50 °C, porque muchas enzimas son termo-sensibles y se desnaturalizan irreversiblemente con temperaturas elevadas.

Las soluciones enzimáticas pueden ser aplicadas en papetas, por impaco, en baños, con pinceles o con un algodón sobre la zona a tratar.

Los geles enzimáticos se extiende con impacos o con pinceles sobre una pequeña superficie, realizando movimientos con el pincel o dejando la solución que actúe.

Antes de aplicar la solución o el gel en toda la superficie de la obra, será necesario realizar diferentes pruebas para averiguar cuál son los tiempos más adecuados para la limpieza enzimática. Generalmente debemos observar cada minuto, cómo progresa la limpieza, llegando a dejar la solución enzimática de 1-10 minutos.

Con el empleo de geles debemos evitar los tiempos de aplicación largos y, que el gel llegue a secarse sobre la superficie de la obra. Esto puede solucionarse cubriendo el gel con Melinex y controlar el tratamiento gracias a la transparencia del Melinex.

1- Las enzimas en secuencia o en coctel enzimático.

En algunos tratamientos es necesario emplear las enzimas en secuencia, aprovechando al máximo la “selectividad” de cada enzima y no produciendo reacciones secundarias indeseables. A la hora de aplicar las enzimas en secuencia, las proteolíticas serán aplicadas en último lugar, ya que éstas pueden ralentizar la acción de otras enzimas.

En los soportes inorgánicos que son inertes a la acción enzimática de las hidrolasas, se puede emplear el coctel enzimático para eliminar todo el material orgánico presente encima del soporte.

Sin embargo, en soportes orgánicos como el textil y las tablas policromadas, es mejor no emplear los cocteles enzimáticos porque el riesgo es difícil de predecir.

I.7.8 Eliminación

Una preparación enzimática contiene un medio acuoso y materiales sólidos que no son volátiles ni hidrosolubles, por lo que el único proceso que garantiza la completa eliminación de residuos sólidos es un lavado acuoso.

1- Proceso a llevar a cabo para la eliminación de las enzimas

En primer lugar se retira la solución enzimática con un algodón seco y luego se lava la obra (si es de papel o textil). Paolo Cremonesi recomienda la adición de un tensoactivo a la solución acuosa en los primeros lavados y nos enumera los siguientes productos:

- Hiel bovina al 0,2 % peso/ volumen en agua
- Tween 20 al 1-2 % volumen/volumen en agua
- Saliva artificial (utilización recomendada)

Los lavados posteriores a la hidrólisis enzimática, son importantes porque arrastran y suprimen los fragmentos lipófilos, de las macromoléculas originales que han sido hidrolizadas por las enzimas. Estos fragmentos no son hidrosolubles y pueden quedarse adheridos a la superficie, en vez de ser eliminados cuando se retira el gel. La acción del tensoactivo, aparte de emulsionante, sirve para solubilizar materiales lipófilos y conseguir la supresión de éstos. Estos lavados con tensoactivo deben repetirse varias veces.

En segundo lugar, debemos eliminar los residuos del tensoactivo con un algodón empapado con agua destilada y dejamos secar la zona. Pasadas 4 ó 5 horas, se efectúan varios lavados de la zona tratada con disolventes ligeros: (hidrocarburos como esencia de petróleo, White Spirit, etc.) con el objetivo de saturar óptimamente la superficie e inhibir la posible acción enzimática residual.

En caso de querer repetir el proceso enzimático, la aplicación de los disolventes será efectuada por último, ya que éstos tienen una acción inhibidora en contacto con las enzimas.

2- Diferentes maneras de desnaturalizar o inhibir una enzima ^[123]

Para desactivar una enzima, lo único que hay que hacer es destruir la estructura proteica tridimensional de la enzima, es decir, desnaturalizarla. Para ello hay diferentes métodos químicos, térmicos o físicos:

- Mezclar disolventes (etanol, acetona, etc.) o ácidos y bases fuertes con agua.
- Soluciones acuosas muy concentradas de Urea.
- Algunos detergentes.
- Variaciones de pH (extremo).
- Cambio de la temperatura (exceso de calor).
- Radiaciones.
- Añadir iones de metales pesados (hierro, cobre, mercurio, plomo...) que causan la precipitación de la enzima.
- Modificar algunos grupos funcionales que inactivan la acción catalítica de la enzima.
- Acciones mecánicas como las altas presiones
- Producir espuma al agitar vigorosamente una enzima.

I.7.9 Precauciones de uso

1- Potencial perjudicial para el restaurador

Según la normativa CEE, en la escala de peligro creciente “irritante-nocivo-toxicamente toxico” las enzimas como mucho pueden llegar a ser irritantes en forma de polvo. Por eso es conveniente no inhalarlas y no mantener un contacto cutáneo prolongado. Además, las otras soluciones o sustancias que son utilizadas con las enzimas tampoco suelen ser demasiado peligrosas, ya que suelen ser sustancias acuosas (tampones, geles, tensoactivos...).

¹²³ BANIK, G., CREMONESI, P., LA CHAPELLE, A., MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Ed. Il prato, Padova, 2003.

Es necesario protegerse con guantes, máscara de polvo y gafas para evitar cualquier tipo de contacto a la hora de abrir el frasco de las enzimas. Esta operación es la más arriesgada en el uso de enzimas porque pueden provocar irritaciones cutáneas y alergias.

2- Potencial perjudicial para la pintura

Muchos restauradores e incluso investigadores mantienen la hipótesis que la eliminación de las enzimas una vez empleadas, es muy difícil. Además, también se piensa que las enzimas desactivadas pueden activarse transcurrido un tiempo debido a cambios de algunos factores de pH y temperatura.

La posibilidad de que una enzima se reactive es casi imposible porque al desnaturalizarlas, pierden su estructura específica necesaria para su actividad enzimática, y esto es irreversible. No sólo el cambio de pH, temperatura, presencia de sales, presencia de metales inhibidores en los pigmentos de la pintura y pérdida del medio acuoso puede desnaturalizar la enzima, además, las enzimas una vez desnaturalizadas empiezan a alterarse irreversiblemente como sucede con todas las sustancias proteicas perdiendo así su estructura (tan necesaria para su actividad enzimática).

En un artículo Wolbers, Meyer Andrews et al., demuestran que en solo la primera limpieza acuosa, la eliminación es del 99 % de las enzimas. Por lo que, en caso de que no eliminásemos ese 1 % restante, la pérdida del medio acuoso, su desnaturalización, inhibición y degradación reduciría la actividad enzimática a cero.

I.7.10 Almacenamiento

Anteriormente se ha dicho que las enzimas deben ser conservadas en el frigorífico a una temperatura de 2 a 8 °C, sin embargo algunas de ellas necesitan ser guardadas en el congelador a – 20 °C para su correcta conservación, como por ejemplo la peroxidasa.

Las enzimas en forma liofilizada (polvo) suelen durar de 9-12 meses si se conserva apropiadamente.

Una vez preparada la solución enzimática de baja concentración, se altera rápidamente y debe ser conservada en frío cuando no se usa. De este modo, durará de dos a tres semanas con una progresiva disminución de la actividad enzimática hasta ser inservible. Por este motivo es recomendable no preparar grandes cantidades, a menos que se vaya a utilizar todo en poco tiempo. Las concentraciones menores a 5 mg/ml se deben preparar cada dos o tres días. Sin embargo, cuando son almacenadas en sólido o en concentraciones líquidas muy elevadas, la actividad enzimática disminuye de 1-2% por año.

I.8 Utilización de enzimas en procesos de conservación y restauración de obras de arte.

El primero que empleó una enzima (la tripsina) para eliminar adhesivos proteicos, fue Sheridan^[124] en los años sesenta, pero quizá los pioneros en la utilización de enzimas en procesos de conservación y restauración de obras de arte fueron Wendelbo & Fosse en 1970^[125]. Éstos publicaron un artículo de sus resultados para separar documentos con una enzima. Compararon esta técnica a la utilización de un “escalpelo” (pero mucho más efectiva).

Actualmente, existen numerosos tratamientos con enzimas y diferentes tipos de enzimas aplicables a obras de arte dependiendo del sustrato a eliminar. Además en cuantiosas ocasiones, sin la utilización de enzimas, muchas operaciones no serían factibles. Normalmente las enzimas son empleadas en limpiezas e intervenciones estructurales: eliminación de repintes oleosos, residuos de cola de pasta de un reentelado, viejos adhesivos de base proteica u oleosa, etc. Y estos tratamientos son aplicados sobre diferentes soportes como el papel, textil, madera, cerámica, etc.

Las diferentes aplicaciones enzimáticas resumidas a continuación, han sido extraídas de diferentes libros y artículos editados en diferentes revistas del mundo de la restauración. Hemos seleccionado las limpiezas con enzimas más empleadas pero existen muchos más tratamientos enzimáticos.

I.8.1. Listado de enzimas aplicadas en limpiezas

La α -amilasa se usa para la eliminación de pasta de trigo, la colagenasa para la supresión de pegamentos y adhesivos animales en tejidos de lana y seda y, la lipasa para quitar manchas de grasa y aceites en todas las fibras. No obstante, estas tres

¹²⁴ SHERIDAN, J., “Enzymes, as they relate to the conservator of paintings”, *exposition of painting conservation*, Ed. Brooklyn Museum, Nueva York, 1962.

¹²⁵ WENDELBO, O., FOSSE, B., “Protein “Surgey” A Restoring Procedure Applied on Paper”, *Restaurator press*, Vol. 1, 1970, Denmark, pp. 245-248.

enzimas no son las únicas empleadas en restauración; existen diferentes tipos de enzimas utilizadas para la supresión de depósitos de alimento, almidones, depósitos celulósicos y proteináceos, pegamentos orgánicos, colas de difícil disolución, sustancias orgánicas antiguas en tejidos, manchas que han migrado al reverso, etc. Por ejemplo, las enzimas pancreáticas se utilizan porque tienen un pH más o menos neutro y no afectan a la mayoría de fibras y tintes. La catalasa del hígado, puede romper las moléculas de peróxido de hidrógeno en diferentes medios (agua y oxígeno) a una velocidad de 40000 moléculas por segundo, siendo la concentración normal de la solución de enzimas aproximadamente de 0.01-0.1 %.

A continuación mostramos una lista de enzimas aplicadas en diferentes soportes y los sustratos que eliminan:

Enzimas	composición	Sustrato	Producto
Diastasa	Mezcla de α -amilasa y β -amilasa	Almidón	Dextrinas
α -amilasa		Amilasa Amilopectina	α -D-glucosa
β -amilasa		Amilasa Amilopectina	α -D-glucosa
Celulasa		Celulosa	β -D-glucosa celobiosa
Proteasa		Proteínas Excepto colágeno (e. colágeno)	Fragmentos de proteínas + aminoácidos
Tripsina		Proteínas	Fragmentos de proteínas + aminoácidos
Colagenasa		Colágeno	Fragmentos de proteínas + aminoácidos
Gelatinasa		Colágeno hidrolizado	Fragmentos de proteínas + aminoácidos
Lipasa		Grasas	Glicerina + ácidos grasos
Oleasa		Aceites	Glicerina + ácidos grasos
Pancreatina	Mezcla : amilasa, tripsina, lipasa, proteasa y ribonucleasa	Mezcla de manchas	Mezcla de fragmentos

Tabla 8. Tabla que recopila las enzimas que se aplican en restauración, sobre qué soportes se aplica y el producto que se produce.

Y la siguiente tabla resume disolventes y soluciones, que pueden ser apropiadas para la eliminación de algunas manchas en textiles históricos (sujetos a pruebas de sus efectos en fibras, tintes, acabados, etc.) y en otros soportes.

Mancha	disolventes o reactivos
Cola animal, gelatina Tinte básico	Soluciones de detergente; enzimas proteínasa (gelatinasa)
Sangre antigua	Solución aniónica de detergente; disolución de hidróxido de amonio; enzimas proteínasas como la tripsina; agentes secuestrantes
Chocolate	Detergente no iónico en Solución, disolución de hidróxido de amonio, disolvente de “limpieza seca”, enzima lipasa.
Huevo	Detergente en solución; enzimas proteínasa como tripsina
Manchas de grasa o grasientas	Detergente en solución (posible mezcla de detergentes aniónicos y no aniónicos); disolución de hidróxido de amonio; disolvente de “limpieza seca”; enzimas lipasa/oleasa
Almidón	N-metil 2 pirrolidona; enzimas amilasa

Tabla 9. Tipo de manchas que encontramos sobre las obras de arte y las diferentes soluciones que se emplean para su supresión.

I.8.2 Amilasas

Estas proteínas glucolíticas son capaces de hidrolizar diversos materiales amiláceos sean o no, de antiguas restauraciones.

Muchos de estos productos como la pasta de almidón, la goma arábiga y otras gomas vegetales, mantienen a través del tiempo una buena reversibilidad, por lo que no necesitan una hidrólisis para su eliminación. Sin embargo, algunos de ellos fueron mezclados con otros productos porque se creía que mejoraban sus características y lo que ha provocado realmente es que su eliminación sea difícil y se requiera la aplicación de estas enzimas.

Las amilasas no suelen ser utilizadas directamente sobre las superficies pintadas. Suelen emplearse sobre todo para eliminar intervenciones de consolidación de una pintura y para separar residuos de barnizado (colas de almidón o colas de pasta).

Su aplicación suele realizarse sobre el reverso de una pintura, para eliminar los residuos de un reentelado y, esta acción es segura porque las amilasas no tienen ningún efecto hidrolítico sobre la celulosa y por tanto no hidrolizan ni el papel, ni el textil, ni la madera.

No es recomendable aplicar las amilasas sobre obras realizadas con pintura de acuarela, guache o ciertas temperas grasas. Estas enzimas degradan el aglutinante de estas técnicas, que principalmente es la goma arábiga u otro tipo de gomas polisacáridas.

Además este aglutinante es sensible al agua o un medio acuoso, por lo que la utilización de enzimas es incompatible en estos casos.

A continuación vamos a resumir diferentes aplicaciones enzimáticas encontradas en diversas revistas y libros especializados de restauración.

I.8.2.1 Amilasas en manuscritos

Segal y Cooper ^[126] aportaron la utilización del α -amilasa para la retirada de pasta adhesiva de almidón en manuscritos. La acción de la enzima α -amilasa es romper las largas cadenas de amilosa y amilopectina (polímeros de glucosa) del almidón en pequeñas moléculas de dextrina. La degradación del almidón por vía enzimática es suficiente como para permitir retirarlo fácilmente.

Para medir las condiciones de reacción, Segal y Cooper utilizaron una preparación refinada de alfa amilasa, libre de otras enzimas y de sustancias extrañas. Recomiendan comprar enzimas puras para no tener otras reacciones inesperadas y, prepararon la enzima según las siguientes condiciones:

- A una temperatura de 37 -39 °C,
- Con un pH de 6,95
- Con una concentración de 0,1 %

¹²⁶ SEGA, J., COOPER, D., “ The use of enzymes to release adhesives”, *Paper Conservator* n°2, 1977, pp.47-50

Antes de su aplicación examinaron el estado físico del papel. Al darse cuenta que la condición del papel era buena y el agua no tenía efecto sobre la tinta de la hoja, el papel se sumergió en una solución enzimática para que perdiese el adhesivo.

Las reparaciones anteriores del papel se retiraron con ayuda de espátulas y pinzas en la propia agua. La hoja del manuscrito permaneció en la solución enzimática el tiempo necesario para que el adhesivo se degradase completamente. Este tiempo de reacción varió entre los 10 minutos y una hora, dependiendo de los casos.

En algunos casos, en papeles frágiles y deteriorados, se colocaron sobre tejidos no tejidos y se introdujeron en la solución enzimática. Transcurridos unos minutos, el papel fue extraído, aclarado y secado. La eliminación del adhesivo degradado enzimáticamente en el baño, se realizó en seco. Posteriormente, fue necesario efectuar dos lavados en agua fría (el agua debe estar fría ya que si no la enzima se coagula y es difícil de eliminar) y otro en agua a una temperatura de 50 °C.

El papel fue después desacidificado en un baño de una solución de bicarbonato de magnesio.

I.8.2.2 Cartones preparatorios de tapices.

Ariane De La Chapelle relata en un artículo ^[127] las dificultades que entraña la restauración de unos cartones (de tapices) compuestos por muchas hojas encoladas. Éstos tienen diversos problemas como la pérdida del sustento mecánico de las telas, la incompatibilidad mecánica de los papeles de refuerzo entre la tela y la obra y, el envejecimiento de la cola.

- Protocolo descrito por la autora
- Realización de copias de los originales para hacer pruebas sobre ellas.
- Utilización de la concentración mínima y suficiente de enzima que vendrá dada tras diferentes pruebas.

¹²⁷ DE LA CHAPELLE, A., « Utilizzo degli enzimi nel restauro delle opere grafiche policrome », *Materiali tradizionali ed innovativi nella pulitura dei dipinti e delle opere policrome mobili: atti del convegno, Piazzola su Brenta (PD), 25-26 ottobre 2002*, Ed. Il Prato, Padova, 2003, p.51-53

- La hidrólisis del almidón de la cola debe realizarse a temperatura ambiente.
- La difusión del enzima a través de los papeles es la etapa que limita un poco la actuación del enzima. Es aconsejable emplear tensoactivos (mín. al 1%) porque aumenta la difusión del enzima en la cola y ayuda a mantener la actividad enzimática en un medio alcohólico (de esta manera se reduce el empleo de agua).

I.8.2.3 Tratamiento de un mapa de América del siglo XVII

En 1991-1992 se llevó a cabo la restauración de un mapa mural de América muy raro, publicado en 1698 por el cartógrafo francés Nicholas De Fer.

A lo largo de los bordes del mapa estaban pegadas tiras de papel que recubrían en la parte superior, el título original y en la parte inferior, datos geográficos del mapa. Estas tiras se eliminaban fácilmente humedeciéndolas, pero el texto original quedaba pegado al reverso de algunas tiras. Un año después, María Bedynski^[128] consiguió separar estos dos fragmentos y emplazar el texto en su lugar de origen técnica enzimática.

El análisis de la cola empleada para pegar las tiras de papel al mapa, indicaron que existía la presencia de almidón. Por lo que se eligió la amilasa tipo II-A de la especie *Bacillus* mezclada en metilcelulosa.

- Preparación del gel:

La concentración de la enzima utilizada por la autora fue de 1 mg/10 ml en metilcelulosa. Este gel contenía:

- 0,005 mol/m³ de agua desionizada,
- Cloruro de calcio (0,735 g/L de cloruro dihidratado)
- 0,05 mol/m³ de tampón Trizma (0,735 g/L a pH 7)

¹²⁸ BEDYNSKI, M., "The use of enzymes in the conservation treatment of a seventeenth-century wall map of America", *Journal of the International Institute for Conservation* Vol. 20, Ed.Canadian Group, Canada , 1995, pp. 11-18.

Una vez preparado el gel, se usó papel japonés y 10ml adhesivo Lascaux en 5ml de agua (insoluble en agua una vez seco) antes de utilizar la solución enzimática.

Posteriormente, emplearon la solución enzimática para separar el papel en las zonas deseadas y actuaron de la siguiente manera:

- Depositaron con un pincel el gel y el tiempo de actuación calculado entre 10 minutos y 1 hora, fue tan sólo de 5 minutos, debido a la porosidad del papel. Este tiempo depende de la velocidad de penetración de la solución enzimática
- La temperatura fue mantenida a 37 °C para tener una buena actividad enzimática.
- Para la separación de los textos utilizaron una espátula de teflón.

Por último, emplearon tampones de algodón con agua desionizada para eliminar la solución enzimática y usaron etanol para desactivar cualquier residuo enzimático.

I.8.2.4 Eliminación de pasta de almidón en manuscritos de papel con la compresa Albertina (impaco de amilasas listo para utilizar)

El desarrollo de un gel enzimático listo para utilizar fue desarrollado tras la restauración de la obra de arte gráfica de la colección Albertina de Viena ^[129], que había sido montada sobre álbumes con pasta de almidón modificada. Esta pasta contenía alumbre ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) empleado a partir del siglo XIX para alargar la conservación de la pasta de almidón. Pero, al envejecer este tipo de pasta, se fragiliza y es difícilmente hinchable. Además, provoca tensiones, formación de pliegues y deformaciones. Además, la colección Albertina estaba compuesta por xilografías japonesas con tintas muy sensibles al agua.

1- Procedimiento a seguir para un correcto resultado de la actividad enzimática

Este tratamiento utilizado en adhesivos de pasta de almidón rígidos y difíciles de eliminar, no requiere un post-tratamiento de lavado o aplanado y es perfecto en

¹²⁹ BANIK G., CREMONESI P., DE LA CHAPELLE, A., MONTALBANO, L., *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*, Ed. Il prato, Padova, 2003, pp. 117-124

papeles finos, ya que no existe pérdida de fibras. Además es un método económico por el poco trabajo que requiere.

2- Protocolo de actuación:

Para este procedimiento es necesario limitar la zona a tratar para no contaminar otras zonas.

El impaco enzimático consta de tres partes:

- 1-Un material sintético con un gel de enzimas
- 2-Un papel intermedio entre la obra y el material con enzimas
- 3-Un papel absorbente para retener el agua

En primer lugar, el papel intermedio es colocado sobre la zona a tratar y debe extenderse 2mm de cada lado del adhesivo. Este papel no es permeable a los componentes gelificantes por lo que previene la migración del gel al original. Sobre este papel es depositado el impaco con enzimas, que posee la misma dimensión que el adhesivo a eliminar.

El tercer estrato es el papel absorbente (o un estrato capilar) que retiene el agua y tiene las mismas dimensiones que el impaco.

3- Pasos a seguir:

- 1- Se humedece los componentes del impaco enzimático con un pincel. La humidificación del trozo de tejido no tejido de 4 cm^2 necesita 0,08 ml. y el material de retención de agua de la misma dimensión necesita 0,8 ml. aproximadamente.
- 2- Se coloca el material impermeable (Melinex) 4 cm más grande de cada lado que el impaco sobre el que se aplica, para prevenir el desecamiento durante el tiempo de aplicación.
- 3- Después se deposita un peso de $10\text{-}15 \text{ g.cm}^2$.

- 4- Transcurridos 5-10min se verifica que existe suficiente humedad en contacto con el impaco para que penetre en él.

El tiempo necesario para la separación depende de la humedad penetrada, de la permeabilidad del papel y del espesor y rigidez del almidón. Un exceso de agua tendrá como resultado la formación de cercos de humedad y demasiada poca la ineficacia de la enzima.

Después del tratamiento es aconsejable la eliminación de los residuos formados. Por otro lado la desnaturalización del enzima no es necesaria con este tratamiento.

I.8.2.5 Tejidos coptos

Jeremy Uden ^[130] publicó un artículo sobre la limpieza de unos tejidos de los siglos III y IV d.C. Estos tejidos coptos presentaban restos de cola que permanecían en ellos tras su separación de unos paneles. Para su eliminación decidieron emplear la enzima α -amilasa (sigma tipo X-A obtenida de *Aspergillus oryzae*).

1- Proceso

En primer lugar, se dibujó las medidas del tejido en un papel melinex antes del baño, para contrastar sus dimensiones antes y después del tratamiento y cerciorarse que el tejido no había sufrido ningún tipo de encogimiento o deformación después del proceso.

La preparación de la solución enzimática fue la siguiente:

- Se añadió en un litro de agua desionizada 2,4 g de NaH_2PO_4 (0,2 M), se ajustó el pH a 6,9 y se calentó hasta 37 °C. Para conseguir que esta temperatura fuera constante, se introdujo agua en una bañera a 40 °C y se colocó sobre el agua, una caja de polipropileno con el agua de la solución dentro.

¹³⁰ UDEN, J., "The conservation of fragments of Coptic textile" *SSCR journal*, vol. 8, N. 3, Edinburg, 1997, p. 16-19.

- Posteriormente, se agregó 2,5 g de enzima α -amilasa en polvo (esta solución tiene una actividad enzimática de 50-100000 unidades por litro).

2- Tratamiento:

Los tejidos coptos se metieron en la solución enzimática caliente durante 10 min. Transcurrido ese tiempo, consiguieron eliminar los depósitos blancos con una brocha suave en 30 min.

A continuación midieron el pH de los tejidos y los cubrieron con una tela de nylon. Después, depositaron controladamente sobre el textil, con ayuda de esponjas naturales, una solución al 1 % del detergente Orvus WA Paste. Después, aclararon los tejidos con agua desionizada. Una vez seco, verificaron que efectivamente, los tejidos no habían encogido en absoluto.

El tratamiento fue un éxito. Las piezas quedaron suaves y flexibles; la decoloración y el aspecto de las fibras habían mejorado; los depósitos blancos habían desaparecido y el pH aumentado.

I.8.2.6 Identificación de componentes amiláceos y proteicos por vía enzimática

Para identificar los materiales amiláceos, normalmente se emplea el yodo que da una coloración azul en presencia de almidón. El problema principal de este test microquímico es que en muestras muy pequeñas, la coloración es insuficiente para determinar si el producto testado es almidón.

Ariane de La Chapelle et al.^[131] desarrollaron un método simple y fácil de realizar, para detectar la presencia mínima de cola.

¹³¹ DE 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.

- **Protocolo de actuación**

En un primer tubo se depositó la muestra de cola, el yodo yodado 0,5 g de I₂, y 1g de KI en 100 ml de H₂O. En otro, se introdujo la misma cantidad de adhesivo y yodo yodado y la enzima alfa-amilasa (durante una hora). Esta enzima modifica la coloración en presencia de amilosa hasta la completa decoloración de la solución inicial.

Para colas de piel se utiliza la colagenasa, y para otras colas proteínicas la pronasa E. Este método lo menciona Banik^[132] para verificar la correcta actividad de una solución enzimática en una limpieza. Para ello es necesario preparar una tira de papel y sumergirla en una solución de almidón de patatas al 0,2 %. Posteriormente sobre el almidón se deposita una solución de un reactivo de yoduro al 0,01 %, lo que provoca la aparición de un color azul intenso. Para averiguar si el gel de enzimas trabaja correctamente es necesario aplicar el gel con amilasas sobre la superficie del papel manchado y esperar a que el color desaparezca. Esto significa que el gel enzimático trabaja correctamente.

I.8.2.7 Geles enzimáticos de amilasas

1- En limpiezas de textil

Los adhesivos de antiguas restauraciones de tejidos suelen tener muy mal envejecer: Se oxidan, crean tensiones, las manchas de los adhesivos migran y en algunos tratamientos pegaban otros materiales (como tejidos) a los papeles.

Leslie Smith^[133] entre otros, propone tratamientos con geles enzimáticos para separar los papeles de las telas.

¹³² BANIK, G., "Removal of Starch paste adhesives and relinings from paper based 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, pp.33-38.

¹³³ SMITH, L., "Use of enzymes in textile cleaning" *Preprints of papers presented at the fifteenth annual meeting of the American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works. Vancouver, British Columbia, Canada, May 20-24, 1987*, Ed. The American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, Washington DC, 1987, pp. 124-131.

- **Tratamiento**

En primer lugar se limita el área a tratar, para aplicar posteriormente el gel enzimático sobre el material que deseamos eliminar o separar.

Las enzimas se añaden al gel de metilcelulosa en agua desionizada con una concentración del 2 %, con el tampón de sodio o fosfato de potasio a un pH 7, y 0,01 % de Igepal CA 630 como agente emulsionante para mantener la descomposición de partículas. La temperatura debe ser la adecuada, y el pH puede ajustarse a un punto dictaminado por la estabilidad del material.

A continuación, se calienta el gel con la enzima, más o menos a una temperatura de 38 °C. Esta temperatura debe permanecer constante mientras se trabaja (el objeto puede ser depositado sobre una lámina de vidrio o Perspex que soporta temperaturas superiores a la del agua templada).

El gel se aplica encima de la zona delimitada y se van eliminando gradualmente los estratos (cada vez más finos).

Por último, se lava el objeto primero con agua fría para prevenir la coagulación de la enzima, y posteriormente con agua a 50 °C. Los residuos enzimáticos pueden ser desnaturalizados con alcohol.

Según el examen microscópico, estos tratamientos enzimáticos no son perjudiciales para el textil ya que no existe ninguna degradación después del tratamiento.

2- En papel

Existe la posibilidad de utilizar las enzimas en gel para una aplicación local (como hemos visto con anterioridad).

Múltiples estudios en papeles sensibles al agua demuestran que es posible eliminar residuos de adhesivos difícilmente solubles, con geles enzimáticos.

A continuación detallamos un ejemplo de una preparación de amilasa y proteasa con metil-celulosa, ya que este gel es un vehículo de humedad muy bueno y un transporte de suciedad muy útil.

En primer lugar, mezclamos 100 ml de solución tampón, 900 ml de agua destilada y 20 g de metilcelulosa.

-Una solución tampón utilizada para la amilasa es el orto fosfato disódico de hidrógeno 17,3 g en un litro de agua destilada.

-Para la proteasa, son 12,2 g de orto fosfato sódico de dihidrógeno en un litro de agua destilada para preparar la solución tampón.

Por último se añade la enzima deseada y el gel enzimático se conserva en el frigorífico cuando no se utiliza.

En algunos papeles donde se observa la corrosión de la tinta ferro-gálica y deben tratarse en un medio acuoso, se emplean por una parte geles de amilasa, parcialmente acuosos conteniendo el disolvente metoxi-etanol (etilén glicol metil éter), y por otra parte, geles de óxido de polietileno (polietilenglicol) con aditivos de amilasa y de metoxi-etanol.

3- La saliva

Según Lesli Smit^[134], la saliva posee una variedad de amilasas que actúa sobre el almidón y algodón, siendo ideal para romper las pequeñas manchas. La saliva no está concentrada (97,5 % es agua) y tiene un pH de 6,8. Pero según estudios realizados de O'Hoski demuestran que el agente de la saliva que actúa en las limpiezas no es la enzima amilasa sino la proteína mucina, con acción emulsionante y una gran propiedad tensoactiva.

La saliva se puede fabricar sintéticamente y se emplea como gel para la limpieza de obras de arte. Se puede realizar “saliva sintética”^[135] disolviendo 150 mg de mucina y 150mg de sal de triamonio de ácido cítrico en 100 ml de agua desionizada a 37 °C. El pH de la solución debe ser de 7.

¹³⁴ SMITH, L., “Use of enzymes in textile cleaning” *Preprints of papers presented at the fifteenth annual meeting of the American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works. Vancouver, British Columbia, Canada, May 20-24, 1987*, Ed. The American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, Washington DC, 1987, pp. 124-131.

¹³⁵ 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.

I.8.3 Proteasas

Las proteasas se han empleado mucho para eliminar colas y gelatinas animales, albúminas, caseína, huevo, etc. porque son capaces de degradar los enlaces peptídicos. Algunas de estas enzimas consiguen hidrolizar simples almidones, ésteres y oligopéptidos, sin embargo otras son específicas solo para polipéptidos.

Estas enzimas también se utilizan en intervenciones más estructurales, donde se busca la consolidación, patinado y eliminación de colas.

No se recomienda el uso de las proteasas en contacto directo con sustancias como la tempera al huevo y el dorado, porque obviamente la naturaleza proteica del aglutinante, lo hace vulnerable frente a la acción hidrolítica de las proteasas.

En soportes murales, las proteasas no pueden hidrolizar sustratos a base de caseína, porque la caseína es aplicada como caseinato cálcico que son aniones y las enzimas son inhibidas. No obstante, la solución enzimática consigue reblandecer este tipo de sustrato que posteriormente se puede extraer mecánicamente.

A continuación exponemos varios ejemplos encontrados en revistas y libros especializados en restauración.

I.8.3.1 Proteasas (proteasa bacteriana, papaína y pepsina) en el tratamiento de pinturas de óleo sobre tela

Paolo Cremonesi deja siempre bien claro que antes de utilizar enzimas, hay que asegurarse que el estrato a eliminar no es soluble en procesos mucho más sencillos. Antes de emplear las enzimas es necesario conocer al detalle todos los elementos constitutivos de la obra.

En un artículo de “progetto restauro” ^[136], dos olios sobre tela del siglo XVII – XVIII, poseían albúmina sobre la superficie. Ésta fue aplicada seguramente en algún proceso de conservación antiguo. Para su eliminación, fueron probados tres enzimas

¹³⁶ 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, pp. 11-19.

proteolíticas: una proteasa microbiana en gel tamponado a pH 8,4, la papaína (enzima proteolítica parecida a la pepsina) en gel tamponado a pH 7,4 y la pepsina en gel tamponado a pH 5,5.

El proceso de limpieza de la albúmina fue el siguiente:

1. Prelavado de la superficie con saliva artificial, para eliminar los materiales depositados superficialmente. Éstos pueden inhibir la actividad enzimática de las enzimas sobre la patina proteica.
2. Precalentamiento de la superficie a 35 °C con una lámpara situada a una cierta distancia. Así la enzima actúa más rápidamente, ya que la temperatura superficial es la adecuada para la actividad enzimática.
3. Aplicación de la Papaína (fue escogida por su tiempo de actuación y por su pH neutro)
4. Limpieza con un algodón seco, y posteriormente con un tensoactivo para eliminar los residuos que hubieran podido quedar, tanto de enzima como de elementos de desecho del material.

En este artículo fue demostrado que las enzimas eran las que eliminaban la albúmina y no otros materiales utilizados en la limpieza.

En otro artículo Belluci y Cremonesi ^[137], exponen la limpieza de un óleo sobre tela del siglo XVII, la “*Deposizione*”. Este cuadro estaba recubierto por una capa de suciedad muy consistente, repartida homogéneamente sobre toda la superficie de la pintura, e impedía la lectura de la imagen inferior. Para la eliminación de la suciedad se utilizó un gel de proteasas, y seguidamente se eliminaron mecánicamente con un bisturí algunas manchas de pequeñas dimensiones diseminadas por la superficie. Después de la limpieza, se observó la existencia de un estrato de barniz heterogéneo y antiguo sobre la superficie.

¹³⁷ BELLUCCI, R., CREMONESI, P., “L' uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti”, Ed. *Kermes: arte e tecnica del restauro*, vol. 7, n. 21, Firenze, 1994, pp. 45-64

I.8.3.2 La tripsina para separar papiros de capas de yeso

La enzima tripsina se utiliza cuando los adhesivos de restauraciones antiguas son de naturaleza proteica. La tripsina hidroliza péptidos, amidas, esterres y uniones de los grupos carboxilos de la arginina y lisina (aminoácidos). Debido a que los pegamentos a base de colágeno contienen lisina, la tripsina es capaz de desintegrar el pegamento. Margot Wright^[138] utilizó esta enzima para separar papiros de capas de yeso. Aunque ella puntualizó que era necesario añadir hidróxido de sodio 1 N (4% w/v) para mantener estable el pH. La tripsina consigue una mayor actividad cuando la solución tiene un pH 7 y está a una temperatura de 25 °C. En aplicaciones concretas, es posible aplicar la solución enzimática con una brocha para eliminar tiras de papel. Se deja actuar la solución durante unos minutos y se retiran los fragmentos con pinzas. Por último, la enzima se inactiva con alcohol.

I.8.3.3 Proceso de restauración de una colección de cromos^[139]

En un estudio realizado en España fue empleada la tripsina en una colección de cromos para la supresión de restos de cola que eran difíciles de eliminar sin afectar a los pigmentos.

Después de efectuar diversas pruebas [Tabla 1], llegaron a la conclusión que el empleo de la tripsina era el más adecuado para la estabilidad y eliminación de manchas de los cromos.

	ESTABILIDAD DE TINTAS	ELIMINACIÓN DE MANCHAS
AGUA 20 °	++	-
AGUA 45°	+	-
TRIPSINA	++	++
AGUA Y ETANOL	-	-

Tabla 10. Tabla del artículo de Paloma Sánchez y Christian Priebe, publicado por internet.

¹³⁸ WRIGHT, M., "A method of extracting papyri from cartonnage", *Studies in conservation*. Vol. 28, n. 3, 1983, pp. 122-126.

¹³⁹ Proceso recogido del artículo publicado por internet.
<http://perso.wanadoo.es/sanchez.priebe/articulo.htm>

Protocolo de actuación

1- Preparación del baño con la solución enzimática

- Para la preparación de la solución enzimática, se empleó una concentración de tripsina de 2 mg/l (5000 U/l) en agua de Bejis (Castellón). Esta agua contiene altas concentraciones de carbonatos y carece de cloro.
- El pH correcto de la solución enzimática tiene que ser 7. Por lo tanto este pH se controló con la ayuda de un tampón adicional durante todo el tratamiento para no sufrir una disminución de la actividad enzimática.
- La temperatura óptima para la actividad enzimática durante el tratamiento es de 25 °C.

2- Lavado

La duración del lavado varió entre 5 y 15 minutos. La capa pictórica de las cromatografías suelen ser inestables en lavados prolongados. Sin embargo, este corto tiempo de inmersión no afecta a la policromía de los cromos.

Se debe controlar visualmente la desintegración del adhesivo y de las manchas de los cromos hasta que se reduzcan casi por completo.

En capas gruesas de adhesivo es necesario repetir la operación hasta conseguir su disgregación.

3- Aclarado

Después del tratamiento es necesario eliminar los restos de cola y enzimas. Con un lavado de agua destilada se elimina el 99 % de las enzimas, y el 1 % restante se desnaturaliza irreversiblemente. De todos modos, un segundo lavado eliminaría prácticamente todas las enzimas y restos de cola restantes.

4- Secado

El cartoncillo sustentante de los cromos tenía un pH de 5.5 (ácido) y fue desacidificado como el resto de los cromos con carbonato cálcico.

Los soportes, una vez despegados y limpios, fueron alisados en una prensa mecánica y los cromos con una ligera presión entre secantes y tablas de madera.

5- Reconstrucción del conjunto

Las fotos de detalle, la cartografía y las huellas de las manchas de cola ayudaron a recomponer el estado original del conjunto tras de los cromos y cartoncillos.

El adhesivo empleado fue la metilcelulosa y PVA en una proporción de 100:5.

I.8.3.4 Textiles islamistas de la colección Bouvier ^[140]

En la colección Bouvier de Francia, poseían unos textiles que estaban pegados con cola animal sobre cartones, lo que acidificaba y fragilizaba los textiles. Además, por una parte algunos fragmentos de chales finos y frágiles, estaban rasgados y agujereados, y por otro parte, en algunas zonas se había colocado otro textil entre el textil islamista y el soporte de cartón.

- Tratamiento:

El tratamiento fue realizado localmente con colagenasas antes del lavado general:

En primer lugar se adecuó el lugar de trabajo y se preparó el material necesario:

-Se embebió dos papeles secantes con tampón fosfato (pH 7) y la enzima. Estos papeles se pegaron entre sí con unos puntos de cola. Se colocó un textil de seda artificial sobre el papel secante para separar este papel del tejido original durante el tratamiento. De esta manera no se adhieren fibras originales al papel secante. La solución enzimática debe permanecer constantemente a 37 °C.

Una vez preparado todo el sistema enzimático, se colocaron sobre los tejidos, los papeles secantes con el tejido separador sintético y, cada 10-15 minutos se dio la vuelta a los papeles hasta que las colas se disolvieron. Se pueden ir cambiando los

¹⁴⁰ RASTER, B., RINUY, A., « Elimination de "restaurations" antérieures sur des textiles islamiques de la collection Bouvier: analyse et traitement », *La conservation des textiles anciens: journées d'études de la SFIIC, Angers, 20-22 octobre 1994*, Ed. SFIIC, Champs-sur-Marne, 1994, pp. 277-282.

papeles para renovar las enzimas, mantener una temperatura constante y evitar la disminución de la actividad enzimática.

Posteriormente, se realizaron varios lavados. En primer lugar, un lavado local (en un medio tamponado) a una temperatura fría para eliminar la enzima y luego otro con agua desmineralizada templada. Después, se efectuó un lavado general con Tinovétine (detergente no iónico) al 0,05 % en agua desmineralizada y CMC (carboximetilcelulosa) al 0,005 %. Y por último, se lavaron los tejidos cuatro veces con agua desmineralizada.

I.8.3.5 Colagenasas en la restauración de esculturas policromadas de madera

En un artículo de OPD Restauro ^[141], Giorgio Garabelli describe cuatro ejemplos en los que aplica enzimas. Las intervenciones constaban casi siempre de dos fases. La primera era siempre de consolidación, ya que la policromía de las estatuas se encontraba siempre en mal estado. La segunda era la eliminación de repintes y estratos no deseados mediante enzimas.

En el primer ejemplo, la escultura tratada poseía dos policromías que fueron en un primer momento consolidadas con colágeno. El estrato de la superficie era un repinte con un aglutinante de cola animal y la capa pictórica original que se encontraba en muy mal estado, no contenía colágeno. Por este motivo, la enzima colagenasa actuó solamente sobre el repinte y el consolidante aplicado.

En la segunda escultura, estudios estratigráficos dejaron ver que existían tres estratos: uno original, un repinte y una capa de fijación formada por una cola proteica fibrosa. Para eliminar los dos estratos no deseados, se prepararon soluciones enzimáticas con:

- Un gel acuoso al 75 % para un tratamiento prolongado,
- Papetas de celulosa para una duración entre 60 y 150 minutos,

¹⁴¹ GARABELLI, G., “Unità di metodologia e applicazione di prodotti biologici nelle operazioni di restauro di sculture policrome”, *OPD restauro*, N. 10, 1998, pp. 112-120, 132-133

- Impacos de papel japonés (grano 17) para procesos rápidos.

Para poder suprimir homogéneamente los estratos, las concentraciones de la enzima dependían de cada zona ^[142].

En el tercer caso, existían una capa pictórica original y un repinte compuesto de cenizas, carbón vegetal y un aglutinante difícil de identificar. Esto provocaba que para la eliminación del estrato superficial era necesario la utilización de solventes muy agresivos. Por otro lado, la película pictórica original era a la caseína por lo que la colagenasa no le afectaba y por ese motivo, decidieron emplearla.

La primera fase del trabajo consistía en la impregnación de la superficie del repinte con cola de pescado (colágeno). En un primer momento se aplicó una concentración de enzima muy elevada (1,5 mg/10 cc de agua destilada), y la operación se repitió hasta la pérdida de la actividad enzimática. Esto venía motivado por la dificultad que existía para separar el estrato original del estrato con la cola de pescado superficial. Posteriormente, la concentración se redujo a 0,20 mg/10 cc para mantener constante la proporción de enzima/sustrato, y se aumentó la actividad enzimática elevando la temperatura a 37-41 °C.

En el último caso, utilizaron otra vez colagenasas sobre sustratos proteicos. Estas enzimas se aplicaron sobre la película pictórica y el dorado sin alterarlas, ya que la composición de silicatos de hierro y aluminio del bol inhibía la actividad enzimática. No obstante, la solución acuosa de la solución enzimática puede degradar el dorado si no se actúa con cautela.

¹⁴² Cada zona podía poseer un grosor diferente, presencia de inhibidores o cofactores, etc.

I.8.3.6 VERON® P (proteasas) en la restauración de una escultura de terracota policromada

Reiteramos que las enzimas pueden hidrolizar diferentes materiales. Es importante conocer la naturaleza del soporte de la obra de arte y los materiales que constituyen tanto la capa pictórica como los materiales que deseamos eliminar para no degradar lo que no deseamos durante un tratamiento enzimático.

La aplicación de geles enzimáticos soluciona algunos problemas como el exceso de humedad y hace factible el uso de enzimas en casos difíciles de tratar.

El lacado y cerámica no parecen ser soportes sensibles al agua. Sin embargo, existen obras como una escultura de terracota policromada que trató Roberto Bonomi^[143], la cual presentaba una gran pulverulencia entre la policromía, preparación y soporte y además, poseía una capa de suciedad de negro de humo, polvo, etc., que podía inhibir la solución enzimática.

El tratamiento consistió en un primer momento, en la consolidación de la policromía con cola animal mezclada con fungicida. Bonomi verificó la homogeneidad de la capa de consolidante con rayos ultravioletas. Posteriormente rebajó las escamas de la policromía, con una espátula termo-regulable (T^a 40 °-50 °C) y aplicó una solución enzimática de VERON® P (Scib)^[144] (con un pH 7 a una T^a de +/- 40 °C), durante un minuto. Después eliminó con tampones húmedos, el exceso de cola y suciedad (que contenían además enzimas) e inhibió las enzimas con tricloroetano^[145]. Por último, verificó la eliminación superficial de la cola mediante una lámpara de UV.

¹⁴³ BONOMI, R., "Utilizzo degli enzimi per il restauro di una scultura in terracotta policroma", *OPD restauro*, N. 6, 1994, pp. 101-107, 162.

¹⁴⁴ Desconocemos el tipo de enzima que es. No obstante suponemos que es una proteasa. Hemos encontrado por internet <http://www.abenzymes.com/index.php?section=202&page=2291> que los productos de VERON llevan proteasas, sin embargo en la VERON ® P no aparece qué tipo de enzimas es.

¹⁴⁵ El uso de este disolvente puede ser reemplazado por otras soluciones menos tóxicas como por ejemplo, el etanol en agua. Además, sabiendo qué tipo de enzima es, se puede buscar un inhibidor específico.

I.8.3.7 Proteasas en muebles

La proteasa en limpiezas de muebles sirve para la supresión de materiales proteicos como por ejemplo residuos de adhesivos en superficies pintadas.

Algunos estudios demuestran que el uso de colagenasas (proteasa) disminuye el tiempo de eliminación de colas fabricadas a partir de colágeno ^[146], consiguiendo suprimir completamente la cola, en sólo media hora. Este catalizador aumenta su actividad enzimática al aumentar el calor y humedad.

Por otro lado, en el artículo de TRIBOULOT y BOUCHER, recomiendan la aplicación de la enzima en un gel de metilcelulosa. Porque aunque resulte más lento que otros medios (como la mezcla de etanol y agua), se consigue controlar la humedad excesiva del soporte y una humidificación más localizada.

Los autores preparan el gel mezclando 2 g de metilcelulosa en 100 ml de agua, dejan reposar durante horas removiendo regularmente la metilcelulosa para no crear grumos en la solución viscosa. Y, una vez preparado el gel, se añade la enzima colagenasa (1 g/l) directamente en el gel.

I.8.4 Lipasas

Estas enzimas hidrolizan triglicéridos y se emplean sobre todo, en limpiezas de la capa pictórica para suprimir óleos secativos (barnices óleo-resinosos, repintes...) Las lipasas tienen como ventaja, la estabilidad en solventes orgánicos. Por lo tanto son una herramienta muy efectiva en la limpieza de pinturas. Además, algunas de ellas actúan como estererasas, siendo capaces de eliminar ceras y resinas sintéticas, como esterres acrílicos y vinílicos. No obstante, estas enzimas son inhibidas en algunos repintes oleosos que contienen pigmentos, como el ocre y tierra, azurita, malaquita, minio, etc. Éstos contienen metales pesados (Fe, Pb, Hg, Cu) que actúan como inhibidores en contacto con la enzima.

¹⁴⁶ TRIBOULOT, MC., BOUCHER, N., «Déplaquage par hydrolyse enzymatique des colles animales». *La problématique des techniques et des adhésifs de collage dans la conservation-restauration: journées d'études APROA - BRK, Bruxelles 21-22 novembre 2001*. Ed. Association professionnelle de conservateurs-restaurateurs d'oeuvres d'art (APROA), Bruselas, 2003, pp. 31-45.

Se recomienda evitar el uso de las lipasas directamente sobre el estrato del color de una pintura al óleo y en vidrios coloreados. El aglutinante del estrato puede ser degradado por la acción enzimática de las lipasas. Sin embargo, es posible su uso cuando la capa pictórica está barnizada. En los vidrios coloreados, la utilización de lipasas puede causar alteraciones del color, porque actúan sobre el aglutinante que suele estar compuesto por componentes proteínicos ^[147].

Por último, las lipasas se emplean en el mundo de la lavandería industrial para lavar tejidos, desengrasar el cuero, etc.

A continuación exponemos varios ejemplos encontrados en la bibliografía especializada sobre el empleo de lipasas en restauración de obras de arte.

I.8.4.1 Separación de una obra en papel pegada a otro papel

Otro ejemplo a tener en cuenta es el estudio realizado por Agnès Gaudu^[148]. En él describe cómo llegó a separar un papel pintado “*Du Champ de tir*” pegado a otro papel. Para ello creó copias sobre las cuales estudió cómo eliminar los puntos de pegamento constituidos por aceite y blanco de plomo. Después de varias pruebas, llegó a la conclusión de que la mejor manera de separar los dos papeles sin dañarlos era con la utilización sucesiva de una solución acuosa con 0,2 g de lipasas y 0,1 g de trizma. Y seguidamente, aplicó un gel con las mismas concentraciones de lipasas y de trizma durante 35 min. La solución y el gel enzimático debían tener un pH de 7,8 y una temperatura de 32 °C.

Para disminuir el tiempo de actuación de los triacilglicero acilhidrolasas (lipasas), se puede escoger una enzima que tenga una actividad mayor que la estudiada. Ya que estudios^[149] sobre la cinética de las enzimas demuestran que las *rhizopus*, *mucor*

¹⁴⁷ Información obtenida del artículo de Nieves Valentín et al. Analyses of deteriorated Spanish glass windows: cleaning methods using gel systems

¹⁴⁸ GAUDU, A., « Etude et conservation-restoration de trois esquisses peintes à l'huile sur papier imprégné ... », *Institut national du patrimoine. Mémoire de fin d'études*, Ed. INP-IFROA, Paris, 2002.

¹⁴⁹ NINI, L et al, “Lipase catalysed hydrolysis of short chain substrates in solution and emulsion: a kinetic study”, *Biochimica y Biofísica Acta*, nº1534, 2001 p.34-44 (www.bba-direct.com)

miehei y *humicola lanuginosa* tienen una actividad mayor sobre las largas cadenas de triacilglicerolos pero nunca han sido utilizadas en el mundo de la restauración.

I.8.4.2 Eliminación de películas acrílicas

Roberto Bellucci, Paolo Cremonesi y Ginebra Pignagnoli ^[150] utilizaron de forma experimental lipasas para hidrólizar los sustratos no grasos, de las películas acrílicas de Paraloid® B – 72 envejecidas.

El experimento consistió en preparar las lipasas provenientes de la *Candida cylindracea* (500 mg) disolviendo en 100 ml de gel preparado con agua desionizada (100 ml) y tamponado a un pH 8 con 265 mg de TRIS [tris(hidroximetil)aminometano] y 444 mg de la base TRIS [tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto] y 2 g de metilcelulosa calentada hasta los 39 °C al baño maría. La superficie de la capa pictórica se templó a 30 °C usando una lámpara de 40 W.

Las lipasas actúan sobre las uniones de ester-glicerol, degradando películas oleosas envejecidas. Esta utilización es menos tóxica y a menudo, una alternativa menos agresiva que los disolventes orgánicos polares y mezclas alcalinas.

I.8.4.3 Lipasa para el tratamiento de pinturas sobre tabla

Bellucci y Cremonesi dan otro ejemplo sobre limpiezas en el mismo artículo que antes ^[151]. La obra tratada es un temple sobre tabla del siglo XV, “*La Visitazione con San Giuseppe, San Zaccaria e quattro angeli*”, que había sufrido las vicisitudes históricas, la recomposición del siglo XVIII y la inundación de Florencia de 1966. Debido a todo esto, la imagen aparecía desfigurada, heterogénea, con pasmosos, repintes en varias zonas, atravesada por grietas de la madera y levantamientos del

¹⁵⁰ 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

¹⁵¹ BELLUCCI, R., CREMONESI, P., “L' uso degli enzimi nella conservazione e nel restauro dei dipinti”, Ed. *Kermes: arte e tecnica del restauro*, vol. 7, n. 21, Firenze, 1994, pp. 45-64.

color. Todo esto provocaba una visión del conjunto bastante alterada y los colores no mostraban ya su luminosidad, saturación y nitidez. Los análisis revelaban que la patina marrón contenía sustancias proteicas colorantes, ceras y resinas, resinas naturales y sintéticas, goma laca, Paraloid o Vinavil. Por lo tanto, en esta ocasión fueron empleadas lipasas en gel en varias aplicaciones, ya que la naturaleza compositiva del material a tratar, no permitía a la enzima conseguir un resultado satisfactorio.

Tanto en el primer caso con proteasas como en el segundo con lipasas, el gel fue eliminado con un hisopo seco y después húmedo. Por último se limpió la zona tratada con esencia de petróleo.

I.8.4.4 Geles de Wolbers para la limpieza de lienzo

Wolbers tiene diversos estudios realizados sobre las enzimas. En su libro *Cleaning painted surfaces* ^[152] expone varios ejemplos de tratamientos sobre lienzo. Uno de ellos, era la eliminación de una capa de óleo que se encontraba sobre una capa de resina natural.

Según Wolbers, la presencia de una capa seca de aceite encima de una antigua resina natural, revelaba la eliminación del aceite original de la pintura en algún momento de su pasado. Por lo tanto, se decidió eliminar el estrato de aceite añadido con posterioridad. La pintura fue consolidada con PVA AYAA, 20 % en tolueno. Para manipular el aceite de la superficie de la pintura sin preocuparse por el estrato de resina inferior, se creó un sistema enzimático/detergente. La fórmula para el gel de la lipasa que se utilizó es:

- 100 ml agua (desionizada)
- 0.66 g de Tris-HCl (Trizma pre-set tampón, pH 8.4)
- 1.6 g de Hidroxi propilmetil-celulosa (4000 cps)
- 0.1 ml de Triton X-100

¹⁵² WOLBERS, R., *Cleaning painted surfaces*, Ed. Archetype Publications Ltd, London, 2000.

- 1 g de lipasa (tipo sigma VII, *candida cylindracea*, 700-1500 unidades/mg 30 % de lactosa) en polvo seco liofilizado.

El gel de lipasa se aplicó sobre la superficie de la pintura, mediante una brocha de cerdas sintéticas (00). Después el aceite y el material que habían sido solubilizados se retiraron por medio de un disolvente. De esta manera, la zona tratada fue después aclarada con saliva sintética, secada con aire y aclarada con alcohol mineral.

I.8.4.5 Estudios contradictorios al gel de lipasa de Wolbers

Según el estudio realizado por Susannah Knox ^[153], la enzima lipasa utilizada en los geles de Wolbers no puede catalizar la reacción porque es completamente inhibida por el detergente Triton X-100. Además el alto pH de la mezcla ^[154] ralentiza también la actividad enzimática de la lipasa hasta tal punto que es inapreciable en el corto tiempo que se aplica sobre la pintura. Este estudio afirma que no es la acción enzimática la que limpia un barniz envejecido sino el efecto de otros factores.

No obstante, la utilización del detergente no-iónico Triton X-100, no inhibe todas las enzimas y desconocemos si inhibe completamente las lipasas. Estudios realizados por Piet Van Dalen ^[155] para separar unos dibujos de unas tablas pegados con almidón, prueban que la adición del Triton X-100 a una solución de amilasas Dex-Lo S con CaCl₂ (estabilizador de la enzima en soluciones acuosas) provoca un aumento de actividad enzimática, acelerando de esta manera el proceso de disolución del almidón.

¹⁵³ KNOX, S., "An assessment of catalytic activity in Wolber's lipase gel using an enzyme assay", *Conservation news*, n. 58, London, 1995, pp. 47-48.

¹⁵⁴ El pH de la mezcla es de 8. Este pH no ralentiza en exceso como afirma la autora del artículo.

¹⁵⁵ VAN DALEN, P; STOKMANS, J. "Research into the usefulness of enzyme treatments in separating prints from their backings".

Otros investigadores ^[156], pusieron en marcha un protocolo de investigación sobre la limpieza enzimática con lipasas. Fue realizado para averiguar si la utilización de lipasa realmente eliminaba estratos de óleo envejecidos, sobre un plato de cristal.

El gel con la enzima estaba compuesto por:

- 1- 300 mg de hidroximetilpropilcelulosa en 20 ml de agua.
- 2- Luego el gel se mezcló con 10 ml 0,1 M de tampón tris (ajustando el pH a 8,4 con HCl o a pH 7,7)
- 3- 0,02 ml de Triton X-100.

La concentración de la enzima lipasa VII (E.C. 3.1.1.3 de *Candida cylindracea*, Sigma L-1754) era de 10 mg/l (=8600 u/ml)

El resultado no fue satisfactorio y los autores afirmaron que la lipasa no eliminaba el óleo envejecido en las condiciones dadas y que realmente eran los componentes del tampón los que limpiaban.

I.8.4.6 La lipasa para la eliminación de sustratos en muebles

En los tratamientos de muebles, utilizan la lipasa sobre todo para eliminar películas oleosas, ester de grasas, aceites (lípidos). En teoría son capaces de romper las uniones de capas oleosas por hidrólisis, pero su actividad puede verse entorpecida o dificultada, por el limitado acceso a los enlaces ester en una capa de aceite mezclada con otros materiales. Además, la presencia de materiales sólidos, pigmentos o componentes de la resina dentro de la capa de aceite, puede inhibir la acción enzimática.

Los barnices de resina no se ven afectados por la enzima en los tratamientos de limpieza, pero pueden ser dañados si se utiliza una solución enzimática con pH excesivamente alcalino. La lipasa trabajará solo en la interfase entre la solución de limpieza y el sustrato, la cual es relativamente pequeña en el caso de superficies

¹⁵⁶ WESER, U., WUNDERLICH, C., "Removal of aged oil films by lipase: a placebo phenomenon", *Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung*, Zürich, 1996, pp. 147-152

decorativas. En muchos casos, la hidrólisis parcial de la proteína o lípido, es insuficiente para facilitar la retirada de un aceite no deseado o material proteico.

I.8.5 Reductasas y peroxidasas para la eliminación de las manchas de foxing.

Un estudio realizado por Patrick Choisy y Ariane de La Chapelle, demostró que era posible eliminar las manchas de foxing utilizando enzimas en un medio acuoso, con un pH controlado, y a temperatura ambiente sin emplear métodos químicos y conociendo las moléculas cromóforas presentes en la obra.

Para ello existen dos maneras diferentes de proceder.

En la primera se utilizan reductasas específicas de cada grupo cromóforo. El problema que existe para esta operación es el empleo de una cadena de enzimas, dependiente de la diversidad de los grupos cromóforos.

En el segundo método, se usan peroxidasas fúngicas que oxidan las moléculas aromáticas, conjugadas o poliaromáticas. La ventaja de esto, es que sólo se añade una enzima. Sin embargo este sistema no es tan específico como las enzimas en cadena.

La prueba realizada para el blanqueamiento de foxing con Manganese peroxidasas consistió en sumergir los papeles deseados en una solución de tampón tartrato pH 5,5, 50 nM, H₂O₂ 4 mM, MnSO₄, 4 mM con concentraciones variables de manganese peroxidasa.

Los resultados obtenidos fueron de un 33 % de blanqueo en 4 horas de inmersión. La actividad enzimática fue de 6 800 Unidades de actividad de manganese peroxidasa.

No obstante, existen varios inconvenientes como el pH de la solución que es ligeramente ácido y el tiempo de inmersión que es prolongado. A pesar de esto, el tratamiento es menos agresivo que los blanqueadores químicos.

De todos modos, aún queda mucho trabajo para garantizar la inocuidad de este proceso, a pesar de que ya a partir del año 1982, era conocido el empleo de enzimas para blanquear el papel, según aparece en un artículo ^[157] de ese mismo año.

I.8.6 Liozimas para desinfectar unas vidrieras españolas

Nieves Valentín, Andrés Sánchez e Isabel Herráez ^[158] publicaron la utilización de un gel enzimático para desinfectar y limpiar los cristales de unas vidrieras.

Para desinfectar las vidrieras de *Bacillus Subtilis*, fue aplicada una mezcla de liozimas al 0,1 % en un gel de agarosa con una concentración menor al 1,5 %. El gel enzimático se aplicó con una brocha y se mantuvo durante 24 horas.

El gel de agarosa con el biocida actúa por contacto y también por filtración. Este gel se elimina fácilmente una vez seco y además se puede recurrir a la enzima agarasa para eliminar los posibles restos del gel sobre el vidrio. En concentraciones de 1% de gel los residuos que se encuentran son insignificantes.

Para limpiar la suciedad de cristales no coloreados sin problemas físicos ni estructurales, se utilizó metilcelulosa (2 %) / lipasa (0,1 %), y agarosa (1 %) / lipasa (0,1 %) durante cuatro horas. La eliminación de los residuos de la limpieza consistió en el uso de un hisopo húmedo con agua destilada y un posterior secado.

¹⁵⁷ KEYES, KEIKO, MIZUSHIMA, “Alternatives to conventional methods of reducing discoloration in works of art on paper”, *Postprints from the AIC tenth annual meeting, Milwaukee, Wisconsin, 26-30 May, 1982*, Ed. American Institute for Conservation, Washington, 1984, pp. 100-104.

¹⁵⁸ VALENTÍN, 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.

II Práctica con enzimas

El uso de enzimas en restauración no es un sistema muy empleado debido al desconocimiento de su empleo y acción. Muchos de los restauradores piensan que las enzimas son incontrolables, difíciles de manejar y desconocen el alcance de su actividad. Por este motivo prefieren usar disolventes que son perjudiciales para su salud. No obstante, la acción y penetración de un disolvente en una capa pictórica no son muy controladas y se desconoce si con los años pueden ser perjudiciales para la obra y para el restaurador.

En esta tesis, se intenta estudiar una alternativa más inocua que el uso de disolventes, con el empleo de enzimas. Por lo tanto, después de documentarse profundamente con todas las publicaciones más destacadas de la actualidad. Se decidió realizar prácticas con las que hasta ahora se vienen aplicando.

Esta práctica intenta reproducir la aplicación de enzimas en cualquier taller de restauración que no posee los métodos científicos o máquinas especiales para conocer el tipo de las enzimas que han comprado, las características de su uso - temperatura, pH de la solución, cofactores necesarios para la correcta actividad enzimática, etc.- De esta manera se recrea cómo solucionar algunas dudas relativas a las enzimas y saber descartar a tiempo estas proteínas antes de aplicarlas sobre una obra de arte real.

Para esta práctica se compró amilasas, lipasas y las enzimas denominadas comercialmente, mix de enzimas. Todas ellas venían con una solución soportante específica para cada enzima y una solución de lavado general de enzimas.

La solución soportante es un gel, posiblemente metil-celulosa y viene con una película aislante de parafina que impide el ataque bacteriano. No obstante, se observa unas manchas más oscuras de dudosa naturaleza.

Por otra parte, no sabemos si las amilasas poseen los cofactores ^[159] necesarios para su correcta actividad enzimática; esto se comprobará con su aplicación sobre materiales amiláceos.

Las soluciones son el mismo líquido para todas las enzimas y posiblemente contenga algún tipo de sustancia que desnaturaliza las enzimas.

Una vez mezclada la enzima con el gel, tiene una duración aproximada de 15 días si se conserva a una temperatura de entre 4 °C y 20 °C.

Entre las sustancias que pueden ser hidrolizadas por cada enzima:

- Las lipasas eliminan sustancias grasas como las ceras, resinas sintéticas como esterres acrílicos y vinílicos y, aceites secativos.

- Las amilasas hidrolizan sustancias amiláceas como las colas de almidón, colas de pasta, gomas vegetales, harinas y almidones.

- Y por último, el mix de enzimas es apto para la supresión de sustancias proteicas como las caseínas, colas y gelatinas animales, albúminas y huevo. Con esta última descripción imaginamos que existen proteasas, no obstante, al no especificarlo debemos realizar diferentes pruebas sobre diversos materiales para deducir la composición de este mix de enzimas. Por este motivo, descartamos su uso. Si deseásemos eliminar estratos proteicos, es mejor comprar proteasas.

II.1 Metodología de la prueba

La metodología que se llevará a cabo en esta prueba es, en primer lugar la preparación de las muestras con diferentes técnicas pictóricas y diferentes manchas y, posteriormente se envejecerán aceleradamente en una máquina especial para tal fin. Por último, se aplicarán las enzimas y se observará las diferentes reacciones.

Con esta prueba, se busca la práctica del empleo de diferentes tipos de enzimas comerciales y conocer el poder hidrolítico de las enzimas comerciales y si el preparado que se vende para su empleo es el adecuado.

¹⁵⁹ Las α -amilasas son enzimas que necesitan los cofactores de Ca^{2+} para su correcta actividad enzimática. Estos cofactores ayudan a mantener la estructura terciaria o a estabilizar la estructura cuaternaria de la proteína.

II.1.1 Preparación de las muestras

En primer lugar, se prepararon unos papeles de la marca Arches, fabricados con fibras 100 % algodón, de grano fino y con un gramaje de 300 g/m², con tres técnicas pictóricas diferentes, que son unas de las más empleadas por los artistas sobre soportes de papel:

- Acuarela
- Témpera
- Acrílico.

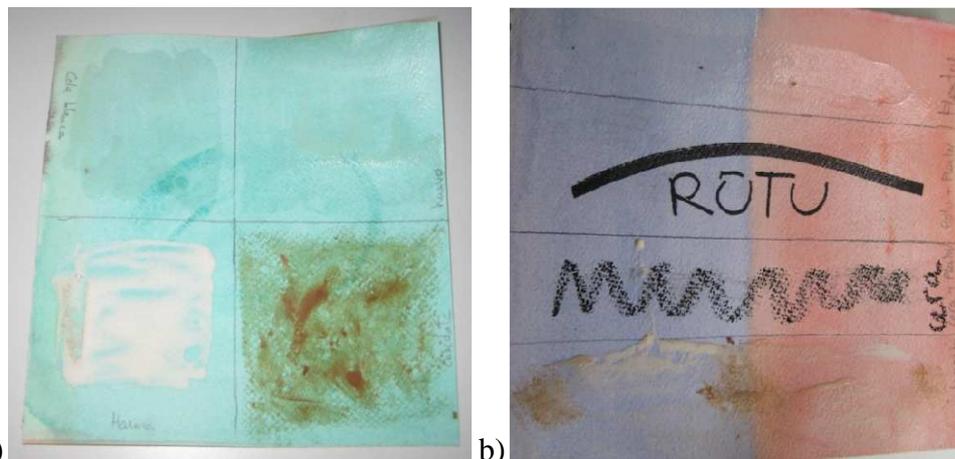
Sobre estas muestras y sobre otros papeles que no tenían pintura, se aplicaron diferentes materiales para mancharlas. Se utilizó chocolate (chocolate con leche de la marca Lind), cera acuarelable negra (de la marca Acualux), un rotulador permanente negro (permanent marker de la marca edding ® 500), cola blanca, Plextol® B500, cola de harina, huevo, un bolígrafo negro, un lápiz HB y, realizamos mezclas de diferentes materiales como huevo, harina y chocolate a la vez, o pintar con el bolígrafo y por encima huevo [figuras 16, 17, 18 y 19].

Posteriormente se envejecieron las muestras con las manchas durante una semana (165 horas) en la máquina de fotodegradación SOL 2 dr. Hönle de Metrotec ^[160], que se encuentra en el laboratorio de restauración de la Facultad de Bellas Artes de Leioa.



Figura 16. Papeles blancos manchados con a) chocolate, engrudo de harina, huevo y cola blanca, b) chocolate más huevo más harina y cola de conejo, c) cera, rotulador, plextol B500 y bolígrafo.

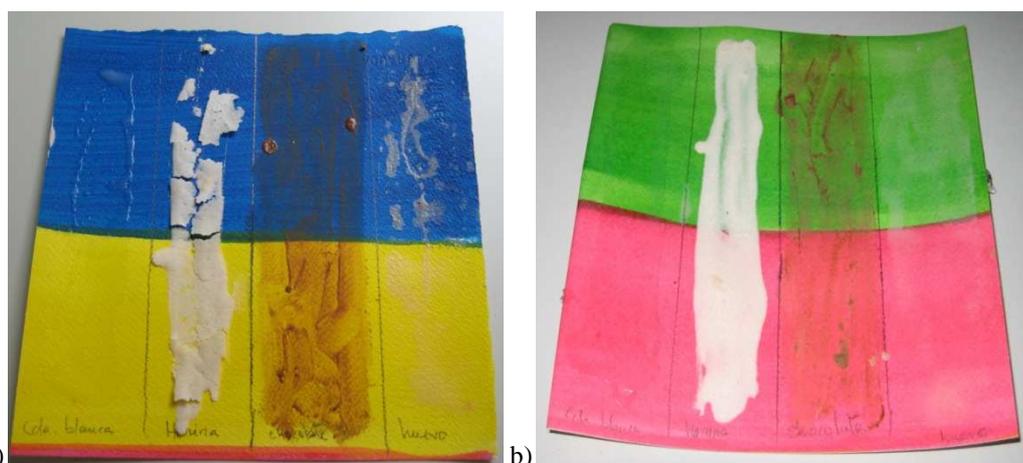
¹⁶⁰ Todos los datos referentes a esta máquina, vienen especificados en el capítulo de Materiales y Métodos .



a) b)
Figura 17. Acuarela manchada con a) cola blanca, huevo, harina y chocolate, y b) plectol B500, rotulador, cera y chocolate con harina



a) b) c)
Figura 18. Tempera ensuciada con harina, cola blanca, huevo, lápiz, plectol B500, rotulador, chocolate y bolígrafo más huevo, b) chocolate, cera, plectol, cola blanca, harina, lápiz, rotulador, bolígrafo y huevo más chocolate, c) harina, cola blanca y huevo.



a) b)
Figura 19. Acrílico con a) cola blanca, harina, chocolate y huevo, b) cola blanca, harina, chocolate y huevo.

II.1.2 Aplicación de enzimas

En primer lugar, se deja durante media hora que los productos cojan temperatura ambiente y posteriormente mezclamos las enzimas con los geles correspondientes [figura 20 y 21]. Se deben mezclar con suavidad para no desnaturalizarlas y evitar que las enzimas pierdan su actividad enzimática.

El documento adjunto de cada enzima, indica que no hace falta calentar la superficie de la obra pictórica. No obstante, se debe recordar que cada enzima tiene una temperatura óptima de actuación y que calentar ligeramente la superficie pictórica, mejorará la actividad enzimática porque se acerca más a su temperatura óptima de actuación. Para tal efecto, se utilizará una mesa de luz que calienta un poco el papel y el bote donde hemos dispuesto las mezclas enzimáticas. Existe también la posibilidad de calentar una película pictórica con una lámpara incandescente a una distancia de seguridad.

Para esta práctica sólo utilizamos un cuarto de la cantidad de cada producto.



Figura 20. Soluciones soportantes y enzimas.



Figura 21. Mezcla de la solución soportante con las enzimas

Una vez realizada la mezclanza, aplicamos sobre cada mancha un tipo diferente de enzima con un pincel suave o con un hisopo. La elección de cada enzima depende del tipo de sustancia que deseábamos eliminar y del soporte de la obra. Este es un factor importante a la hora de elegir un tipo de enzima si no deseamos dañar la capa pictórica.

El tiempo de aplicación varía entre 1 y 10 minutos. Siempre debemos experimentar los tiempos de aplicación antes de impregnar toda la superficie con la solución enzimática.

II.1.3 Elección de cada enzima

Los criterios para seleccionar una enzima vienen regulados en primer lugar, por la naturaleza del material que deseamos eliminar (almidón, proteínas, materia grasa) y en segundo lugar, por la naturaleza de los materiales que constituyen la obra (para no alterarlos). Estos dos factores determinan la clase de enzima (amilasa, proteasa, esterasa o lipasa) que debemos escoger. Luego, para determinar el tipo específico de la enzima necesaria, tenemos que tener en cuenta las condiciones de trabajo de ésta (pH, temperatura, tiempo y modalidad de aplicación) que deben ser compatibles con las características de la obra. Por último, el coste de cada proteína determinará definitivamente su elección.

En esta práctica, conocíamos la naturaleza de las manchas y las técnicas pictóricas empleadas.

La elección de cada enzima dependerá como hemos mencionado con anterioridad, del sustrato a eliminar. Por ejemplo, las lipasas, que hidrolizan grasas y resinas sintéticas, servirán para eliminar las manchas de chocolate, cera, cola blanca y la mezcla de chocolate y huevo; las amilasas que hidrolizan el almidón, serán depositadas sobre la pasta de harina y la mezcla de chocolate con huevo y harina; y el mix de enzimas lo extenderemos sobre muchos tipos de manchas, para conocer el alcance de su poder de limpieza. Las dispondremos sobre el huevo, chocolate, Plectol® B500, cola blanca, rotulador permanente, bolígrafo con huevo, chocolate con huevo, chocolate con huevo y con engrudo de harina. Desconocemos el tipo de enzimas presentes en el mix de enzimas. No obstante, creemos que en esta mezcla existen proteasas, lipasas y quizá restos de otras enzimas.

Suponemos que en algunas manchas compuestas por diferentes materiales será necesaria la aplicación de diferentes enzimas, unas después de otras.

La selección de una enzima viene condicionada por la técnica pictórica y por el soporte artístico de una obra. Sabemos que existe el riesgo de dañar la pintura de las técnicas pictóricas sensibles al agua (el guache y la acuarela) al aplicar sobre ellas geles de base acuosa. A parte, las amilasas pueden afectar a la goma arábiga cuando deseemos eliminar el engrudo de harina, puesto que estas enzimas hidrolizan gomas vegetales. Además, desconocemos la composición exacta del mix de enzimas, y por tanto, no sabemos si esta mezcla de enzimas puede afectar a la goma arábiga de la acuarela y del guache ^[161] o a la resina sintética ^[162] de las pinturas acrílicas, en el caso de que el mix enzimático posea amilasas y lipasas. Las lipasas suelen ser empleadas para eliminar resinas sintéticas como esterres acrílicos y vinílicos, por lo que debemos tener sumo cuidado en no dejar demasiado tiempo las lipasas o el mix de enzimas sobre la superficie de las pinturas acrílicas para no ser afectadas.

A pesar de todo esto, queremos observar qué le sucede a la capa pictórica en contacto con los geles enzimáticos comprados.

¹⁶¹ MALTESE, C., *Las técnicas artísticas*, Ed. Manuales arte Cátedra, 12ª edición, Madrid, 2003, pp. 317-322. La acuarela está compuesta por goma arábiga (goma vegetal, resina de acacia) y el guache es un temple de goma arábiga y una carga.

¹⁶² HAYES, C., *Guía completa de pintura y dibujo. Técnicas y Materiales*, Ed. H. Blume, Madrid, 1980, p. 68. La pintura acrílica está compuesta por pigmentos contenidos en una resina sintética.

II.2 Resultados

Los resultados de las aplicaciones enzimáticas sobre los papeles preparados serán divididos por tipos de manchas y la limpieza de cada mancha, sobre los diferentes soportes y capas pictóricas.

II.2.1 Manchas de chocolate

A continuación vamos a exponer los resultados obtenidos para eliminar las manchas de chocolate sobre los papeles anteriormente descritos. Para ello se emplearan en primer lugar lipasas y se comparará su eficacia, con el producto de mix enzimas.

II.2.1.1 Limpieza de chocolate sobre un papel blanco

Se comienza por analizar el tipo de mancha para escoger la enzima correcta. En este caso, al no tener técnica pictórica se debe analizar el posible daño de las fibras del papel.

Se averiguó que el chocolate no está compuesto solamente por grasas. Por este motivo se aplicó en un primer momento las lipasas, y luego se comparó su eficacia con el mix enzimas que seguramente pueda eliminar otras sustancias ^[163] [Figura 22]. Por otra parte, al desconocer la composición exacta del mix enzimas, se debía tener cuidado a la hora de aplicarlo. Esta mezcla puede llevar celulasas en su composición y dañar las fibras celulósicas.

¹⁶³ La composición del chocolate es amplia. En las páginas de internet <http://www.botanical-online.com/chocolate.htm>, <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp48.htm>... nos dan una amplia descripción de las sustancias presentes en el chocolate. Su composición es cacao, leche, azúcar, emulsionantes o fraccionadores de grasa (lecitina, monoesterato de sorbitan...), reguladores de la acidez (carbonato cálcico, carbonato potásico, ácido cítrico...), estabilizantes: (carregina, goma de algarrobo, celulosa, etc.), aromatizantes (vainilla), espesantes (harina de maíz, harina de trigo, de algarrobo, de arroz, etc.), antiglutinantes (talco, silicato cálcico, etc.), edulcorantes (manitol, sorbitol, aspartano, sacarina, etc.), etc.



Figura 22. Papel en blanco con mancha de chocolate a) sin limpiar, b) con limpiezas de lipasas, lipasas y mix enzimas y sólo con el mix enzimas.

Se observó que la limpieza es efectiva tanto para las lipasas como para el mix enzimas. Se puede ver claramente que la mezcla de los preparados enzimáticos deja más limpio el papel. Su combinación hidroliza más componentes presentes en el chocolate y no daña las fibras de celulosa a simple vista.

II.2.1.2 Chocolate sobre acrílico

1. Acrílico rosa y verde

En este caso, aplicamos sólo el gel enzimático de lipasas. Debíamos comprobar si la película pictórica acrílica podía ser dañada por las lipasas, ya que éstas hidrolizan esterres acrílicos. La limpieza de chocolate mediante enzimas se realizó varias veces hasta conseguir la limpieza deseada [Figura 23].



Figura 23. Acrílico a) de color rosa manchado de chocolate b) limpiado con lipasas, c) de color verde manchado de chocolate, d) durante la limpieza con lipasas y e) después del tratamiento.

La limpieza con lipasas sobre el acrílico es efectiva y no queda rastro de chocolate a simple vista. No obstante, necesitaríamos un microscopio óptico para ver el alcance de la limpieza, saber si quedan restos en los intersticios de las fibras y si las lipasas han afectado a la pintura acrílica.

2. Acrílico azul y amarillo

Para la muestra en azul sólo se emplearon lipasas para eliminar el chocolate [Figuras 9]. Se comprobó con la muestra anterior que el empleo de lipasas es suficiente para la supresión de la mancha. No se creyó necesario añadir el mix de enzimas. Esto puede acarrear la introducción de otro tipo de enzimas que puedan dañar la superficie pictórica.

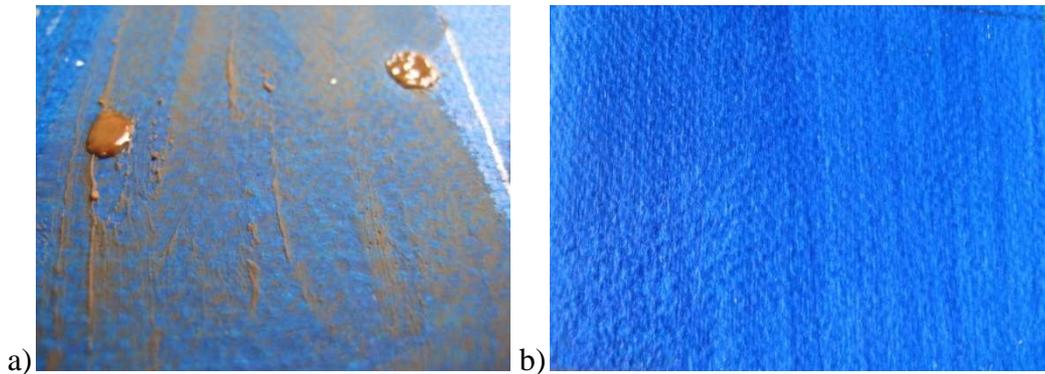


Figura 24. Detalle de una pintura acrílica azul a) antes de la limpieza con lipasas y b) después de la limpieza.

La limpieza es evidente. No se necesitaba limpiar con el mix enzimas. No obstante, cabía la posibilidad que el mix enzimas tuviera lipasas en su composición.

3. Acrílico amarillo

La próxima limpieza será realizada sólo con el mix enzimas. Se comprobará su eficacia y si la capa pictórica acrílica queda dañada [Figura 25 a].

Aparentemente, el mix enzimas limpia y no daña la capa pictórica [Figura 25 b, c y d]. Sin embargo, preferimos en el caso de la pintura acrílica, el empleo de lipasas. De esta manera sabemos exactamente el tipo de enzimas que estamos introduciendo.

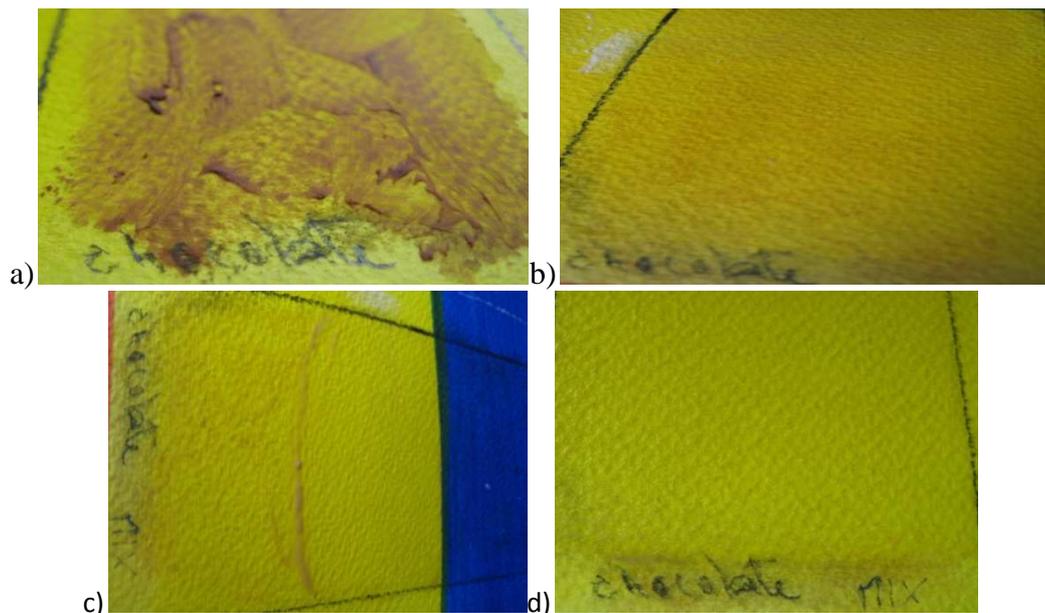


Figura 25. Acrílico amarillo a) con mancha de chocolate, b) con una primera limpieza con el mix de enzimas, c) con la diferencia entre una segunda limpieza con el mix de enzimas y otra parte sin limpiar y, d) con el resultado final sin limpiar sobre la palabra chocolate.

II.2.1.3 Chocolate sobre acuarela verde

En esta ocasión se comparó el efecto de las lipasas con las del mix enzimas sobre una acuarela. Debíamos averiguar cuál de estas enzimas limpiaba mejor y no degradaba la superficie de la capa pictórica. El efecto limpiador fue el siguiente [Figura 26].

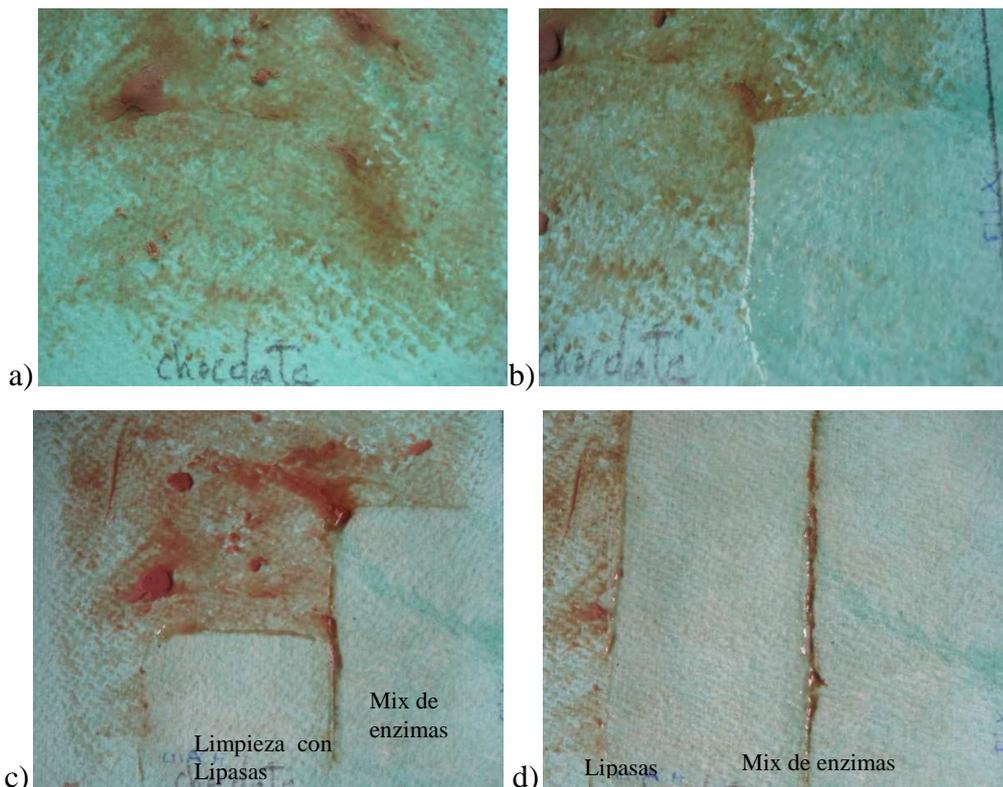


Figura 26. Acuarela verde a) antes del tratamiento, b) durante la limpieza con el mix enzimas, c) con la limpieza con lipasas y el mix de enzimas y, d) después de la limpieza enzimática.

La limpieza resulta efectiva tanto para la hidrólisis con lipasas como con el mix de enzimas. No obstante, el área limpiada por las lipasas está más oscura que el del mix de enzimas. Sin embargo, con el mix de enzimas se observó que en algún punto, la acuarela se había diluido al eliminar el chocolate, mientras que con las lipasas esto no sucede.

Cabe la posibilidad que la zona de las lipasas esté más oscura porque la cantidad de chocolate a eliminar era muy superior a la parte del mix enzimas.

II.2.1.4 Chocolate en guache negro y azul

1. Chocolate sobre guache negro

Volvimos a comparar la eficacia de las enzimas. Por un lado aplicamos el gel con el mix enzimas y por otro las lipasas [Figura 27].

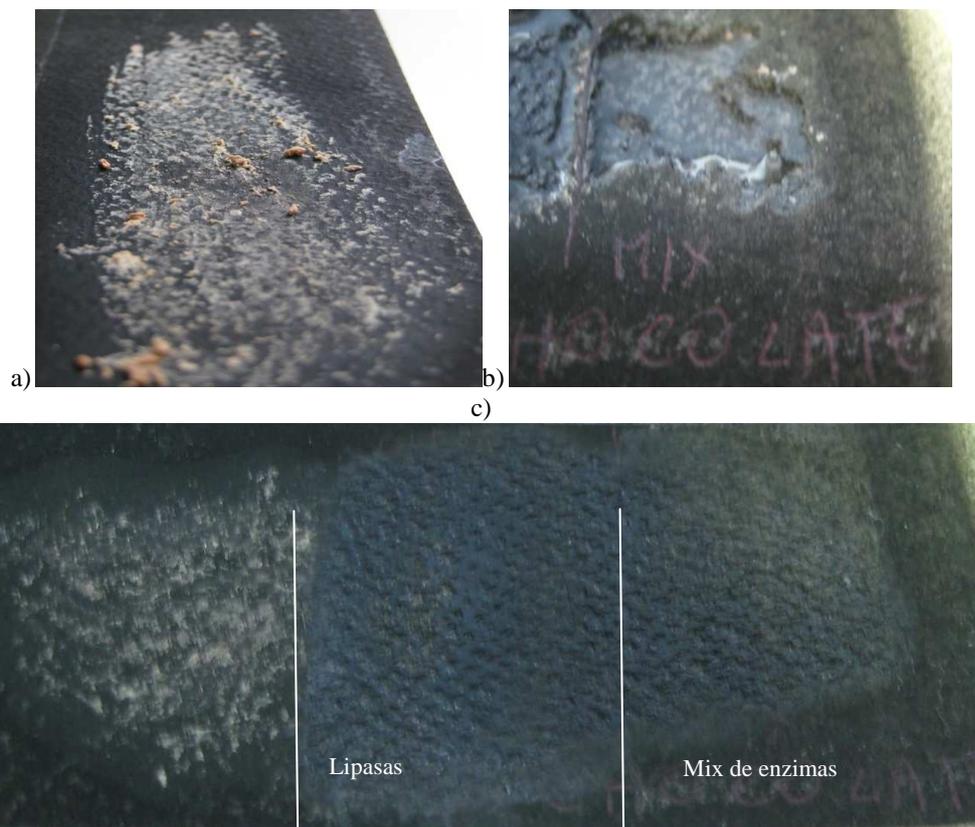


Figura 27. Tempera negra con a) mancha de chocolate antes de la limpieza, b) aplicación del gel con enzimas (mix enzimas) y c) dos tipos de limpiezas con lipasas y el mix de enzimas.

En esta ocasión, el resultado fue diferente que con la acuarela. La superficie pictórica se vuelve brillante con la aplicación de los geles y la zona limpiada por las lipasas se ve más afectada que con el mix. Seguramente esto sea debido a la insistencia de la limpieza. Por este motivo es mejor realizar la limpieza bajo un microscopio y saber hasta dónde debes actuar y no sobrepasar los límites para no degradar la superficie pictórica.

2. Chocolate sobre guache azul

Esta vez añadimos una mezcla de lipasas con mix enzimas, a parte de la comparación que llevamos a lo largo de esta práctica.

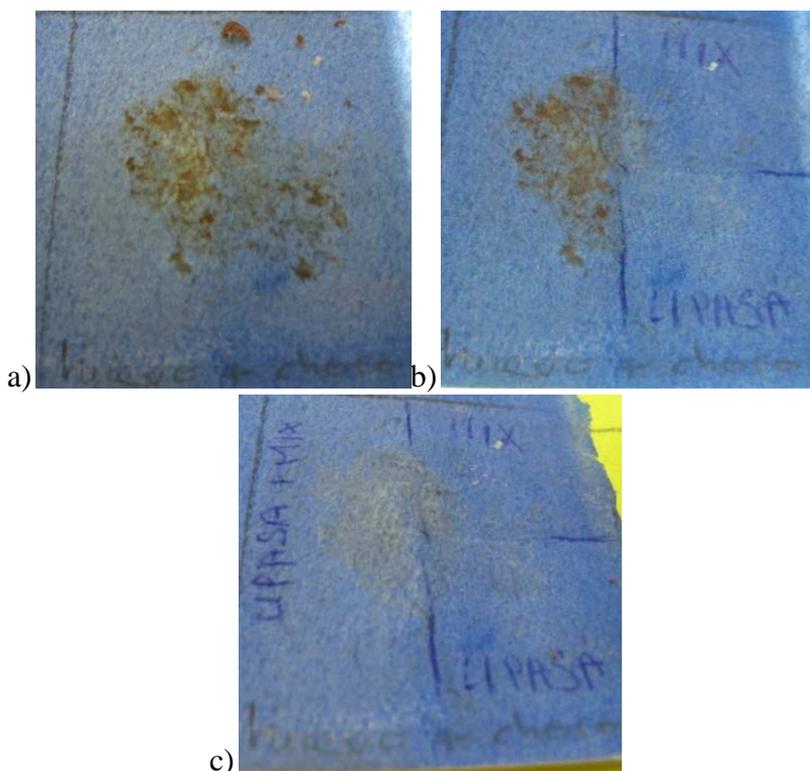


Figura 28. Témpera azul con chocolate y huevo a) sin limpiar b) limpiada con lipasas y mix enzimas y c) tratada con mezcla de lipasa y mix a la izquierda de la imagen.

Se observa que la limpieza menos perjudicial para la capa pictórica es la de las lipasas. Tanto la limpieza con el mix enzimas, como con la mezcla de lipasas con el mix, elimina parte de la estrato de guache. Esta vez, empleamos un escalpelo para eliminar el chocolate y un hisopo para arrastrar la suciedad.

II.2.2 Engrudo de harina

La eliminación de engrudos de harina, suele convertirse en una ardua tarea dependiendo de la época de fabricación y de su composición.

Para esta prueba se tuvo que envejecer papel con manchas de harina que conseguimos mezclando agua con harina y se envejeció con rayos ultravioleta en la cámara SOL2.

Evidentemente la dificultad de eliminación de estos engrudos, no es la misma que los que tienen más de un siglo. No obstante, el principio de eliminación con las enzimas amilasas es el mismo.

Se vuelve a reiterar que las amilasas necesitan iones de calcio para su correcta actividad enzimática. Sin embargo, se desconoce si en la fabricación del gel han sido introducidos. Teóricamente, los geles vienen listos para ser empleados con todos los compuestos para su correcta función hidrolítica.

El gel de amilasas será depositado delicadamente encima del sustrato de engrudo de harina que se quiere eliminar. Pasado unos dos minutos, se comprobará si la pasta se elimina con facilidad, sino, se deja actuar las amilasas hasta 10 minutos, observando cada minuto la evolución del tratamiento. Su supresión será efectuada con hisopos secos para eliminar el gel con el engrudo. Una vez finalizada la limpieza, se aplicará la solución inhibidora de enzimas.

II.2.2.1 Limpieza de la harina en papel blanco

Sobre el papel blanco depositamos un sustrato irregular de pasta de harina [Figura 29 a)]. En el momento de su eliminación, debemos tener cuidado con las fibras de algodón del papel porque después de un contacto prolongado con el gel, su resistencia es menor.

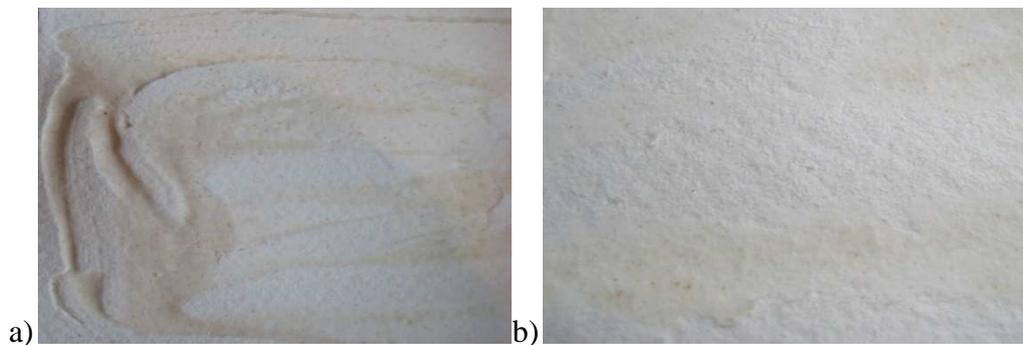


Figura 29. Papel blanco a) con engrudo de harina b) detalle del papel después de la limpieza con amilasas

La eliminación de la pasta de harina no pudo ser completa. Se dejó una pequeña película porque no se poseía un microscopio para ver hasta donde se debía actuar sin dañar el papel [Figura 29 b].

II.2.2.2 Engrudo de harina sobre acrílico azul y amarillo

Se aplicó un estrato de engrudo de harina sobre la película pictórica acrílica de color azul y amarillo. La harina una vez seca y envejecida de la forma anteriormente dicha, se desprende con facilidad con instrumentos mecánicos. Sin embargo, permanecen restos difíciles de eliminar y que pueden dañar la capa pictórica [figura 30 a y b, 31 a]. Por este motivo aplicamos sobre los restos de harina, el gel enzimático de amilasas. La eliminación del engrudo de harina sobre el acrílico azul y amarillo fue efectuada de la misma manera que para el papel en blanco.

Su supresión fue completa y las enzimas no parecen dañar la película acrílica [Figura 30 c y 31 b].

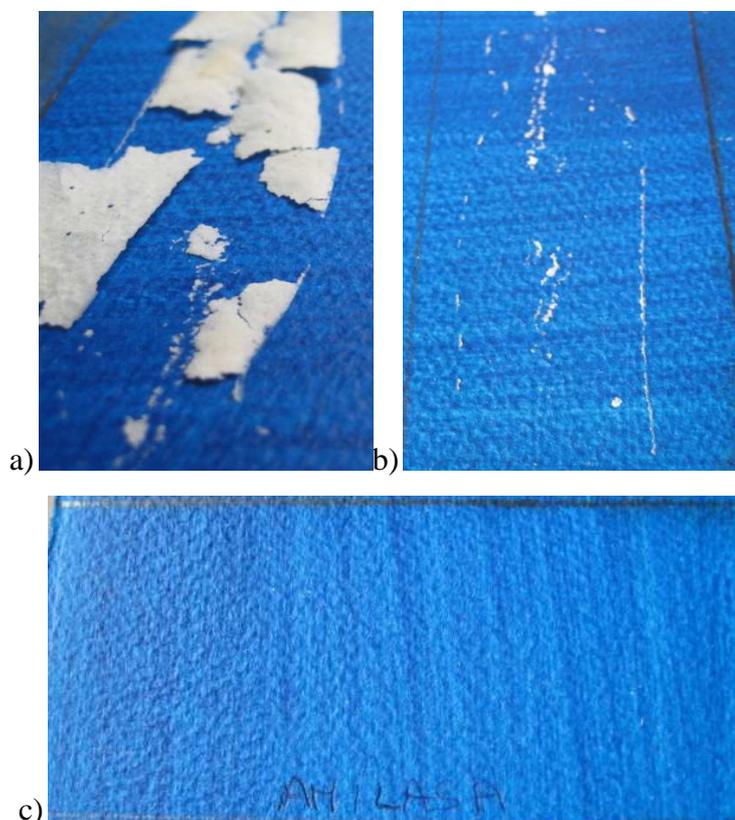


Figura 30. Acrílico azul a) con harina, b) durante el tratamiento con amilasas y c) después de la limpieza



Figura 31. Acrílico amarillo a) con harina b) después del tratamiento con amilasas.

II.2.2.3 Harina sobre acuarela verde

La pasta de harina queda muy adherida a la superficie del papel con acuarela [Figura 32 a]. Su eliminación es complicada. El gel se aplica directamente sobre la pasta de harina y no sobre la superficie pictórica que es sensible a los geles acuosos y a las amilasas. Se sabe que no se debe emplear las amilasas con técnicas pictóricas que contengan gomas vegetales como la goma arábiga. Sin embargo, se quería saber hasta qué punto estas enzimas degradan esta técnica.

Una vez eliminado el estrato más grueso, se debe actuar con sumo cuidado para no llevarse el pigmento [Figura 32 b]. Se recomienda el uso de microscopio y observar hasta dónde actuamos con la limpieza.

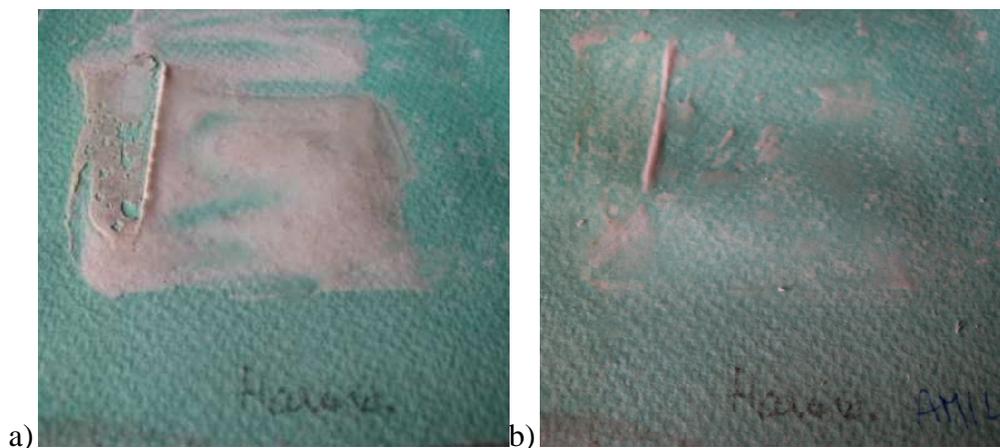


Figura 32. Acuarela a) con harina b) durante la limpieza con amilasas

II.2.2.4 Engrudo sobre guache negro

La pasta de harina también queda muy adherida sobre la película pictórica del guache [Figura 33 a]. Su eliminación se ve dificultada por la sensibilidad de la técnica al gel acuoso y a las enzimas. Sin microscopio, ni un aumento del papel con una lupa, la limpieza provoca pérdida en la capa pictórica por su disolución y eliminación al retirar los restos de harina [Figura 33 c].

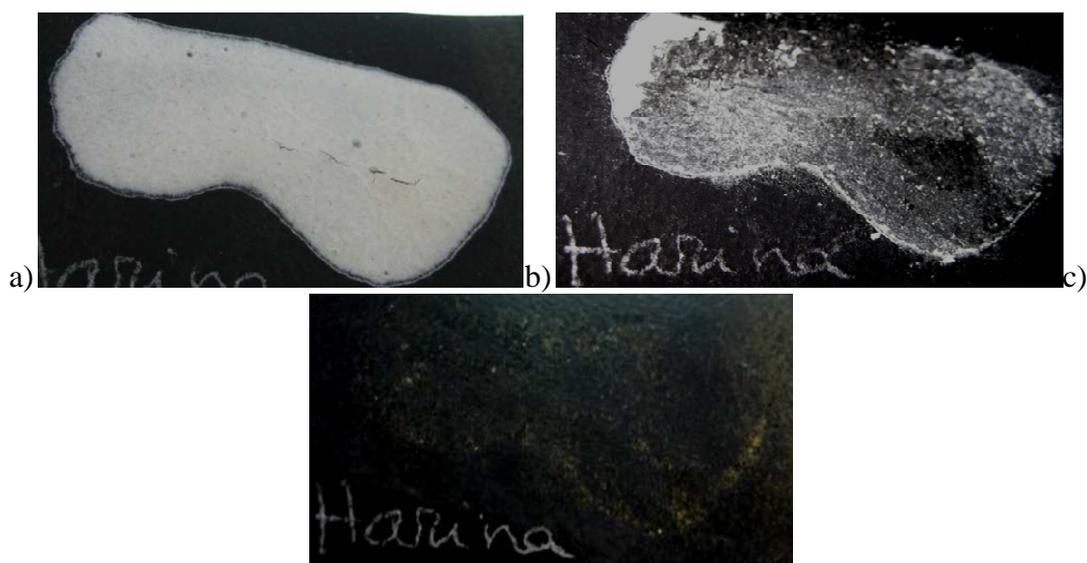


Figura 33. Tempera negra a) con harina, b) durante el tratamiento con amilasas y c) después del tratamiento

II.2.3 Manchas de huevo

El huevo está constituido por proteínas (en la clara) y lípidos (en la yema). Su eliminación suele ser muy difícil, al permanecer fuertemente adherido a cualquier superficie (ya sea porosa o no).

Para la limpieza de huevo sobre los papeles, se aplica el mix de enzimas que se supone tendrán proteasas o peptidasas para hidrolizar los péptidos de las proteínas del huevo y lipasas para eliminar lípidos. En el documento adjunto al producto de las mix enzimas pone que esta mezcla enzimática elimina sustancias proteicas como albúminas y huevo.

II.2.3.1 Limpieza de huevo en un papel blanco

En la siguiente muestra, se manchó su superficie con huevo, chocolate y harina [Figura 34 a y b].

De esta manera comprobábamos la eficacia del mix enzimas con estas tres sustancias mezcladas a la vez.

El resultado es muy satisfactorio. Las manchas han sido eliminadas y el papel no ha sido dañado pero sí ligeramente teñido por el chocolate [Figura 34 c].

Se cree que en este caso (el papel sin película pictórica), sería necesario experimentar con lavados de enzimas para que penetren con más profundidad en los intersticios de las fibras y aumentar de esta manera su campo de actuación.

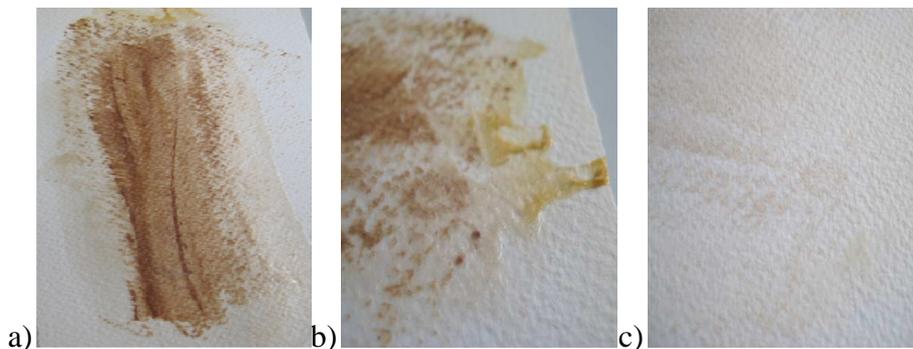


Figura 34. Papel blanco a) con mancha de huevo, chocolate y harina b) detalle de la mancha y c) después del tratamiento con el mix enzimas.

II.2.3.2 Huevo sobre acrílico amarillo y azul

El huevo se adhiere muy bien sobre las películas acrílicas por lo que su eliminación por medio de métodos mecánicos es muy arriesgada; la pintura podría quedar dañada [Figura 35 a y 36 a]. Por este motivo se recurrió a la aplicación del mix enzimas.

Después de la aplicación enzimática, se puede retirar mediante pinceles e hisopos, los restos de huevo, quedando la superficie de la pintura completamente limpia y libre de cualquier mancha [Figura 35 b y 36 b].

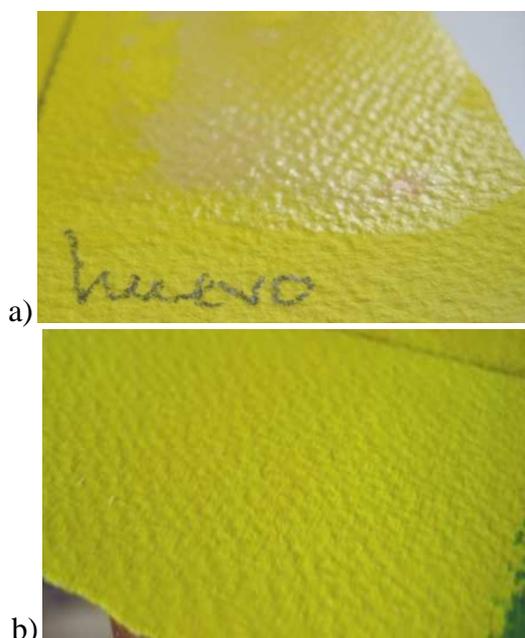


Figura 35. Acrílico amarillo a) con huevo seco b) después de la limpieza con el mix enzimas.

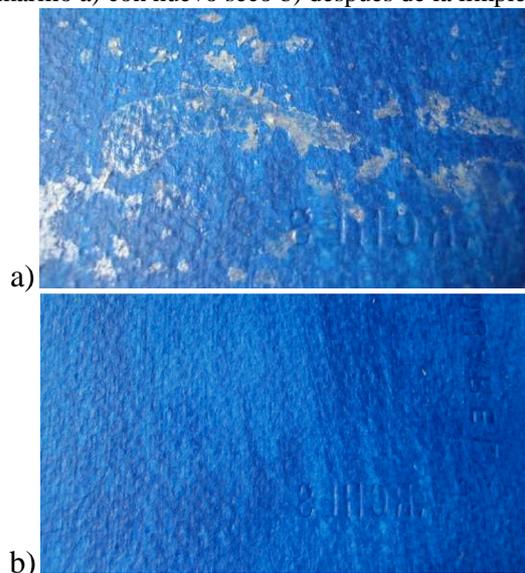


Figura 36. Acrílico azul a) con huevo seco b) después de la limpieza con el mix enzimas.

II.2.3.3 Huevo sobre guache negro y amarillo.

Tanto el guache como la acuarela son sensibles a los métodos acuosos de limpieza. El tratamiento con el gel enzimático puede eliminar parte de la policromía de una pintura si no se protege y/o no se limita la zona a tratar. Los ejemplos siguientes muestran la eliminación de manchas de huevo [Figura 37 a y 38 a]. En el guache negro se decidió parar la limpieza para evitar la pérdida de policromía [Figura 37 b]. En el guache amarillo se pudo eliminar prácticamente todo el huevo sin dañar la película pictórica [Figura 38 b].



Figura 37. Guache negro a) con mancha de huevo y b) durante el tratamiento enzimático.

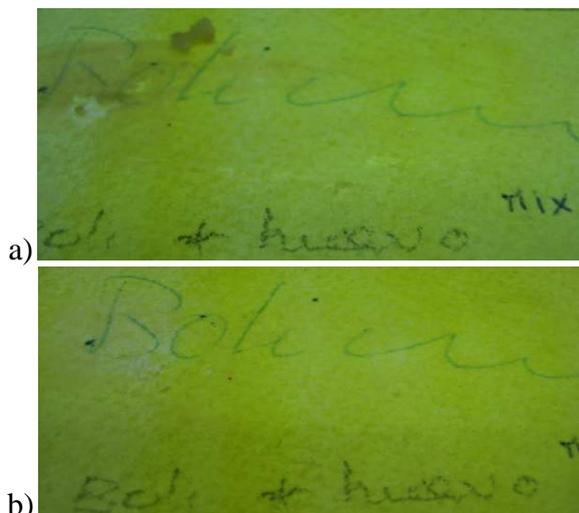


Figura 38. Témpera amarilla a) con bolígrafo y huevo por encima b) después de la limpieza con el mix enzimas.

II.2.4 Eliminación de cola blanca

La eliminación de cola blanca, acetato de polivinilo (PVA) es factible con la aplicación de enzimas.

Teóricamente y según el documento entregado con la compra de las enzimas, la enzima que hidroliza adhesivos vinílicos es la lipasa y no el mix enzimas. A continuación se realiza unas pruebas en papeles con pintura acrílica y con guache comparando la acción hidrolítica de las lipasas y la de las mix enzimas. De esta manera sabremos si existen trazas de lipasas en esta mezcla.

II.2.4.1 Cola blanca sobre acrílico

En primer lugar aplicamos el mix de enzimas sobre la cola blanca seca y endurecida (después de una semana de envejecimiento acelerado con rayos ultravioletas) [Figuras 39 a y 40 a]. La cola blanca se hincha y recupera el color blanco de cuando aún está fresco [Figuras 39 b y 40 b]. Posteriormente se elimina la cola de forma mecánica. Cuando queda poco estrato, la eliminación se realiza mediante el uso de un pincel hasta la completa eliminación de la cola sobre la superficie pictórica [Figuras 39 c y 40 c].

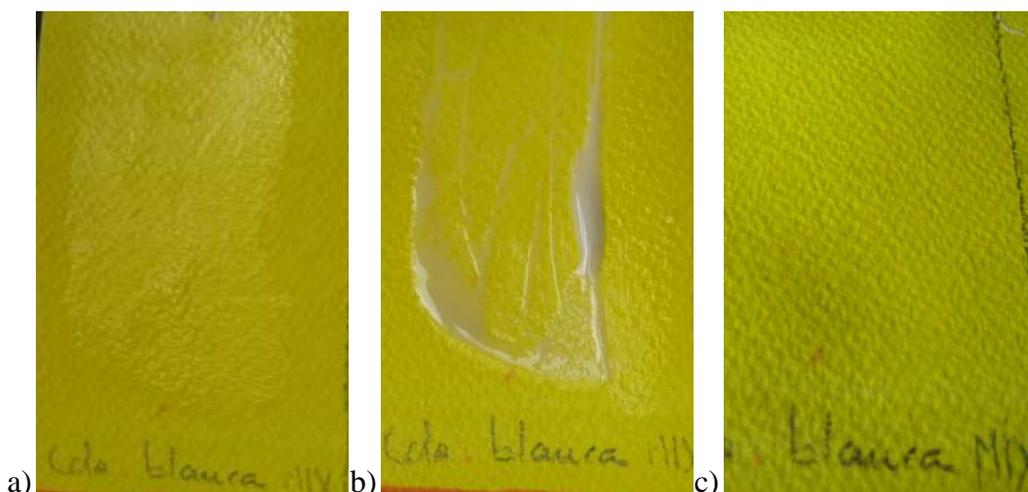
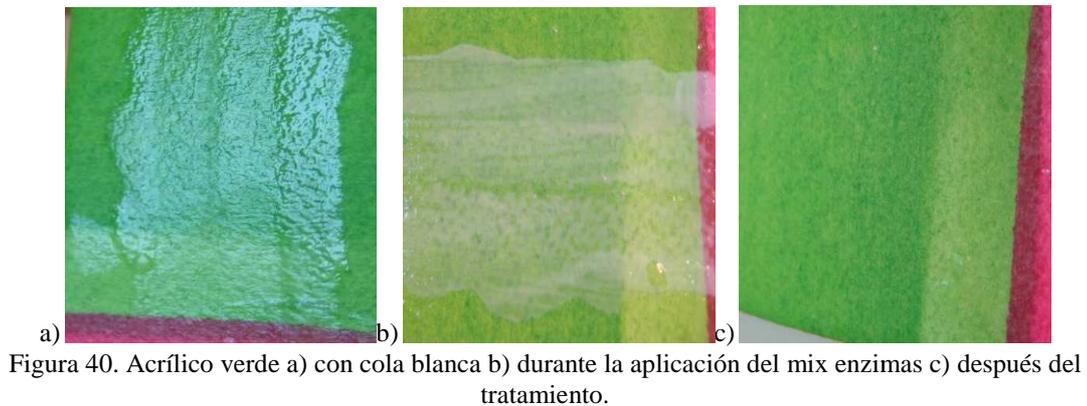


Figura 39. Acrílico amarillo a) con cola blanca seca b) durante la eliminación de la cola blanca con el mix enzimas y c) después del tratamiento.

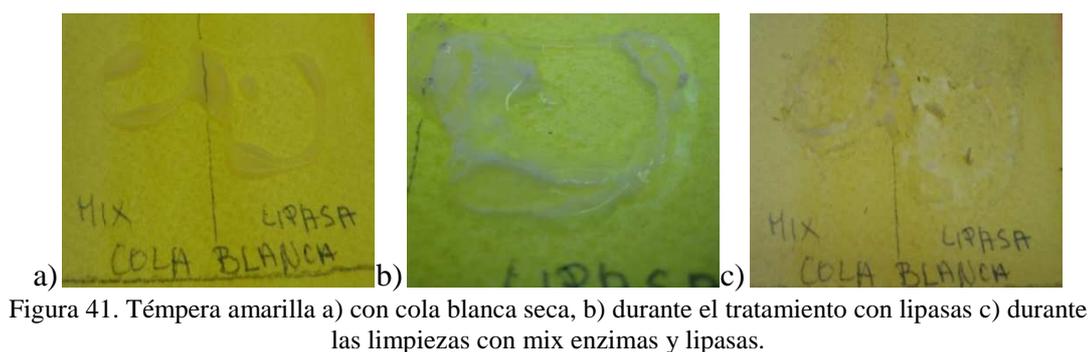


II.2.4.2 Cola blanca sobre guache

En esta ocasión se comparó la acción de las lipasas con el mix enzimas [Figura 41 a)].

Se vio que la cola se hinchaba de la misma manera después de la aplicación enzimática de los dos tipos de enzimas [Figura 41 b y c)].

Con esta técnica de limpieza se observa que la película pictórica se elimina con facilidad y por tanto deberíamos extremar las precauciones a la hora de limpiar cualquier sustrato, mancha, etc.



II.2.5 Eliminación de otro tipo de manchas

Por último se va a exponer las diferentes pruebas que realizamos con enzimas.

En primer lugar y sabiendo que las lipasas eliminan ceras, se aplicó el gel con este tipo de proteínas sobre unos trazos de cera negra [Figura 42 a y b)]. Como

observamos en la siguiente fotografía, no se consiguió limpiar la mancha de cera y además, la tinta se extendió por el papel blanco.

Se concluye que sobre este tipo de técnica pictórica es mejor no emplear este tipo de enzimas.

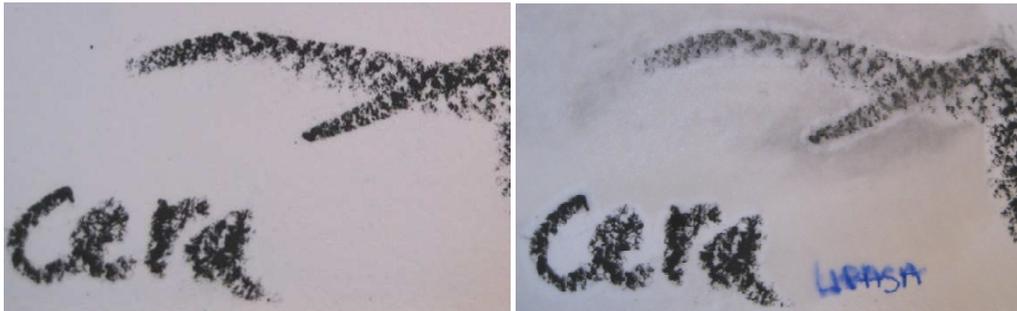


Figura 42. Detalle de un papel blanco con cera a) antes del tratamiento y b) después del tratamiento

Otra de nuestras pruebas era comprobar si se podía eliminar la tinta de los bolígrafos con algún tipo de enzima [Figura 43 a y b]. Se comprobó que ni siquiera se mueven los pigmentos, por lo que se descartó el uso tanto del mix como de las lipasas para eliminar la tinta de los bolígrafos. Puede que en su composición posea inhibidores de las enzimas y por este motivo no tenga ningún efecto hidrolítico sobre las tintas.



Figura 43. Mancha de bolígrafo tratado con el mix de enzimas y lipasas a) sobre papel blanco y b) sobre guache azul.

Posteriormente se experimentó sobre el Plextol® B500 que es una dispersión acuosa de un polímero acrílico puro termoplástico (de un copolímero de butilacrilato,

metilacrilato y etilacrilato) ^[164]. No se obtuvo ningún tipo de reacción al aplicar las enzimas. Por lo tanto las lipasas, las amilasas y el mix enzimas no eliminan, ni hinchan los estratos de este tipo de polímero acrílico.



Figura 44. Plextol® B500 sobre guache negro.

Por último, se intentó eliminar sin éxito, los trazos de un rotulador permanente negro sobre el guache amarillo con el empleo de todas las enzimas que se poseían, es decir, las amilasas, lipasas y el mix enzimas [Figura 45 a y b]. En esta ocasión se consiguió eliminar superficialmente la tinta del rotulador con el mix enzimas. No obstante, la tinta se extendió por la superficie de la capa pictórica manchándola y obligando a suspender la limpieza.

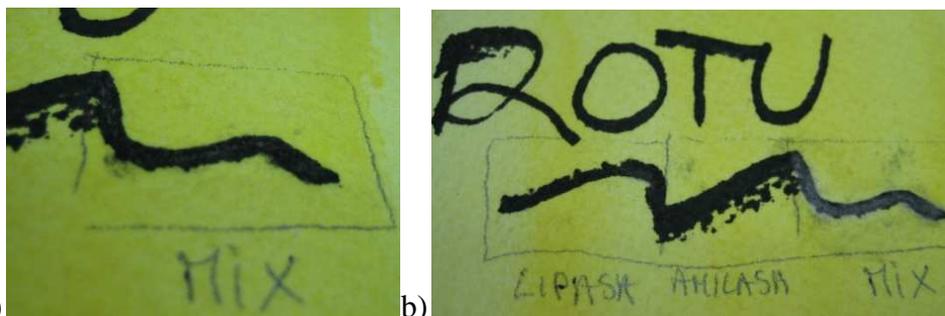


Figura 45. Rotulador permanente sobre guache amarillo a) antes del tratamiento enzimático b) después de la aplicación de los geles enzimáticos.

¹⁶⁴<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:m5DSOXXWWJgJ:kremer-pigmente.de/shopint/index.php%3Fcat%3D0207%26lang%3DESP%26product%3D75600+Plextol+B500&cd=3&hl=es&ct=clnk&gl=es>
http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:eKtWNZc7aDoJ:www.stem-museos.com/productos_item.asp%3Fseccion%3D74%26cont%3D5143+Plextol+B500&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=es

II.3 Tablas con los resultados

A continuación se exponen en una tabla, los resultados obtenidos de los tratamientos enzimáticos empleados para la eliminación de diferentes tipos de manchas sobre papeles en blanco y tres técnicas pictóricas: la acuarela, pintura acrílica y guache.

Tratamientos enzimáticos				
Manchas realizadas	Técnicas pictóricas empleadas			
	Ninguna	Acuarela	Acrílico	Guache
Chocolate	L-B M-B L+M-B	L-B M-B	M-B y T L-B y T	M- B y T* L- B y T*
Huevo	M-T	M- T*	M-T	M- T*
Engrudo de harina	A-B*	A-B*	A-B*	A-B*
Cola blanca	L- T M-T	L-B y T* M-B y T*	L-T M-T	L-B y T* M-B y T*
Plextol B500	L-0 M-0 A-0	L-0 M-0 A-0	L-0 M-0 A-0	L-0 M-0 A-0
Bolígrafo	M-0 L-0	M-0 L-0	M-0 L-0	M-0 L-0
Rotulador	L-0 M-P* A-0	L-0 M-P* A-0	L-0 M-P* A-0	L-0 M-P* A-0
Cera	L-P* M-P*	L-P* M-P*	L-P* M-P*	L-P* M-P*

Enzimas aplicadas: A-amilasas, L-lipasas, M-mix enzimas
 Nivel de limpieza: 0-nada, P-poco, B-bastante, T-todo
 *La limpieza puede dañar o ensuciar la capa pictórica, por lo que se debe actuar con cautela.

II.4 Discusión de la práctica

Con esta práctica se clausura la primera parte de este estudio sobre aplicaciones enzimáticas en restauración de obras de arte.

Se ha conseguido con los geles enzimáticos, quitar manchas de chocolate, huevo, cola blanca y engrudo de harina, sin ningún tipo de riesgo para el restaurador.

Se concluye que las lipasas no degradan la película acrílica. La combinación de diferentes enzimas ayuda a conseguir una mejor limpieza en las superficies pictóricas, como por ejemplo las lipasas y luego el mix de enzimas para eliminar chocolate. Las amilasas que se han empleado no tienen una actividad enzimática excesiva; hidrolizan bastante mal la harina, lo que puede significar que no llevan los cofactores necesarios para su correcta actividad. A pesar de esto, se consiguió suprimir gran parte de los sustratos de engrudo de harina. Además, en el guache y acuarela hay que tener un cuidado extremo para no eliminar la pintura, lo que nos revela que este tipo de enzimas efectivamente degrada un poco la goma arábiga. El mix de enzimas debe contener proteasas y lipasas según el tipo de manchas que consigue hidrolizar. Por otra parte, se ha visto sobre el guache, que el mix enzimas degrada más que las lipasas, y esto puede indicar que contienen un muy pequeño porcentaje de amilasas o alguna enzima que hidroliza la goma arábiga. De todos modos, en este tipo de limpiezas, es interesante emplear un microscopio óptico para retirar los sustratos hasta donde se desea y no degradar de esta manera, la capa pictórica.

Por lo tanto, las enzimas son una buena herramienta para limpiar ciertas manchas difíciles de suprimir con otros sistemas; cada enzima hidroliza un tipo de estrato que previamente habremos estudiado para acertar en el diagnóstico y tratamiento enzimático.

Estas proteínas poliglobulares son una clara alternativa a los métodos tóxicos y cancerígenos de los disolventes. Además se pueden combinar con estos sistemas tóxicos, para reducir una prolongada exposición a los disolventes. Es decir que, podemos suprimir el estrato deseado hasta un cierto espesor, y posteriormente utilizar otro sistema que no afecte a la capa pictórica.