

ELS ENZIMS

Estructura, funcionament i aplicacions en
Conservació - Restauració

Nina Viladrich Iglesias

Treball Final de Grau
Tutora: Anna Nualart Torroja

Grau en Conservació-Restauració de Béns Culturals
Curs: 2017 / 2018



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

RESUM

En aquest treball s'hi pot trobar, en primer lloc, informació sobre l'estructura dels enzims i els principis bàsics del seu funcionament. En segon lloc, una revisió de les seves aplicacions en el camp de la conservació-restauració, focalitzada especialment en els tres grups d'enzims hidrolítics més utilitzats (les lipases, les amilases i les peptidases), on s'hi inclouen criteris per a l'elecció de l'enzim adequat i la metodologia que cal seguir per a la seva utilització. Per últim s'hi pot consultar la documentació d'unes proves realitzades mitjançant un producte comercial a base d' α -amilasa (Albertina- Kompresse®) emprat per a retirar pasta de farina adherida a un suport de tela de lli.

Paraules clau

Hidròlisi, enzims, amilasa, lipasa, peptidasa, reentelat, tractaments aquosos, eliminació de materials.

ABSTRACT

In this paper you can find, in the first place, some information about the enzymes structure and its basic properties. Secondly, a review of its applications on conservation-restoration treatments, focusing on the three most important types of hydrolases (lipases, amylases and peptidases), including the criteria for choosing the appropriate enzyme and some usage recommendations. Finally, you can find the description of some tests done on mockups using a commercial product which contains α -amylase enzyme (Albertina-Kompresse®), with the aim of removing starch paste from a linen fabric.

Keywords

Hydrolysis, enzymes, amylase, lipase, peptidase, relining, starch paste, aqueous treatments, removal of materials.

ÍNDEX DE CONTINGUTS

1_INTRODUCCIÓ	7
1.1_Objectius.....	7
1.2_L'eliminació de materials en un tractament de conservació - restauració	8
1.3_Orígens del terme i primers usos en restauració	13
2_ELS ENZIMS, ESTRUCTURA I FUNCIONAMENT	14
2.1_Les reaccions químiques i l'energia d'activació	14
2.2_Propietats bàsiques	15
2.3_Estructura dels enzims : cofactors i coenzims	18
2.3.1_Zona activa o centre actiu de l'enzim	18
2.3.2_Classificació dels enzims segons la seva estructura.....	18
2.4_Mecanismes d'acció	20
2.4.1_La catàlisi, les reaccions amb enzims.....	20
2.5_Factors que afecten a l'activitat enzimàtica	23
2.5.1_Concentració de l'enzim, activitat enzimàtica (UI) i activitat específica.....	23
2.5.2_Concentració del substrat.....	24
2.5.3_Temperatura	24
2.5.4_pH	25
2.5.5_Activadors i inhibidors enzimàtics.....	25
2.6_Nomenclatura.....	28
3_ELS ENZIMS EN LA RESTAURACIÓ	29
3.1_Les hidrolases	29
3.1.1_Esterases o enzims lipolítics: les triacilglicerol lipases.....	32
3.1.2_Glicosidases: les α -amilases	34
3.1.3_Peptidases	35
4_METODOLOGIA I APLICACIÓ.....	37
4.1_Tensioactius	37
4.2_Gels	38
4.3_Solucions tamponades.....	38

4.4_Esbandit	38
4.5_Altres presentacions del producte	39
5_REVISIÓ DE CASOS PRÀCTICS	40
6_DISENY EXPERIMENTAL PER A PROVES AMB ENZIMS	47
6.1_Descripció de la metodologia utilitzada	49
6.2_Descripció del producte utilitzat.....	50
6.2.1_Especificacions tècniques.....	50
6.2.2_Recomanacions d'ús segons el fabricant.....	51
6.3_Estrats de l'aplicació	51
6.4_Proves prèvies.....	52
6.4.1_Resultats de les proves prèvies.....	53
6.4.2_Valoració dels resultats de les proves prèvies.....	59
6.5_Proves per a l'eliminació de pasta de farina d'un suport de tela de lli.....	60
6.5.1_Resultats.....	63
6.5.2_Valoració dels resultats.....	73
6.6_Conclusions de la part experimental	75
7_CONSIDERACIONS FINALS DEL TREBALL	78
8_REFERÈNCIES I BIBLIOGRAFIA	80

1_INTRODUCCIÓ

Al llarg de les últimes dècades la professió del conservador-restaurador està essent objecte d'una profunda revisió de mètodes i criteris, amb la intenció d'incorporar cada vegada més la metodologia científica a la seva praxis. La col·laboració entre professionals de diferents disciplines, com la química, la història de l'art o la biologia, està esdevenint un factor clau per a la consecució de tractaments estables i durables, sense efectes secundaris per a les obres intervingudes.

En aquest marc de voluntat de millora i d'evolució constant es comencen a tenir en compte també els efectes nocius que produeixen alguns productes sobre medi ambient, així com el grau de toxicitat que poden tenir aquests productes pels conservadors-restauradors. És per aquest motiu que es prioritzen els tractaments aquosos i les intervencions selectives.

Els tractaments amb enzims compleixen en escriu aquestes funcions, però malauradament no han esdevingut encara una pràctica habitual en l'àmbit laboral, ni s'inclouen de manera explícita als plans d'estudis reglats per a la professió. Tot i aquesta poca popularitat, fa molts anys que s'utilitzen en contextos més aviat acadèmics o institucionals, en els que el pressupost per a proves i anàlisis acostuma a estar una mica més justificat.

Així doncs, a dia d'avui, els enzims s'utilitzen exclusivament en casos on els mètodes tradicionals no resulten efectius, quedant encara per a explorar gran part de les seves propietats i possibles nous usos en el camp de la conservació - restauració.

1.1_OBJECTIUS

Aquest treball s'ha concebut com a una introducció als mètodes enzimàtics, i pot ser d'interès per a tots aquells conservadors-restauradors que no coneixen les característiques dels enzims i les seves possibles aplicacions. Els objectius principals del treball són tres, que alhora queden definits en l'estructura principal del document pel següent ordre:

- En primer lloc, conèixer les característiques dels enzims, què són i com actuen.
- En segon lloc, veure com s'han utilitzat en el camp de la conservació-restauració: quins enzims poden ser útils en determinades intervencions i quina és la metodologia adequada per a utilitzar-los.
- En tercer lloc, provar els seus efectes en un cas pràctic per a corroborar alguns dels aspectes teòrics estudiats.

1.2_L'ELIMINACIÓ DE MATERIALS EN UN TRACTAMENT DE CONSERVACIÓ - RESTAURACIÓ

La retirada de materials en contacte amb l'obra és un procés molt arriscat, ja que suposa una acció irreversible i potencialment perillosa. La possibilitat de perjudicar elements que no requereixen ser intervinguts augmenta quan els tractaments comporten fases humides, tant si utilitzem sistemes aquosos com si utilitzem dissolvents d'altres característiques.

Tanmateix, la brutícia no és l'únic element que s'elimina en tractaments de conservació-restauració. Nombroses vegades trobem la presència d'altres materials, tant originals com fruit d'intervencions subsegüents, que a causa del seu envelliment natural perjudiquen parts de l'obra. Parlem de resines, vernissos, adhesius, repintades... que degut a processos d'oxidació i canvis en la seva composició posen en joc la conservació d'altres elements. Així doncs, sempre que es prengui la decisió d'eliminar-los caldrà definir molt bé els criteris, avaluant els riscos i avantatges que suposa la intervenció.

Un cop analitzats els materials constitutius es poden valorar els diferents sistemes d'eliminació i decidir quin d'ells ens serà més adequat. Caldrà sempre actuar de manera selectiva, cenyir-se estrictament a les zones afectades i actuar amb les màximes garanties de control. En cas que sigui necessària la utilització de productes o materials per a facilitar l'operació (dissolvents, additius, etc...) és important que aquests siguin estables químicament, que siguin compatibles amb l'obra i que l'eliminació dels residus després del tractament es pugui realitzar de manera senzilla.

Darrerament es tendeix cada vegada més a utilitzar sistemes aquosos en la mesura que sigui possible. L'aigua és un dissolvent polar altament efectiu en la majoria dels casos, tot i que pot esdevenir també un factor de risc per l'obra si no es controla rigorosament la seva acció, ja que afecta als materials tant física com químicament. És per aquest motiu que se'n modifiquen les característiques en funció dels materials sobre els que es vol actuar.

Tradicionalment s'han considerat quatre paràmetres que afecten a les propietats de l'aigua (Wolbers, 2004):

1. El valor de pH

Les variacions de pH són una manera de controlar la solubilitat de certs materials. Els àcids són substàncies que en solució aquosa es dissocien alliberant ions hidròni (H^+ , també anomenats protons), mentre que les bases es dissocien alliberant grups hidroxil (OH^-), que capten els protons del medi on es troben. Un material orgànic àcid que contingui grups carboxil ($-COOH$), pot reaccionar amb una substància bàsica que contingui grups OH^- , formant carboxilats ($-COO^-$). Així doncs, un àcid pot ser escassament soluble en la forma no ionitzada i soluble en la forma dissociada, perquè les molècules

d'aigua que l'envolten l'estabilitzen¹ (Fig. 1). El mateix però a la inversa passa amb algunes substàncies bàsiques.

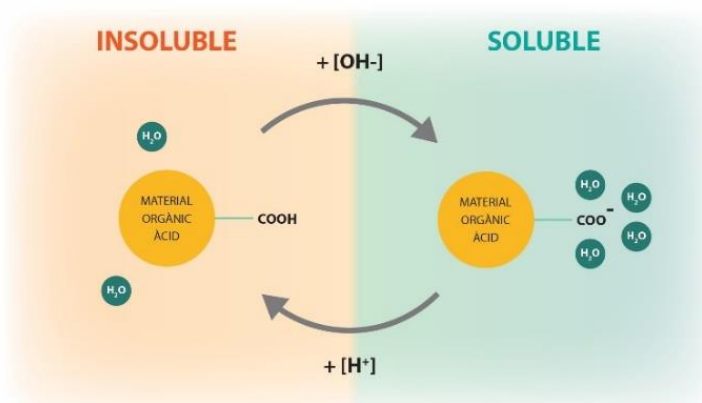


Fig. 1

Representació de l'efecte del pH en la solubilitat dels materials orgànics àcids.

[Imatge: Wolbers, 2004.
 Editada per @Nina
 Viladrich, 2018.]

En el cas de les proteïnes, que són substàncies amfòteres², augmentant el pH es ionitzen els grups carboxil, mentre que disminuint-lo es ionitzen els grups amina. Per tant les proteïnes, que solen formar part dels materials constituents de moltes capes de preparació i pictòriques, poden solubilitzar-se tant en ambients àcids com en ambients bàsics. El control del pH no només ens ajuda a solubilitzar allò que volem retirar, sinó també a conservar parts de l'obra que són sensibles a aquestes variacions. És per aquest motiu que en nombroses ocasions es regula el pH de les solucions aquoses mitjançant dissolucions tampó³.

2. La concentració iònica

La concentració iònica fa referència a la quantitat de ions que hi ha dissolts en la solució aquosa que utilitzem durant un tractament. Pot suposar un risc per l'obra tant si aquesta és molt elevada com si és massa baixa.

Quan es mulla la superfície d'una peça els ions que hi havia dispersos es dissolen en l'aigua; la concentració iònica resultant tendirà a igualar-se amb la de la solució aquosa aplicada⁴. Això vol dir que a la solució amb més concentració iònica

¹ Per exemple, una resina dammar quan s'oxida produeix àcid dammaròlic, que esdevé soluble a partir de pH 7.

² Tenen caràcter bàsic (grups amina, -NH₂) i àcid (grups carboxil, -COOH) alhora, per la qual cosa només estaran en estat neutre quan les càrregues positives i negatives del medi on es troben estiguin ionitzades per igual. Aquest punt s'anomena **punt isoelèctric**, i és diferent per a cada proteïna. Per exemple, en el cas del col·lagen, el punt isoelèctric es troba a pH 5,5.

³ Les dissolucions tampó són capaces de mantenir el pH invariable o amb molt poques variacions quan s'hi afegeix un àcid, una base, o quan es dilueixen. Estan compostes de la mescla d'un àcid o una base febles amb una sal del seu àcid/base conjugada.

⁴ Aquest fenomen es regula per pressió osmòtica. La pressió osmòtica serà més elevada com més elevada sigui la diferència entre les dues concentracions iòniques.

aquesta disminuirà, mentre que a la solució amb menys concentració aquesta augmentarà.

De manera general, quan plantegem un tractament aquós cal que les dues concentracions iòniques siguin semblants, per a evitar tant introduir ions a la superfície de l'obra com per evitar endur-se ions que formen part del material constituent de l'obra.

La concentració iònica es mesura a partir de la conductivitat de l'aigua, i per a neteges aquoses es solen recomanar valors de 4 a 8 mil·lisiemens (mS) / cm.⁵

3. La quelació

Un agent quelant és un compost químic que disposa de ions lliures (no utilitzats en enllaços propis) que és capaç de capturar ions metàl·lics i formar complexos iònics, solubles en aigua. Ens permet solubilitzar brutícia que contingui ions Ca^{2+} , Mg^{+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} i sals. (Nualart, 2017)

La seva utilització pot suposar un risc per a algunes capes pictòriques que continguin pigments amb ions metàl·lics, o per a algunes capes de preparació amb calci en la seva composició.

4. El poder tensioactiu

Els tensioactius són substàncies que tenen la capacitat d'emulsionar lípids immiscibles o de dispersar sòlids insolubles. Redueixen la tensió superficial dels líquids, augmentant el seu poder mullant.

Són molècules formades per una cadena lipòfila (de naturalesa apolar, que presenta afinitat amb els lípids) i un cap hidròfil (de naturalesa polar, que presenta afinitat amb l'aigua).

Hi ha diversos tipus de tensioactius (aniònics, catiònics i no iònics) i abans d'utilitzar-los cal saber la naturalesa dels materials amb què estaran en contacte, així com la seva concentració micel·lar crítica⁶. Si es decideix emprar-los, cal tenir present que tenen un alt índex de retenció a les superfícies on s'apliquen (degut a la seva alta penetració), i que probablement quedaran residus de tensioactiu en

⁵ En algunes ocasions trobarem la mesura en microsiemens (μS)/cm. ($1 \text{ mS} = 1000 \mu\text{S}$)

⁶ La Concentració Micel·lar Crítica (CMC) representa la concentració de tensioactiu en la qual es comencen a formar agregats o micel·les de manera espontània en una dissolució. És important conèixer-la per a saber quant tensioactiu necessitem i per a saber com esbandir cada tensioactiu.

estrats interns de l'obra. En molts casos no es coneixen les conseqüències del seu envelliment.

Les múltiples combinacions de la modificació d'aquests quatre factors ens ofereixen moltes possibilitats de treball, que ens ajuden a minimitzar els efectes negatius del tractament aquós i maximitzar-ne l'eficiència. Tot i això, els sistemes citats com a tradicionals presenten dos problemes fonamentals: la baixa especificitat de la seva acció i l'elevada retenció que algunes de les substàncies utilitzades poden tenir en la superfície de l'obra (Blasco, De la Viña & San Andrés, 2005).

En determinats casos, quan es tracta de retirar substàncies orgàniques de la superfície de béns culturals podem, sense ometre els efectes dels quatre factors anteriors, afegir un cinquè element:

5. L'activitat enzimàtica

L'addició d'enzims a les solucions aquoses és una manera d'augmentar la selectivitat i efectivitat dels tractaments, alhora que evitem els efectes perjudicials d'alguns compostos, tant per l'obra com pel medi ambient. Són eficaços a molt baixes concentracions i a més a més presenten molt baixa toxicitat.

Els enzims poden seleccionar els materials a un nivell molt més profund del que ho fem nosaltres a escala macroscòpica. La seva utilització no és gaire popular al nostre territori, degut als requeriments tècnics (la seva utilització requereix un bon nombre d'anàlisis prèvies i una bona caracterització dels materials) i a la falta d'informació respecte la seva correcta utilització. Tot i això, hi ha països on els enzims s'utilitzen de manera habitual des de ja fa anys, especialment en la conservació-restauració de document gràfic (De Lera, 2011). A més, els avenços en la investigació i la indústria proporcionen productes cada vegada més còmodes i fàcils d'usar. Aquests preparats, tot i tenir un cost una mica més elevat, redueixen el temps d'aplicació i els requeriments tècnics per a la seva utilització, resultant en un estalvi de temps i la necessitat d'equipaments menys específics.

Incorporant els enzims als nostres hàbits de treball avancem cap a una professió cada vegada més sostenible i respectuosa amb el medi ambient i amb el restaurador. Només habituant-nos a la seva utilització aconseguirem generar una major demanda, que repercutirà en un menor cost del producte.

Tot seguit es resumeixen els avantatges i els inconvenients de la seva utilització (Fig. 2):

AVANTATGES	INCONVENIENTS
<ul style="list-style-type: none">•Respectuosos amb el medi.•Baixa toxicitat pel restaurador.•Eficaces a molt baixes concentracions.•Paràmetres d'acció molt moderats: Temperatura i pH compatibles amb les obres.•Alta selectivitat dels materials sobre els que actuen.•Menys agressius per l'obra que alguns tractaments aquosos àcids o bàsics.	<ul style="list-style-type: none">•Requereixen anàlisis acurats del material que es vol retirar.•Elevat cost.•Només vàlids per a obres que suportin tractaments aquosos.•Només vàlids per a la descomposició de polisacàrids, lípids, proteïnes i alguns polímers acrílics.•Alguns pigments poden inhibir la seva activitat.

Fig. 2: Avantatges i inconvenients de la utilització d'enzims en tractaments de conservació-restauració.

[Imatge © Nina Viladrich, 2018]

1.3_ORÍGENS DEL TERME I PRIMERS USOS EN RESTAURACIÓ

Un ésser viu, altrament dit un organisme, és un conjunt complex d'àtoms i molècules organitzades, per on transcorren milers de reaccions químiques constantment. A tot aquest conjunt de reaccions que permeten canviar la naturalesa de les substàncies que formen els éssers vius l'anomenem metabolisme.

Al metabolisme, les reaccions químiques ocorren de manera molt més ràpida que fora de l'organisme. A mitjans del S.XIX, el microbiòleg Louis Pasteur (1822 – 1895) va intentar reproduir en un laboratori moltes d'aquestes reaccions, però va ser incapaç de determinar quin era el paràmetre que en feia augmentar la velocitat. Pasteur va suposar que els sistemes vius estaven dotats d'una "força vital", que els permetia saltar-se les lleis de la naturalesa de la matèria. Altres investigadors contemporanis a Pasteur, entre ells Justus von Liebig (1803 – 1873), van proposar que els processos biològics estaven influïts per l'acció d'unes substàncies químiques desconegudes, que en aquell moment van anomenar fermentes.



Fig. 3: Friedrich Wilhelm Kühne, considerat un dels pares de la química orgànica.

[imatge: Lange, C. (1886), Arxiu digital de la col·lecció gràfica de la Universitat de Heidelberg]

Així doncs, el nom "enzim" prové del grec **en**, en (a l'interior) + **zymé**, llevat. El terme el va encunyar al 1878 Wilhelm Kühne (1837-1900) (Fig. 3), tot fent un esforç per a emfatitzar que hi ha alguna cosa "dins" els llevats que no és "llevat" en si mateix, i que catalitza⁷ les reaccions de la fermentació (Voet, D., Voet, J. & Pratt, 2016).

En el camp de la Conservació-Restauroció les primeres aplicacions amb enzims es remunten a 1970, quan Wendelbo i Fosse van utilitzar l'enzim Tripsina per a retirar la cola animal d'uns manuscrits. Seguidament altres restauradors van explorar les possibilitats dels enzims, com O'Hoski, que utilitzava la saliva natural per a neteges al 1976, o Segal i Cooper, que van utilitzar-los per a retirar adhesius a base de midó de la superfície d'un pergami al 1977. Des d'aleshores nombrosos investigadors els han emprat en tot tipus de suports. Alguns exemples en serien la neteja de superfícies policromades amb pintura a l'oli (Wolbers, 1988) o escultures de terracota (Bonomi, 1994), i molts d'altres fins a l'actualitat. (Cremonesi, 2002).

⁷ La catalisi és el procés a través del qual s'incrementa la velocitat d'una reacció química.

2_ELS ENZIMS, ESTRUCTURA I FUNCIONAMENT

2.1_LES REACCIONS QUÍMIQUES I L'ENERGIA D'ACTIVACIÓ

Una reacció química és el procés pel qual dues o més substàncies es transformen en altres substàncies de propietats diferents.

Per entendre com funciona una reacció, cal partir d'una sèrie de molècules que anomenem reactius (R) o substrat (S)⁸, els àtoms de les quals es troben ordenats d'una determinada manera mitjançant enllaços químics. Quan aquests enllaços es debiliten permeten que els àtoms es reorganitzin, donant lloc a altres substàncies que anomenem productes (P). Entre l'estat inicial i l'estat final de la reacció trobem sempre un estat entremig que denominem "estat activat del reactiu" o "estat de transició":



Independentment de si la reacció és exotèrmica⁹ o endotèrmica¹⁰, o de si es produeix de forma instantània o no, cal en totes les reaccions una aportació d'energia extra, que coneixem com a energia d'activació (E_a) (Fig. 4). L'energia d'activació és la quantitat mínima d'energia necessària per a iniciar una reacció química.

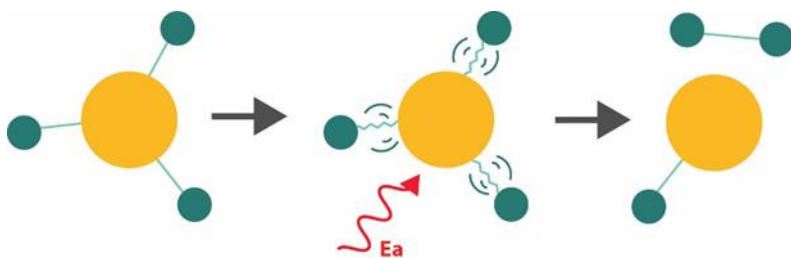


Fig. 4: Representació de l'escissió d'una molècula hipotètica, on s'observa l'entrada d'energia d'activació durant l'estat de transició de la reacció.

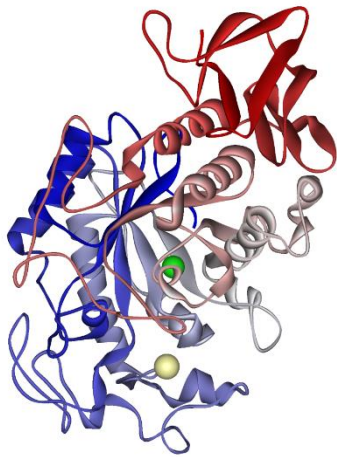
[Imatge © Nina Viladrich, 2018.]

⁸ Parlem reactiu de manera general, i de substrat en les reaccions enzimàtiques específicament.

⁹ Reacció que desprèn energia en forma de calor.

¹⁰ Reacció en la que el sistema absorbeix energia de l'entorn en forma de calor.

2.2_PROPIETATS BÀSIQUES



Els enzims són proteïnes de forma globular que poden estar constituïdes per una o més cadenes lineals d'aminoàcids¹¹, corresponentment units per enllaços peptídics¹². Aquestes cadenes lineals, enrotllades i plegades sobre sí mateixes, confereixen l'estructura terciària¹³ de forma globular a l'enzim (Fig. 5).

Fig. 5: Representació de l'estructura terciària de l'enzim α -amilasa pancreàtic d'un ésser humà. En verd un ió clorur (Cl^-) i en blanc un ió de calci (Ca^{2+}), necessaris per a la seva activitat enzimàtica.

[Imatge: Rydberg et al., 2002]

Tot i que la majoria d'enzims són proteïnes, cal esmentar algunes excepcions com els catalitzadors d'àcids ribonucleics (RNA), també anomenats "ribozims". Els ribozims són vestigis d'un món pre-cel·lular, on les molècules de RNA gaudien d'una posició més important com a catalitzadors bioquímics. Actualment però, l'acció catalítica de les proteïnes ha eclipsat a la de l'RNA, segurament degut a la seva major versatilitat química: mentre que els àcids nucleics són polímers d'unitats monomèriques químicament similars, les proteïnes tenen a la seva disposició més de 20 tipus d'aminoàcids, amb major varietat de grups funcionals¹⁴. Aquesta gran diversitat de combinacions fa dels enzims uns catalitzadors altament específics (Voet et al., 2016).

Juntament amb l'alta especificitat, hi ha altres propietats que distingeixen els enzims de la resta de catalitzadors químics. Partint de la idea de la seva utilització fora de l'organisme, la majoria d'aquestes característiques representen avantatges per als restauradors, ja que

¹¹ Un **aminoàcid** és una molècula orgànica bifuncional, que conté un grup amina ($-NH_2$) i un grup carboxil ($-COOH$) enllaçats a un mateix àtom de carboni (α), juntament amb una cadena lateral ($-R$) que dona característiques diferents a cada aminoàcid (Cremonesi, 2002).

¹² Un **enllaç peptídic** és el resultat de la unió de dos aminoàcids mitjançant una reacció de condensació (alliberament d'una molècula d'aigua) entre els grups $-NH_2$ i $-COOH$, formant un dipèptid. La unió $NH-CO$ resultant és un enllaç amídic, altrament dit enllaç peptídic. Els dipèptids es poden continuar enllaçant creant cadenes lineals d'aminoàcids, anomenades tripèptids, oligopèptids o polipèptids, respectivament (Voet et al., 2016)

¹³ S'anomena **estructura terciària** a la disposició tridimensional de tots els àtoms que componen una proteïna.

¹⁴ Un **grup funcional** és un àtom o conjunt d'àtoms units a una cadena carbonatada, responsable de la seva reactivitat i propietats químiques.

els seus paràmetres d'acció es corresponen amb els dels materials presents als béns culturals i amb les condicions del nostre entorn. Tot i que els catalitzadors químics s'utilitzen habitualment en processos pictòrics (per exemple productes a base de cobalt [Co] o manganès [Mn] utilitzats per a accelerar processos d'oxidació d'olis secants [Seymour & Carraher, 2002]), la major part de les reaccions químiques que es requereixen dins la conservació-restauració estan enfocades a retirar productes orgànics¹⁵, i per tant de manera general es busquen reaccions d'hidròlisis o descomposició de lípids, polisacàrids o proteïnes, que els enzims són capaços de catalitzar (Cremonesi, 2002).

Una de les característiques més importants dels biocatalitzadors és que no participen en la reacció. Això vol dir que un enzim no és ni producte ni substrat, no és reactiu. **Un cop ha acabat l'acció enzimàtica, l'enzim queda intacte i disponible per a començar una nova catàlisi amb una nova molècula de substrat.**

A continuació s'han resumit les principals característiques dels biocatalitzadors, en contraposició amb les característiques genèriques dels catalitzadors químics convencionals (Fig. 6).

¹⁵ Exceptuant alguns mètodes experimentals per a la consolidació de la cel·lulosa mitjançant enzims (De Lera, Escohotado, Blum & Marquette, 2009).

Fig. 6: Característiques dels catalitzadors¹⁶.

BIOCATALITZADORS	CATALITZADORS QUÍMICS
Són majoritàriament proteïnes (exceptuant els ribozims)	Són substàncies simples (formades per àtoms o molècules d'una mateixa classe d'àtoms).
Aconsegueixen velocitats de reacció més altes que en les catàlisis químiques, de 10^6 a 10^{12} vegades més que sense catàlisis.	Les reaccions equivalents a les realitzades amb biocatalitzadors són variis ordres de magnitud menors en quant a la velocitat de reacció.
Són altament eficaços, ja que funcionen a baixes concentracions .	Són mitjanament eficaços.
La seva activitat catalítica pot ser regulada . Les activitats catalítiques varien en resposta de les concentracions de diverses substàncies al substrat.	La seva activitat no es pot regular.
Condicions de reacció suaus. Les reaccions catalitzades per enzims es produeixen a temperatures per sota els 100° , pressió atmosfèrica i pH gairebé neutre.	La catàlisis química sovint requereix temperatures i pressions elevades, i a vegades pHs extrems.
Major especificitat de reacció . Cada enzim actuarà en una determinada reacció i no en una altra, o dit d'altra manera, sobre un substrat determinat.	Menor especificitat de reacció.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

¹⁶ Taula elaborada a partir de les següents fonts: Cremonesi, 2002; Voet et al. , 2016; Muñoz, 2010.

2.3_ESTRUCTURA DELS ENZIMS : COFACTORS I COENZIMS

2.3.1_ZONA ACTIVA O CENTRE ACTIU DE L'ENZIM

La zona activa de l'enzim és la zona on es produeix la catàlisi pròpiament. És la part de la molècula que és capaç de retenir el substrat mentre en catalitza la reacció (Fig. 7). Dins el centre actiu podem diferenciar diverses zones de fixació, que estableixen enllaços amb el substrat de diferents naturaleses per tal de retenir-lo¹⁷, i una zona catalítica, que és la que facilitarà que succeeixi la reacció química en qüestió.

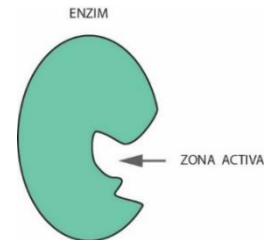


Fig. 7:
 Representació d'un
 enzim simple.

[Imatge ©Nina Viladrich,
 2018]

2.3.2_CLASSIFICACIÓ DELS ENZIMS SEGONS LA SEVA ESTRUCTURA (Fig. 8)

- Enzims **SIMPLES**: són completament proteics. Poden estar formats per una o varies cadenes polipeptídiques.
- Enzims **CONJUGATS**: tenen una part proteica anomenada **apoenzim**, que no és reactiva per si sola, i una part no proteica que es situa al centre actiu de l'enzim.

A aquesta part l'anomenarem **cofactor** si és de naturalesa inorgànica, (generalment ions metàl·lics com el ferro [Fe], el coure [Cu] o el zinc [Zn]), o l'anomenarem **coenzim**¹⁸ si és de naturalesa orgànica, no proteica.

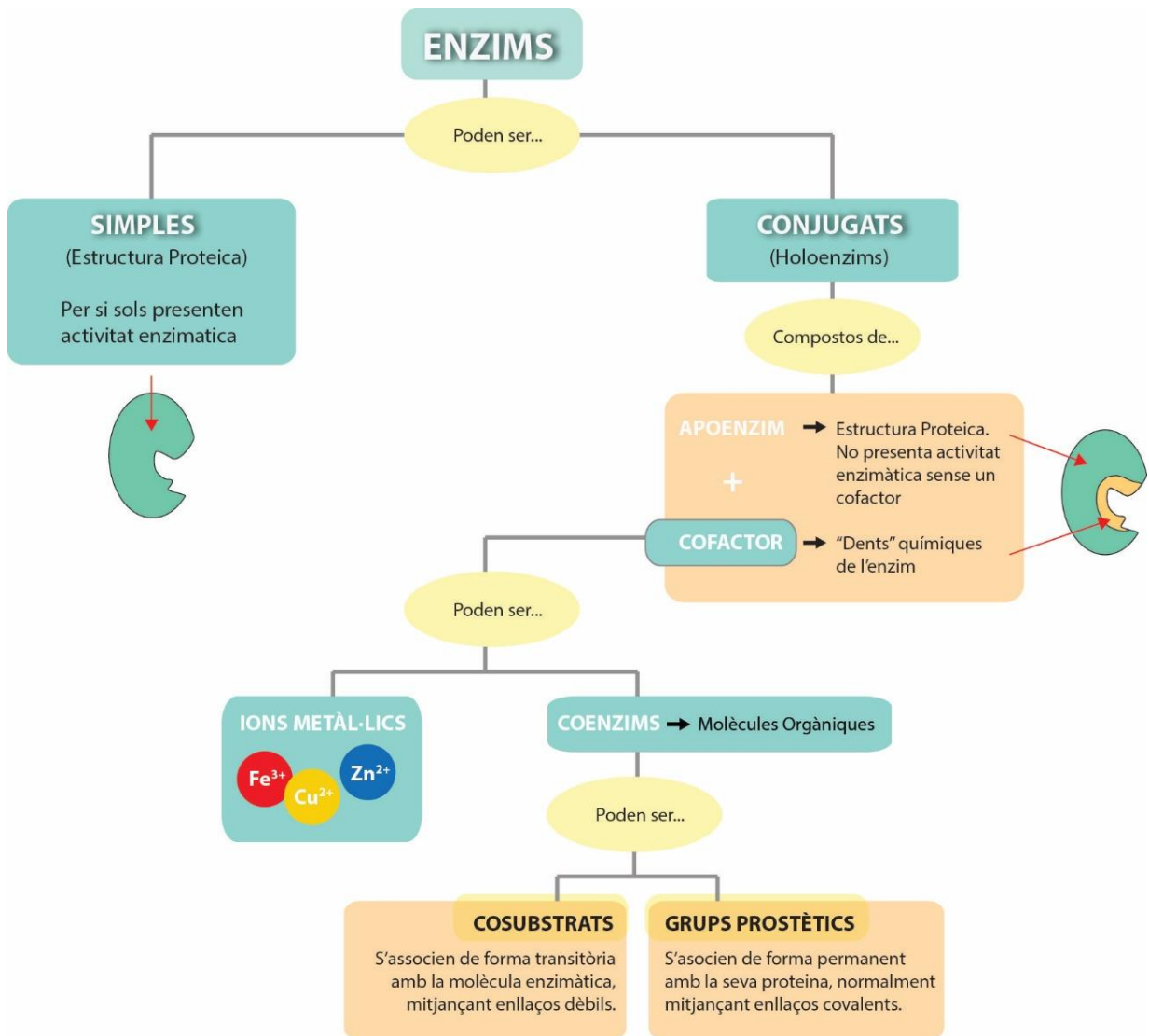
Aquests cofactors o coenzims són el que fa reactiva la molècula un cop s'uneixen a l'apoenzim. En l'organisme, alguns derivats de les vitamines fan la funció de coenzims. Al conjunt de l'apoenzim i el cofactor/coenzim l'anomenem **holoenzim**.

¹⁷ S'uneixen mitjançant forces de van der Waals, ponts d'hidrogen, interaccions electrostàtiques i interaccions hidròfobes (Voet et al. ,2016).

¹⁸ Els coenzims, pel seu cantó, poden ser de dos tipus: els **cosubstrats** (en cas que s'uneixin a l'apoenzim de forma transitòria) o bé **grups prostètics** (en cas que s'uneixin a l'apoenzim de manera permanent).

Fig. 8: Esquema-resum de la classificació dels enzims segons la seva estructura.

[imatge ©Nina Viladrich, 2018]



2.4_MECANISMES D'ACCIÓ

2.4.1_LA CATÀLISI, LES REACCIONS AMB ENZIMS

Hi ha diversos factors que intervenen en l'augment de la velocitat d'una reacció, com poden ser la concentració del substrat¹⁹, la temperatura²⁰, la superfície de contacte²¹, la pressió, la agitació de la mescla i la presència d'un catalitzador.

Els catalitzadors augmenten la velocitat de les reaccions químiques en les que participen disminuint la quantitat d'energia d'activació que necessiten per a produir-se (Fig. 9).

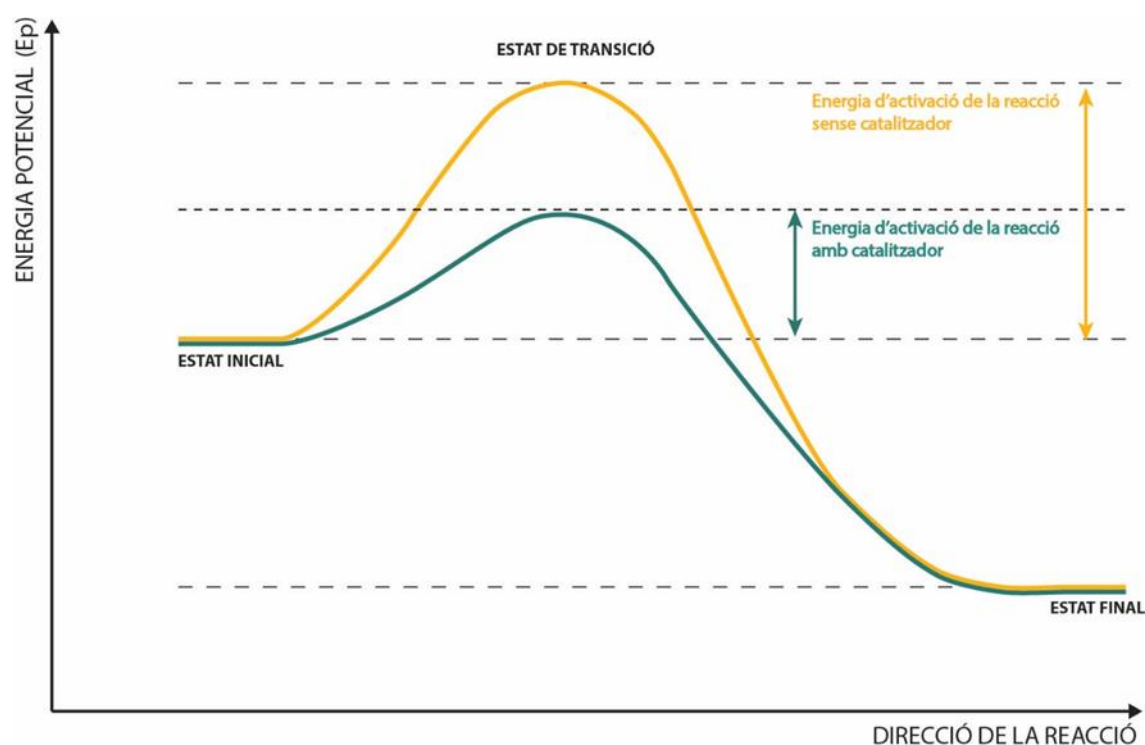


Fig. 9: Efecte d'un catalitzador en el diagrama d'estat de transició d'una reacció. En l'eix vertical l'energia potencial (E_p)²², en l'eix horitzontal la direcció de la reacció

[Imatge © Nina Viladrich, 2018]

¹⁹ Si hi ha més concentració de reactius hi ha més probabilitats de que es produeixin contactes entre ells.

²⁰ A una major temperatura les partícules es mouen amb més facilitat.

²¹ Si la mida de les partícules és més petita hi haurà més superfície de contacte per a reaccionar.

²² En física, l'energia potencial és l'energia que un objecte posseeix a causa de la seva posició en un camp de forces, o que un sistema té a causa de la configuració de les seves parts (Mc Call, 2010)

Nina Viladrich Iglesias. Els enzims: estructura, funcionament i aplicacions en C-R

Treball Final de Grau, Grau en Conservació-Restauració de Béns Culturals, Facultat de Belles Arts, Universitat de Barcelona, curs 2017-2018

Els enzims, com a biocatalitzadors, aconseguen aquesta tasca mitjançant diversos mecanismes que depenen de l'ordenament dels grups funcionals a la zona activa de l'enzim. Aquests mecanismes es poden dividir en dues línies d'acció:

- S'uneixen al substrat per a debilitar els seus enllaços interns.
- S'uneixen al substrat per a atraure altres reactius, augmentant la probabilitat de trobar-se entre ells.

El qualsevol cas, l'activitat enzimàtica suposa la formació d'un complex Enzim-Substrat (E-S), que culmina amb l'alliberació dels productes. Per a explicar la formació d'aquest complex E-S hi ha diverses teories, però les més acceptades són la de *la clau i el pany* i la de *l'acoblament induït*.

El model de *la clau i el pany* (Emil Fisher, 1893) descriu el centre actiu de l'enzim com a una zona rígida, que disposa de la forma específica per a rebre el substrat. Aquest acoblament actua per *complementarietat geomètrica*, tal com ho faria un pany amb una clau (Fig. 10) i per *complementarietat electrònica*²³ (Voet et al. , 2016) . Tot i que aquesta teoria es segueix utilitzant per a descriure l'especificitat dels enzims, no es compleix en tots els casos ni explica els canvis conformacionals observats en l'estructura dels enzims quan aquests reben el substrat.

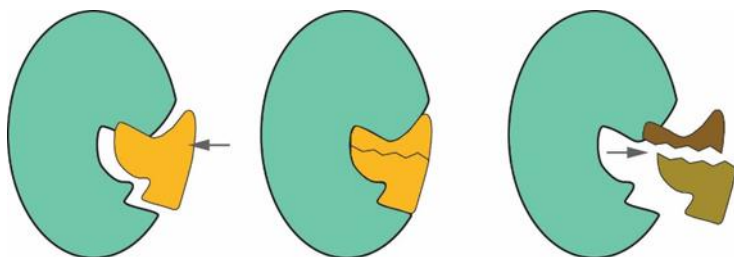


Fig. 10: Representació bàsica d'un enzim catalitzant una reacció que canvia la naturalesa d'un substrat (en groc).

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

Degut a aquestes diferències entre la teoria i la observació, actualment s'utilitzen teories més noves, entre elles el model de *l'acoblament induït* (Daniel Koshland, 1958).

Segons aquesta teoria, la zona activa de l'enzim no és rígida sinó que és mòbil, flexible i amb una forma semblant a la del substrat. Quan el substrat s'acosta a l'enzim, el centre actiu s'adapta al substrat, ajustant-se (hi ha un canvi en la conformació del centre actiu).

²³ Les càrregues dels aminoàcids que formen els llocs d'unió estan orientades de manera que atrauen específicament els grups funcionals d'un determinat substrat.

Aquesta teoria explica millor l'alta velocitat d'alguns dels acoblaments, ja que els substrats tenen més possibilitats d'encaixar i no han d'estar perfectament orientats per a que es produeixi la unió (Fig. 11). Dins d'aquesta teoria trobem altres variants, com el model de *tensió sobre el substrat*, que descriu la modificació de l'estructura del substrat mitjançant tensions induïdes per l'enzim. (Devlin, 2004).

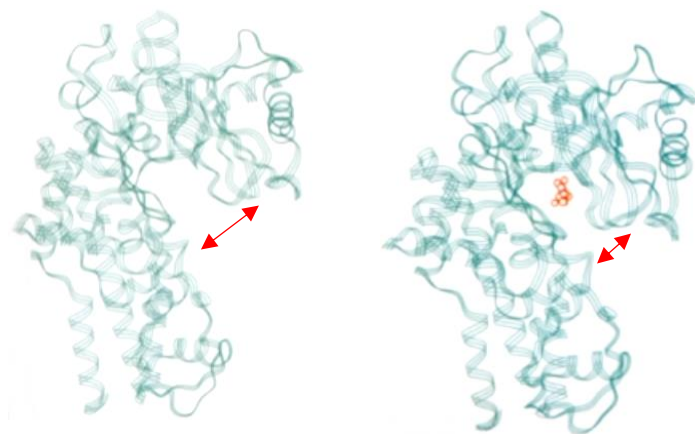


Fig. 11

Representació de l'enzim hexoquinasa (en blau). En el moment de rebre el substrat (en aquest cas una molècula de glucosa, en taronja) canvia la seva conformació a la zona del centre actiu, adaptant-se i abraçant al substrat.

*[Imatge extreta de Viniegra, 2016.
Modificada per Nina Viladrich, 2018]*

2.5_FACTORS QUE AFECTEN A L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA

2.5.1_CONCENTRACIÓ DE L'ENZIM, ACTIVITAT ENZIMÀTICA (UI) I ACTIVITAT ESPECÍFICA

La velocitat de reacció és directament proporcional a la concentració de l'enzim sempre i quant la concentració de substrat no superi el punt de saturació de l'enzim. Això vol dir que un cop totes les molècules d'enzim disposen de molècules de substrat per a interactuar, encara que s'augmenti la concentració de substrat la velocitat de reacció no serà major, ja que totes les molècules enzimàtiques estaran ocupades.

Per a expressar la quantitat de substrat que converteix un enzim en una unitat determinada de temps generalment s'utilitza la **unitat d'activitat enzimàtica (UI)**.

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol substrat convertit} \times \text{min}^{-1}$$

No obstant això, per als tractaments realitzats dins al camp de la conservació-restauració no es recomana treballar amb dissolucions on l'enzim estigui al seu punt de saturació. Tot i que això suposaria una disminució del temps del tractament, no repercutiria en una millor qualitat de la intervenció, ja que l'alta concentració d'enzim requeriria un esbandit molt més agressiu i un major risc de residus enzimàtics en la superfície de la peça tractada. Es per aquest motiu que generalment es té en compte un altre paràmetre: l'activitat específica de l'enzim.

L'**activitat específica** fa referència a la puresa d'un enzim, i ens indica el número d'unitats catalítiques d'aquest enzim per cada mil·ligram de proteïna (U/mg), o per mil·lilitre de dissolució (U/ml).

Per exemple, si comparem els productes comercials de la casa Sigma-Aldrich®, l'enzim 10065 α -amilasa²⁴ extret del fong *Aspergillus oryzae* té una activitat específica de **30 U/mg**, mentre que l'enzim A6380 α -amilasa extret del bacteri *Bacillus* sp. té una activitat específica de **1500-3000 U/mg**. Tot i que tots dos enzims són α -amilases, el segon té una activitat específica molt més elevada, i per tant serà més efectiu a baixes concentracions. (Domedel & Silvestre, 2012)

Tanmateix, cal recordar que l'efectivitat de l'enzim està estretament relacionada amb les condicions de pH i temperatura a les que estigui exposat, i amb l'especificitat del

²⁴ L' α -amilasa és un enzim que catalitza la hidròlisi dels enllaços del midó i el glucogen.

Nina Viladrich Iglesias. Els enzims: estructura, funcionament i aplicacions en C-R
Treball Final de Grau, Grau en Conservació-Restauració de Béns Culturals, Facultat de Belles Arts,
Universitat de Barcelona, curs 2017-2018

substrat. Tot i disposar d'un enzim amb una activitat específica elevada, aquesta fa referència a substrats molt determinats (midó, caseïna...) i està avaluada en condicions de laboratori. En processos de conservació-restauració generalment disposem de substrats més ambigus, menys purs, o bé deteriorats. Per a obtenir un valor d'activitat específica exacte caldria doncs mesurar-lo amb el nostre substrat i les nostres condicions (Cremonesi, 2002).

2.5.2_CONCENTRACIÓ DEL SUBSTRAT

De la mateixa manera que amb la concentració de l'enzim, la velocitat de la reacció augmentarà amb la concentració de substrat fins a arribar a una velocitat màxima, que equivaldrà al punt de saturació de l'enzim.

2.5.3_TEMPERATURA

En general, un augment de la temperatura suposa un augment de l'acció enzimàtica, fins que arriba a un punt on la velocitat de reacció és màxima. A aquest punt l'anomenem temperatura òptima, i és específic per a cada enzim. A partir de la temperatura òptima la mobilitat molecular és excessiva, i l'activitat enzimàtica cau dràsticament. Si seguïssim augmentant la temperatura, les proteïnes que formen l'enzim es començarien a desnaturalitzar, perdent la seva estructura terciària (Fig. 12). La majoria de les proteïnes globulars es desnaturalitzen per sobre dels 60-70°C (De Lera, 2011).

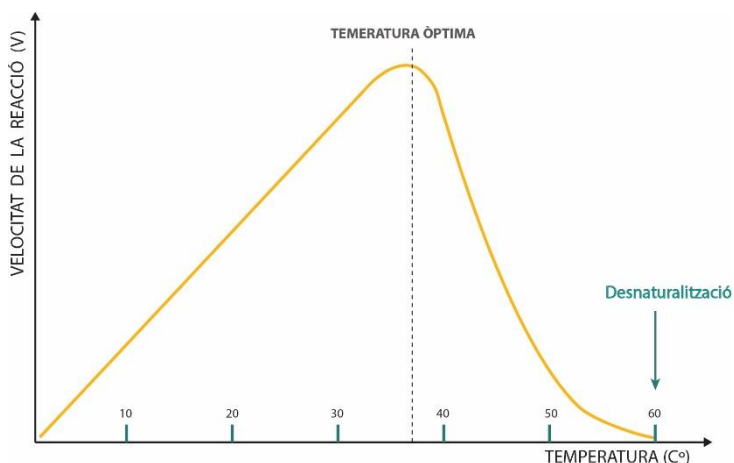


Fig. 12: Efecte de la temperatura en la velocitat d'una reacció enzimàtica.

[Imatge © Nina Viladrich, 2018]

2.5.4_pH

El pH òptim o interval de pH de cada enzim és diferent, i normalment coincideix amb les condicions que hi ha dins la cèl·lula o l'organisme al qual pertanyen. Quan aquest pH varia, la conformació de l'enzim s'altera i es produeix un canvi en l'estat de ionització dels grups funcionals del centre actiu de l'enzim (Lehninger, Nelson & Cox, 2005). Es a dir, tant per sobre com per sota del pH òptim, no hi ha una disposició iònica ideal per a que es produeixi el complex E-S (Fig. 13).

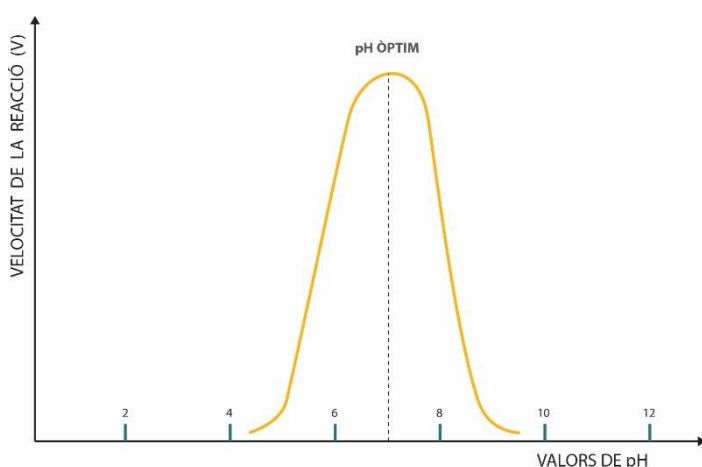


Fig. 13: Efecte del pH en la velocitat d'una reacció enzimàtica.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

2.5.5_ACTIVADORS I INHIBIDORS ENZIMÀTICS

Alguns enzims requereixen de la presència d'**activadors** per a una correcta activitat enzimàtica. Aquests activadors poden ser cofactors (ions metàl·lics) o coenzims. Per exemple, algunes amilases requereixen la presència de ions de clor (Cl⁻) en solució, mentre que algunes lipases²⁵ requereixen la presència de ions de calci (Ca²⁺) o d'un coenzim, com la colipasa, per a poder realitzar l'activitat catalítica.

Algunes preparacions enzimàtiques comercials ja contenen els cofactors necessaris per a la seva correcta utilització, però hi ha casos en els que serà necessari afegir a la dissolució els ions metàl·lics en forma de sals solubles. En general, concentracions de 50 a 100 mg de sal per 1g d'enzim sòlid són suficients. Per exemple, per a les lipases que requereixen Ca²⁺, l'addició de clorur càlcic a la mescla realitzaria aquesta funció (Cremonesi, 2002).

²⁵ Les lipases són enzims que catalitzen la hidròlisi dels triacilglicerols en àcids grassos i glicerol.

Per altra banda, també cal valorar la presència dels **inhibidors** de l'activitat enzimàtica (Fig. 14). Els inhibidors són substàncies que disminueixen o anul·len la velocitat de les reaccions enzimàtiques.

Aquesta inhibició pot ser **irreversible** quan l'inhibidor es fixa al centre actiu mitjançant enllaços covalents forts, o pot ser **reversible** quan l'inhibidor s'uneix al centre actiu mitjançant enllaços dèbils. Dins els inhibidors enzimàtics reversibles trobem també diversos mecanismes d'acció:

- **Inhibidors reversibles competitiu:** tenen una estructura molt semblant a la del substrat i competeixen amb ell per a col·locar-se al centre actiu. La major o menor concentració de substrat i d'inhibidor determinarà la velocitat final de la reacció. Aquests inhibidors són específics per a cada enzim²⁶.
- **Inhibidors reversibles no competitiu:** s'uneixen al substrat en una part diferent al centre actiu, causant alteracions estructurals a la conformació de l'enzim. Alguns cations metàl·lics (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} ...) poden actuar com a inhibidors no competitiu de certs enzims. Aquest punt és d'especial interès quan el material que volem tractar conté pigments amb presència d'aquests ions metàl·lics, ja que l'activitat enzimàtica disminuirà notablement. És per aquest motiu que es desaconsellen els tractaments amb enzims en aquest tipus de superfícies, a no ser que vulguem utilitzar la inhibició com a un factor a favor del tractament²⁷. Alguns exemples de pigments que contenen aquest tipus de ions serien l'atzurita, la malaquita, el verdigris (o verdet), el vermell de cadmi, el cinabri, etc. (Cremonesi, 2002).

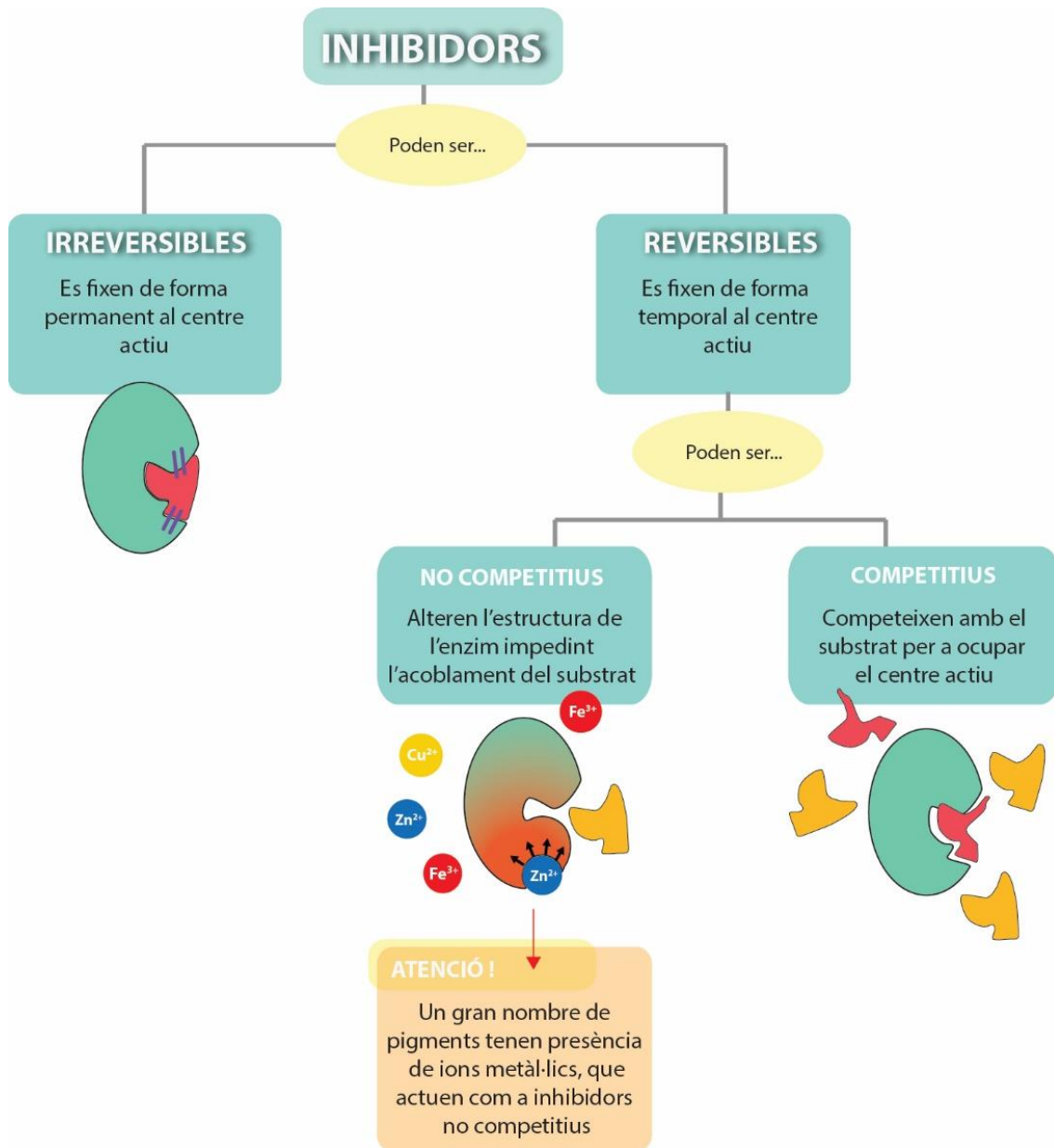
Més enllà dels materials constitutius de les obres d'art, cal tenir present que els utensilis metàl·lics en contacte directe amb els enzims (per exemple si remenem la solució enzimàtica amb una espàtula metàl·lica) podrien contaminar el producte i inhibir-ne la seva activitat.

²⁶ Poden estar presents en les obres d'art sense que el restaurador en sigui conscient (Domedel & Silvestre, 2012)

²⁷ Per exemple en el cas que no volguéssim acció enzimàtica en la capa pictòrica, però sí en altres materials d'estrats més superficials.

Fig. 14: Esquema dels tipus d'inhibidors enzimàtics.

[imatge ©Nina Viladrich, 2018]



2.6_NOMENCLATURA

Com a norma general, a cada enzim se li assignen dos noms i un número de classificació de quatre dígit.

En primer lloc trobem el **nom recomanat o acceptat**. S'utilitza amb freqüència per a denominar els diferents enzims i és el nom utilitzat amb anterioritat a la classificació sistemàtica. Per exemple tripsina, pepsina, lipasa, amilasa...

En segon lloc trobem el **nom sistemàtic**. S'utilitza quan cal evitar ambigüitats, tot i que cada vegada apareix amb més freqüència a les bases de dades presents a internet. Els enzims es denominen sistemàticament agregant el sufix *-asa* al nom del seu substrat o a una fase que descriu la seva acció catalítica²⁸ (Voet et al. 2016).

Per últim trobem el **Codi de la Comissió Enzimàtica** (Número EC). Per tal d'eliminar confusions i establir una classificació funcional, la *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)* va establir 6 classes principals de reaccions enzimàtiques (Fig. 15), amb les seves corresponents subclasses i sub-subclasses. Aquesta informació queda resumida al número EC (*Enzyme Commission*), que consta de 4 dígit separats per punts:

E.C. 1.1.1.1.

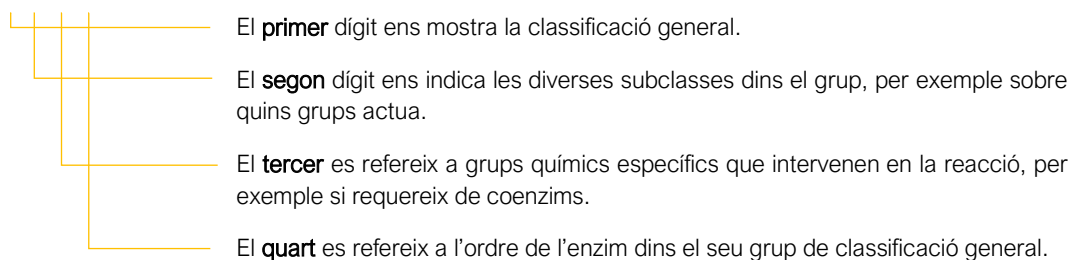


Fig. 15: Taula de classificació general dels enzims segons la seva reacció:

CLASSIFICACIÓ GENERAL	TIPUS DE REACCIÓ CATALITZADA
1 OXIDORREDUCTASES	Reaccions d'oxidació-reducció
2 TRANSFERASES	Transferència de grups funcionals
3 HIDROLASES	Reaccions d'hidròlisi
4 LIASES	Eliminació de grups per a formar dobles enllaços
5 ISOMERASES	Isomerització
6 LIGASES	Formació d'enllaços acoblada amb hidròlisi d'ATP.

²⁸ Un exemple en seria la *glucosa-6-fosfat-isomer-asa*, que és un enzim que catalitza la conversió (isomerització) de la glucosa-6-fosfat en fructosa-6-fosfat.

3_ELS ENZIMS EN LA RESTAURACIÓ

Per a parlar de les aplicacions dels enzims en el camp de la conservació restauració cal fer-se conscient d'alguns aspectes importants. Els enzims, en condicions naturals, actuen en un medi líquid, i generalment els substrats amb els que interactuen estan dissolts en aquest medi. Per contra, en els nostres tractaments generalment disposem de substrats sòlids, i en alguns casos la solució enzimàtica requereix de ser gelificada. Així doncs, emprem un sistema que acostuma a treballar en una fase homogènia en fases heterogènies (Cremonesi, 2002), i això en condiciona l'efectivitat.

Per altra banda, no totes les classes d'enzims participen de processos de conservació-restauració. Si tenim en compte la classificació general veurem que l'únic dels grups que ens és d'especial interès és el de les hidrolases (E.C.3.). Ara en veurem més detalladament les característiques.

3.1_LES HIDROLASES

Les hidrolases catalitzen tot tipus de reaccions d'hidròlisi, i les podem utilitzar per a retirar materials envellits que s'han tornat insolubles, o bé per a accelerar processos que sense l'enzim esdevindrien més llargs i costosos. Dins el grup de les hidrolases trobem tretze subclasses, cada una corresponent a la hidròlisi d'un tipus d'enllaç determinat. D'aquests tretze grups ens fixarem a partir d'ara en el primer (E.C. 3.1.), el segon (E.C.3.2.) i el quart (E.C.3.4.), que hidrolitzen respectivament els enllaços ester, els grups glicosil²⁹ i els enllaços peptídics.

En la [Figura 16](#) es mostren els enzims més utilitzats en conservació-restauració, especificant a quins grups pertanyen. La taula s'ha elaborat a partir d'una graella aportada per Cremonesi (Cremonesi, 2002), actualitzant-ne la nomenclatura mitjançant la base de dades *BRENDA-Enzyme database*³⁰.

²⁹ Els grups glicocils o glucocils són estructures amb caràcter de radical lliure, que s'obtenen quan s'elimina un grup OH- de la forma cíclica d'un monosacàrid.

³⁰ www.brenda-enzymes.org

Fig. 16: Taula on es mostren els principals enzims utilitzats en conservació-restauració.

E.C. 3.1 Hidrolitzen enllaços èster

E.C. 3.1.1 Hidrolitzen enllaços èster d'àcids carboxílics

3.1.1.1. Esterases

3.1.1.2. Aril Esterases (en èsters fenòlics)

3.1.1.3 Triacilglicerol lipases (en triglicèrids)

E.C. 3.2 Hidrolitzen grups glicosil

E.C. 3.2.1 Hidrolitzen enllaços glicosídics (entre monosacàrids)

3.2.1.1 α -amilases

3.2.1.2 β -amilases

3.2.1.3 Glucoamilases

3.2.1.4 Cel·lulases

3.2.1.11 Dextranases

E.C. 3.4 Hidrolitzen enllaços peptídics

E.C. 3.4.11 Aminopeptidases (hidrolitzen grups amina)

E.C. 3.4.13 Dipeptidases (reconeixen parelles concretes d'aminoàcids)

Altres peptidases utilitzades:

3.4.23.1 Pepsina

3.4.21.4 Tripsina

3.4.21.1 Quimotripsina

3.4.22.2 Papaïna

3.4.22.3 Ficina

3.4.22.32 Bromelaina

3.4.21.62 Subtilisina

3.4.24.3 Col·lagenasa

Així doncs, de tots els enzims existents, els que més ens han servit en tractaments de conservació-restauració són els que hidrolitzen els enllaços èster dels lípids, els que hidrolitzen els polisacàrids i els que hidrolitzen les proteïnes. I això es deu a que la majoria de materials orgànics que podem trobar als béns culturals estan compostos d'aquestes substàncies:

- **Lípids:** els podem trobar com a aglutinants de capes pictòriques, formen part de la composició de les pintures a l'oli, a l'encàustica o al tremp d'ou. Algunes ceres animals i vegetals s'han utilitzat també com a adhesius o com a recobriments de materials orgànics i inorgànics.
- **Polisacàrids:** presents a tots els derivats de la cel·lulosa, als suports de tela o de paper, en adhesius, en algunes gomes d'origen vegetal utilitzades com a aglutinants, en aprests de midó o en pastes de farina.
- **Proteïnes:** especialment les trobem en tremps a l'ou, en les coles animals utilitzades en les capes de preparació o tremps de cola, en superfícies de pintures murals arrencades i també en vernissos fets de clara d'ou o tècniques fotogràfiques com l'albúmina.

Convé considerar les obres com una superposició d'estrats que contenen varies d'aquestes substàncies, cada una de diferent naturalesa. La caracterització de cada material és imprescindible per a saber quins components es veuran alterats per l'acció enzimàtica i quins no, i per detectar la presència d'inhibidors. Si aquesta caracterització és acurada, el tractament enzimàtic suposarà un risc gairebé nul per l'obra (tenint en compte altres factors com el nivell d'humitat o el valor de pH, que sí que poden suposar un risc per alguns estrats), ja que l'alta especificitat de l'enzim no permetrà interaccions amb substrats de naturalesa diferent a la escollida.

Per a la correcta elecció de l'enzim es proposa valorar els següents paràmetres (Fig.17) :

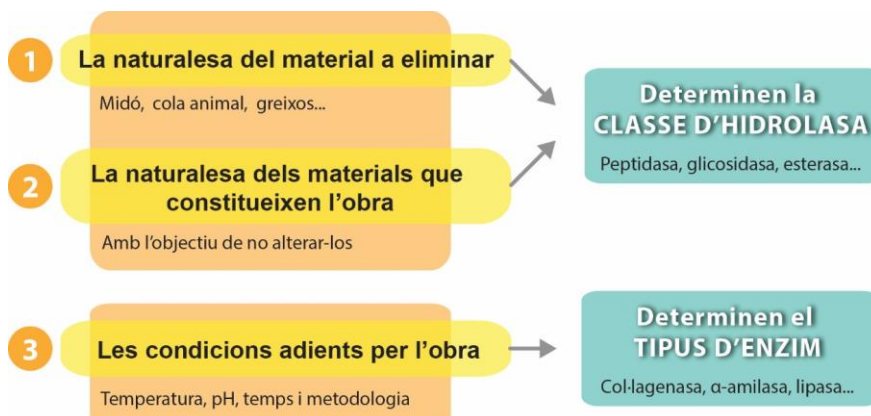


Fig 17:

Resum dels paràmetres a tenir en compte per a l'elecció d'un enzim.

[Imatge © Nina Viladrich, 2018, a partir de Cremonesi, 2002]

Tot seguit es resumeixen les característiques dels tres tipus d'enzims més utilitzats en tractaments d'eliminació de materials, per tal de tenir una idea de com actuen i quines són les seves aplicacions. Tot i això, abans de plantejar un tractament enzimàtic es recomana consultar acuradament les característiques dels enzims a escollir, ja que cada un actua de manera diferent (pH, temperatura, activadors enzimàtics...). A la base de dades online *BRENDA - Enzyme data base* es pot trobar tota la informació relativa a cada enzim en funció de l'espècie (animal, vegetal, bacteriana o fúngica) del qual s'ha extret³¹.

3.1.1 _ESTERASES O ENZIMS LIPOLÍTICS: LES TRIACILGLICEROL LIPASES

Els enzims lipolítics actuen hidrolitzant èsters simples, es a dir, compostos on hi ha el grup carboxil (-COO-) d'un èster, derivat de la condensació d'un àcid carboxílic i un alcohol. Generalment s'utilitzen les triacilglicerol lipases, comunament anomenades lipases, que hidrolitzen els enllaços èster dels triglicèrids³² alliberant glicerols, solubles en aigua (Fig 18). S'utilitzen principalment per a retirar olis secants: vernissos oleo-resinosos, veladures i repints, tot i que altres esterases han estat també eficaces en la eliminació de resines sintètiques acríliques (com el Paraloid® B-72) i viníliques (Cremonesi, 2002).

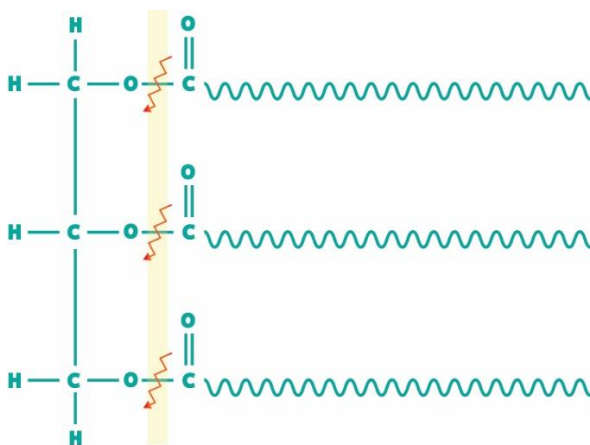


Fig. 18:

Representació d'un triglicèrid on es veu l'enllaç èster que trenquen les triacilglicerol lipases. Un cop hidrolitzats els tres enllaços obtindríem un glicerol (a l'esquerra) soluble en aigua, i tres àcids grassos lliures (a la dreta).

[Imatge © Nina Viladrich, 2018]

Les lipases³³ requereixen un medi neutre-alcàli (pH 7-9) per a actuar i una temperatura al voltant dels 37°. La temperatura és un factor molt important a tenir en compte, ja que per sota dels 37° la reacció esdevé molt lenta. Això es deu probablement a que l'enzim és hidròfil i el substrat lipòfil, i la seva interacció és de per sí costosa. Tot i això, tenen l'avantatge de tolerar en la dissolució alguns dissolvents orgànics.

³¹ Un mateix enzim pot ser sintetitzat per diversos organismes, i això afectarà a la temperatura òptima, el pH òptim i l'activitat específica.

³² Els triglicèrids són un tipus de lípids formats per una molècula de glicerol esterificada en els seus tres grups hidroxil, amb tres àcids grassos saturats o insaturats.

³³ La lipasa més utilitzada en restauració és la que prové del fong *candida cylindracea*.

Un altre factor a tenir en compte és la presència de ions de calci (Ca^{2+}) com a cofactors. Si els ions requerits no es troben al suport o en l'entorn del material a retirar (com per exemple en un morter de calç) s'ha de recordar afegir-los en forma de clorur càlcic a la preparació enzimàtica, en una proporció de 50-100mg/1g de lipasa. En cas que s'estigui tractant una policromia aglutinada amb lípids, és evident que l'acció enzimàtica de la lipasa pot afectar a l'aglutinant de la capa pictòrica. En aquest cas pot ser d'ajuda la presència de pigments inhibidors, però cal tenir en compte la proporció: si es tracta de veladures (molt lligant i poc pigment), l'acció de l'enzim ha de ser especialment controlada, mentre que si es tracta de colors més matèrics (molt pigment i poc lligant) aquests seran més resistents a l'acció de la lipasa. Tot i que l'acció enzimàtica suposa un menor risc d'alteració que els tractaments aquosos amb àcids i bases, en casos on el material a retirar sigui de la mateixa naturalesa que l'estrat immediatament inferior és més recomanable valorar altres sistemes de neteja, com la retirada mecànica de l'estrat.

L'acció de les lipases és especialment recomanable en casos on trobem repintades amb pintura a l'oli envellida sobre un estrat de vernís resinós o d'esmalt. Amb els sistemes tradicionals resulta difícil retirar l'estrat de pintura sense perjudicar la capa de vernís, ja que els paràmetres de solubilitat de l'oli envellit coincideixen amb els de les resines (Fig. 19)³⁴ (Vokić, & Berovič, 2012). En aquest cas, la selectivitat de les lipases ens pot ajudar a estovar la capa oliosa sense afectar a l'estrat inferior.

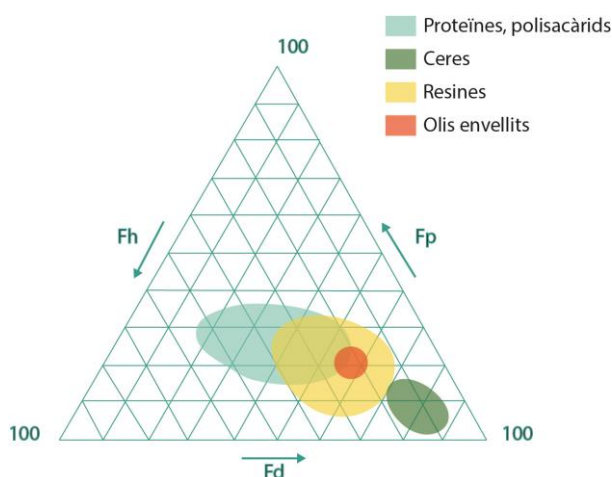


Fig. 19:

Representació del triangle de Teas, on es veuen els paràmetres de solubilitat d'alguns materials. L'oli envellit es troba clarament dins l'àrea de solubilitat de les resines.

[Imatge © Nina Viladrich, 2018]

³⁴ El triangle de solubilitats de Teas representa gràficament les principals interaccions moleculars involucrades en processos de solubilització (Eisner, Ossa & Benavente, 2005)

3.1.2_GLICOSIDASES: LES A-AMILASES

Les glicosidases són enzims que hidrolitzen polisacàrids en els enllaços èter (-COC-). Els més emprats són les amilases, especialment la α -amilasa, que actua sobre els enllaços 1,4-glicosídics de les cadenes de midó (Fig. 20).

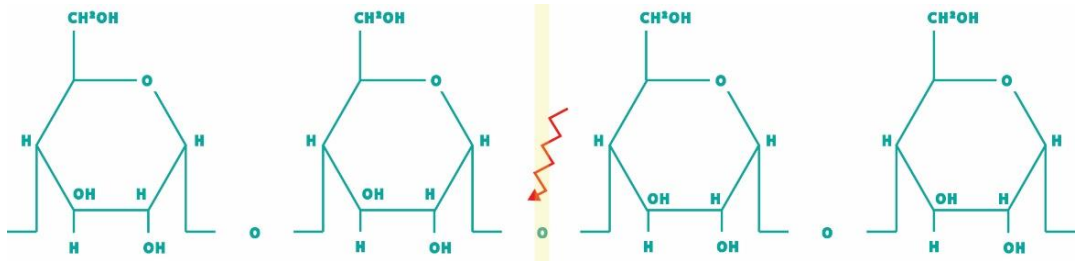


Fig. 20:

Representació d'una part d'una cadena de midó, on es veu l'enllaç 1,4 glicosídic hidrolitzat per l'enzim *alfa-amilasa*.

[imatge ©Nina Viladrich, 2018]

Les α -amilases³⁵ s'utilitzen especialment per a retirar restes de midó utilitzat com a aprest o com a adhesiu, sol o barrejat amb altres components com les coles proteiques. És habitual trobar aquests materials en documents o en pintures sobre tela, fruit d'intervencions al suport amb pasta de farina. En documents gràfics la pasta de farina i el midó s'han utilitzat com a adhesiu per a suports secundaris de paper o cartró (tals com àlbums), mentre que en pintura sobre tela acostuem a trobar-la en els reentelats.

Les α -amilases requereixen generalment un mitjà neutre per a la seva utilització (pH 6-7), i són més flexibles que les lipases pel que fa a la temperatura. Depenent de l'origen de l'enzim (animal, vegetal o microbiològic) tindran una o altra temperatura òptima (que es correspondrà amb la de l'organisme del qual s'ha extret l'enzim, variant entre els 30 i els 39°C), però de manera general actuaran amb bon rendiment a temperatura ambient.

També és necessària la presència de ions de clor i de calci com a cofactors, que s'hi poden afegir en forma de clorur càlcic a molt baixes proporcions que variaran en funció de l'organisme d'origen de l'enzim³⁶. Per altra banda, cal tenir en compte que a utilització d'algunes solucions tampó pot suposar un problema per a

³⁵ Generalment s'utilitzen les provinents del bacteri *bacillus sp.*

³⁶ Per exemple, les amilases derivades de *bacillus subtilis* necessiten 150 ppm (parts per milió) de Ca^{2+} , mentre que les derivades de *bacillus licheniformis* requereixen 5ppm de Ca^{2+} i ambdues requereixen també ions de sodi, cosa que no passa amb les amilases d'origen fúngic (Erickson, 1992).

l'efectivitat dels cofactors; els tampons fosfat salí precipiten els ions de calci, per la qual cosa es recomana utilitzar tampons acetat o altres en els tractaments amb amilases d'origen fúngic o bacterià (Erickson, 1992).

Tenint en compte que les amilases no afecten a altres polisacàrids presents a les gomes d'origen vegetal o la cel·lulosa³⁷, cal remarcar que generalment la seva utilització no suposa un risc per la resta d'estrats de l'obra.

3.1.3_PEPTIDASES

Dins del grup de les peptidases trobem molts enzims que s'han fet servir en tractaments de restauració per a hidrolitzar els aminoàcids (-CO-NH-). Podem utilitzar aminopeptidases, que hidrolitzen l'extrem bàsic de les proteïnes, carboxipeptidases, que n'hidrolitzen l'extrem àcid, o bé diverses endopeptidases, que hidrolitzen enllaços interns dividint la proteïna, i que són les més utilitzades (Fig. 21).

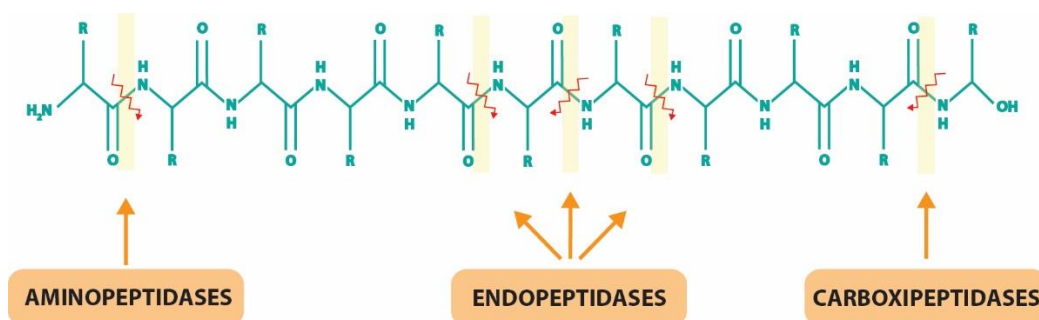


Fig. 21:

Representació de l'estructura d'una proteïna on s'observen els enllaços que hidrolitza cada tipus de peptidasa.

[Imatge © Nina Viladrich, 2018]

Les endopeptidases són moltes i diverses, i ens permeten ser selectius en pH del medi que volem utilitzar per a tractar l'obra. Per exemple la tripsina actua en medis alcalins (pH 7-8,4) i requereix de ions Ca^{2+} per a actuar correctament; la papaïna actua en medis neutres (pH 7,2) i requereix del coenzim cisteïna (un aminoàcid) per a actuar; la pepsina, en canvi, actua en medis àcids (pH 2-3) i no requereix

³⁷ Els enzims que actuen sobre la cel·lulosa són les cel·lulases (De Lera, 2011)

de cofactors, ja que és un enzim simple (no conjugat). Una de les endopeptidases més utilitzades és la col·lagenasa, que hidrolitza el col·lagen³⁸. Actua en un pH neutre (pH 6,3-7,5) i requereix de la presència de Ca²⁺ en solució.

Les peptidases generalment s'han utilitzat per a retirar restes de cola proteica després d'algunes intervencions de consolidació, o bé després de l'arrencament de pintures murals. També per a treure vernissos a base d'albúmina. No són eficaces per a retirar la caseïna si ha estat aplicada com a caseïnat càlcic, ni per a alguns tremps a l'ou (és un aglutinant ambigu, ja que té un alt contingut en greixos).

Abans d'utilitzar-les cal assegurar-se que els estrats inferiors no contenen tremps de cola o dauradures aglutinades amb cola animal, ja que podrien veure's afectats per la seva acció.

³⁸ La que s'utilitza en restauració prové del bacteri *clostridium histoliticum*.

Nina Viladrich Iglesias. Els enzims: estructura, funcionament i aplicacions en C-R
Treball Final de Grau, Grau en Conservació-Restauració de Béns Culturals, Facultat de Belles Arts,
Universitat de Barcelona, curs 2017-2018

4_METODOLOGIA I APLICACIÓ

En primer lloc es recomana valorar la solubilitat dels materials (Test de Cremonesi), per tal de determinar el grau de polaritat en el qual el material és eventualment soluble en dissolvents neutres (De Lera, 2011). Aquestes proves es fan de cara a un possible esbandit i/o inhibició amb dissolvents al final del tractament.

Cal que els enzims s'emmagatzemin a temperatures baixes, de 2 a 8°C, i que no s'obri l'envàs fins que no s'assoleixi la temperatura ambient (en cas contrari podrien absorbir humitat de l'aire i iniciar l'acció enzimàtica). Un cop s'ha pres la quantitat necessària³⁹ es tornarà l'enzim en pols a un ambient fred.

Pel que fa a la concentració de l'enzim en solució, generalment s'utilitzen quantitats de **100 a 200 mg d'enzim en pols/100ml d'aigua** pels que tenen una alta activitat específica, i de fins a **1g /100ml** pels que tenen una baixa activitat específica. Tot i això es recomana sempre utilitzar enzims amb activitats específiques superiors a 1000 U/mg, per tal de treballar a concentracions més baixes i minimitzar els residus a la superfície de l'obra. Per als tractaments en documents les proporcions d'enzim acostumen a ser més baixes (Cremonesi, 2002).

Per a la preparació es recomana escalfar lleugerament l'aigua (de 35 a 40°, no més) durant uns 20 minuts mantenint la temperatura, i remenar a poc a poc⁴⁰ amb un remenador que no sigui metàl·lic. Si fa falta es pot escalfar la superfície a tractar amb una làmpada incandescent de 50W, fins a una temperatura de 30 a 40°C.

4.1_TENSIOACTIUS

Si la capa pictòrica és hidròfuga, es poden afegir a les preparacions tensioactius **no iònics** per a millorar la penetrabilitat de la solució enzimàtica. Tant si utilitzem tensioactius líquids (Tween® 20), com sòlids (Brij® 35), és suficient una quantitat del 0,1% v/v o p/v. No convé sobrepassar aquesta quantitat, ja que els tensioactius poden inhibir l'activitat enzimàtica (Cremonesi, 2002).⁴¹

³⁹ En el moment de pesar els enzims cal prendre precaucions, ja que la pols enzimàtica pot suposar un risc per al restaurador si entra en contacte amb la pell i les mucoses. La resta de processos es consideren segurs.

⁴⁰ La formació d'espuma a la superfície és un indicador de que l'agitació és excessiva i s'estan desnaturant els enzims. En aquest cas caldrà repetir la mescla (De Lera, 2011).

⁴¹ En referència a l'ús de tensioactius, Richard Wolbers proposa evitar-ne l'ús en la mesura que sigui possible, ja que s'estan observant reaccions adverses fruit del seu envelliment (Wolbers, 2018)

4.2_GELS

En cas que la capa pictòrica o altres estrats de l'obra no tolerin l'acció abundant de l'aigua, els enzims poden aplicar-se en gels o en emulsions. Per a gelificar la solució podem utilitzar metilcel·luloses, hidroxipropilcel·luloses, agar-agar o goma xantana, en funció de les propietats que hagi de tenir el preparat enzimàtic. Com més viscos sigui el gel més es reduirà la mobilitat de l'enzim, per la qual cosa es pot augmentar lleugerament la proporció d'enzim. En el cas de l'agar-agar, que per la seva preparació requereix altes temperatures, cal afegir l'enzim quan la temperatura ha baixat per sota els 50°C i prèviament dissolt en una part de l'aigua total, a 40°C.

4.3_SOLUCIONS TAMPONADES

Totes les preparacions prèviament descrites poden realitzar-se amb aigua destil·lada o amb solucions tampó, sempre i quant els elements que utilitzem per a tamponar l'aigua no actuïn com a inhibidors. Aquesta informació específica per a cada enzim es pot trobar a la base de dades BRENDA, anteriorment mencionada. Cal tenir en compte que el pH del tampó ha de ser compatible amb el rang de pH de l'enzim.

4.4_ESBANDIT

En primer lloc retirarem les restes de la solució o gel enzimàtic amb un cotó sec, i posteriorment rentarem la superfície diverses vegades amb aigua destil·lada, mitjançant cotó humit. Alguns autors recomanen l'addició de petites quantitats de tensioactiu a l'aigua dels primers rentats (Cremonesi, 2002).

Un cop la superfície és seca, es pot valorar la opció de fer un últim rentat amb dissolvents orgànics neutres, per a assegurar la inhibició en cas que hagi quedat algun residu enzimàtic.

Si la concentració de l'enzim és molt baixa i s'han caracteritzat bé els materials de l'obra (assegurant que no hi ha estrats susceptibles de ser afectats per l'enzim utilitzat) en alguns casos es pot prescindir de l'esbandit. Això només és possible amb alguns enzims molt específics, ja que hi ha enzims que poden actuar en més d'un substrat.

4.5_ALTRES PRESENTACIONS DEL PRODUCTE

El més habitual és trobar els enzims en pols, en cases comercials especialitzades com Sigma- Aldrich®. Tot i això, actualment existeixen preparats en líquid o en compresa, que faciliten les labors d'aplicació dels enzims. L'elecció dependrà de les necessitats que tinguem en funció del tractament que volem aplicar. Comprar els enzims en pols garanteix que disposem de tota la informació del producte (l'activitat específica, l'organisme al qual pertany...), però requerirà d'una preparació més acurada pel que fa a l'adició de cofactors, control de les temperatures i el pH, etc. Si en canvi decidim comprar preparats enzimàtics llestos per l'ús ens trobarem que els fabricants no faciliten tota la informació de l'enzim, sinó només les condicions òptimes per a utilitzar el preparat en qüestió.

Resumint, si requerim d'un enzim molt específic i disposem de bons equipaments tècnics és aconsellable preparar els enzims nosaltres mateixos, però si en canvi el tractament a realitzar és bastant habitual i volem assegurar-nos resultats positius (que alhora repercutiran en un menor temps en la intervenció pel que fa al pressupost, tot i ser una mica més cars) és més recomanable comprar els productes preparats.

5_REVISIÓ DE CASOS PRÀCTICS

Per tal de tenir una idea clara de quines són les aplicacions dels enzims en l'àmbit de la restauració s'ha decidit fer una revisió de casos pràctics que han requerit aquest tipus de tractament.

La selecció s'ha elaborat tenint en compte la diversitat de suports sobre els que es poden utilitzar, ja que degut a la seva alta especificitat els enzims es converteixen en un tractament apte per a totes les especialitats. S'han escollit casos que exemplifiquin l'ús de cada un dels tipus d'enzims comentats amb anterioritat (lipases, glicosidases i peptidases), i alguns casos de caire més experimental.

Cada cas queda recollit en una fitxa, on s'hi especifiquen els materials constitutius de l'objecte tractat, les especificacions tècniques del tractament i algunes fotografies al respecte.

Eliminació d'una capa de pintura l'oli mitjançant un gel amb lipasa

Objecte: Marc arquitectònic de fusta policromada, S.XVII. **Restauradors:** Denis Vokić i Marin Berovič.
 Ubicat al retaule de l'altar lateral de l'església de San Jacob, illa de Čiovo (Croàcia).

Descripció del tractament

[Vokić & Berovič, 2012]

El marc ha estat repintat diverses vegades i presenta una capa final de pintura a l'oli, de color blau clar (Fig. 1). L'estrat inferior a l'oli presenta un marbrejat, l'aglutinant del qual és un vernís resinós. S'ha decidit recuperar l'estrat del marbrejat (Fig. 2), ja que la pintura original en estrats anteriors es troba en males condicions de conservació.

S'han fet diverses proves prèvies amb dissolvents orgànics i sistemes aquosos, que no han aconseguit solubilitzar prou la capa de pintura a l'oli (Fig. 4, B), o bé han afectat negativament a l'estrat inferior. Conseqüentment s'ha decidit provar amb un gel enzimàtic, que ha donat excel·lents resultats.

En aquest cas s'ha utilitzat una triglicèrid lipasa (E.C. 3.1.1.3) obtinguda del bacteri *Chromobacterium viscosum*, que té una activitat específica de 2000 a 8000 U/mg de proteïna. El seu pH òptim és de 7,7, que s'ha assolit tamponant l'aigua a aquest valor mitjançant el compost orgànic Tris (trometamol).

La solució enzimàtica s'ha aplicat a la superfície gelificada amb *Klucel G®* al 5%, a una concentració d'1g d'enzim/dl de gel, a través de paper japonès. El temps d'actuació ha estat de 15 a 20 min.

Observacions:

Tot i que s'ha provat d'augmentar la temperatura de la superfície fins als 37°C (temperatura òptima de l'enzim), aquest augment de la temperatura provoca un asseccament prematur del gel, per la qual cosa s'obtenen millors resultats a temperatura ambient (18°C i 55%HR).

Fotografies:

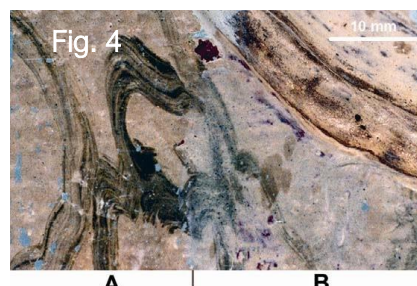
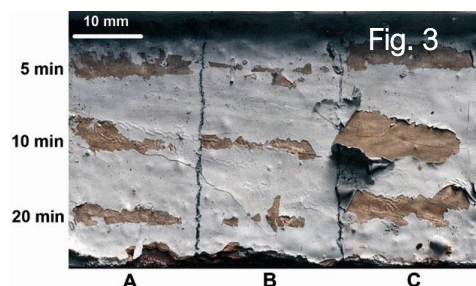


Fig. 1 i 2: Aspecte del marc abans i després del tractament.

Fig. 3: Proves amb sistemes aquosos. (A) Bisturi i gel tamponat a 7,7. (B) Bisturi en sec. (C) Bisturi i gel tamponat a 7,7 amb lipasa.

Fig. 4: Comparació entre l'efecte del gel enzimàtic (A) i la neteja amb dissolvents orgànics (B).

[Imatges ©Vokić & Berovič, 2012]



Eliminació d'un recobrint oleo-proteic d'una escultura de pedra

Objecte: Escultura de pedra policromada.

Restaurador: Paolo Cremonesi

Descripció del tractament

[Cremonesi, 2010]

L'escultura de pedra mostra un aspecte molt enfosquit a causa de l'envelliment de la capa superficial, composta per un recobrint a base d'oli de llinosa i cola animal. Aquesta capa de protecció va ser aplicada reiteradament, amb la intenció de refrescar els colors i protegir l'obra de les condicions atmosfèriques.

Amb els anys aquest recobrint s'ha reticulat i insolubilitzat. Mitjançant els sistemes tradicionals només es pot eliminar amb una solució concentrada d'amoniac, que deixa la superfície de l'obra emblanquinada i erosionada.

Per al seu tractament s'ha decidit utilitzar dos tipus d'enzims en seqüència: en primer lloc una triaglicerol lipasa d'origen bacterià, que actua en un rang de pH de 7 a 7,5, i en segon lloc una peptidasa d'origen bacterià que actua amb un pH òptim de 7. En ambdós casos la concentració enzimàtica ha estat de 0,5 a 1 g d'enzim per 100 ml d'aigua tamponada amb fosfat salí.

La solucions enzimàtiques líquides s'han aplicat per mitjà de compreses (tissús de cel·lulosa) en contacte directe amb l'obra, escalfant la superfície a 35°C. El temps d'actuació ha estat de 15 a 20 minuts (Fig. 1).

Observacions:

Per a esbandir la superfície s'ha utilitzat una preparació enzimàtica de mucina (una glicosidasa, E.C.3.2.1.97) dissolta en aigua destil·lada a una concentració molt baixa (0,1g d'enzim per 100 ml d'aigua) i a una temperatura de 37°C.

Aquesta preparació és coneguda com a **Saliva Sintètica**, i s'utilitza freqüentment com a detergent.

Fotografies:



Fig. 1 :

Aspecte de l'escultura durant el tractament. A la part dreta es poden veure zones ja tractades, mentre que a la part esquerra s'observa l'estat de deteriorament del recobrint oleo-resinós.

També s'exemplifica l'aplicació de la solució enzimàtica per mitjà de compreses.

[Imatge ©Cremonesi, 2010]

Eliminació de pasta de farina del revers de dos tapissos coptes

Objecte: Tapissos d'origen copte, Akhmim (Egipte), propietat del Victoria & Albert Museum.

Restauradora: Florence Whaap

Descripció del tractament

[Whaap, F., 2007]

Els tapissos estan compostos de fibres de llana i de lli tenyides de diversos colors. Les fibres es troben lleugerament oxidades, brutes i desfilades, tot i que els tints es mantenen en bon estat de conservació. Les peces havien estat adherides a un suport de cartró pintat, mitjançant pasta de farina. El suport es va retirar mecànicament, però queden nombroses restes de pasta de farina al revers dels tapissos (*Fig. 1*).

Les proves amb sistemes aquosos per a solubilitzar la pasta de farina no han donat resultats positius, ja que per a solubilitzar l'adhesiu fan falta més de 24 hores de contacte amb l'aigua. El mal estat de conservació de les fibres dels tapissos no permet una exposició tant prolongada.

S'ha decidit provar l'acció enzimàtica de la compresa Alberina-Kompresse®, un producte comercial que conté una làmina de polipropilè amb enzims α -amilasa de l'espècie *Bacillus*, dispersos en un gel de metilcel·lulosa. La compresa alhora conté els cofactors necessaris per a la seva utilització. El sistema no incorpora tampons de pH, però en aquest cas el pH de la tela proporciona el valor adequat per a la reacció. Mitjançant la compresa d'amilasa s'ha aconseguit reduir el temps d'humectació de la pasta de farina de 24 hores a 20-30 minuts (*Fig. 2*). Un cop passat aquest temps l'adhesiu superficial es pot retirar fàcilment amb un hisop humit.

L'esbandit s'ha realitzat amb aigua, incorporant una petita quantitat del tensioactiu no iònic Dehypon® LS 45 CC. El mateix producte ha estat utilitzat per a la neteja general dels tapissos.

Observacions:

Tot i que s'han pogut retirar les restes més superficials de la pasta de farina n'han quedat residus entre les fibres. Es va proposar repetir el tractament per a una major penetració, però es va desestimar degut a la presència del cofactor Ca^{2+} (present a la preparació enzimàtica de la compresa), que podria afectar a altres elements dels tapissos.

Fotografies:



Fig. 1: Restes de pasta de farina i cartró al revers d'una de les obres.

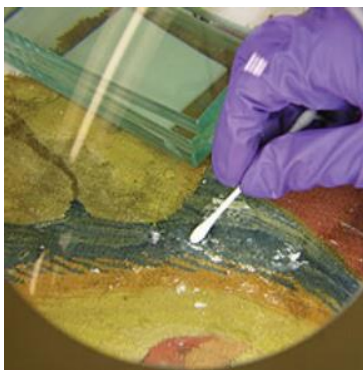


Fig. 2: Retirada de la pasta després del tractament amb α -amilasa.



Fig. 3: Fragment d'un dels tapissos un cop acabada la restauració.

[imatges ©Whaap, F., 2007]

Eliminació de la cola proteica d'una pintura mural al fresc arrencada

Objecte: Pintura mural al fresc arrencada. “*Conversione di S. Efsio e battaglia*” de Spinello Aretino, S. XIV. Cementiri de Pisa (Itàlia).

Restauradors: G. Ranalli, C. Baracchini, G. Caponi, P. Pacini, E. Zanardini, C. Belli i C. Sorlini.

Descripció del tractament

[Ranalli, G et al., 2004]

El fresc portava engassat des de l'última intervenció (1960), el que ha provocat una rigidització de la cola animal utilitzada per a engassar i protegir la superfície. Un cop retirada la gasa de la capa pictòrica mitjançant un tractament amb bacteries, la pintura presenta encara nombroses restes de cola proteica en superfície, distribuïdes de manera heterogènia. Com ja s'ha comentat, el material està molt envellit i la seva solubilitat és molt baixa.

S'ha utilitzat una proteasa de tipus XIX (E.C.3.4.11.1⁴²), extreta del fong *Aspergillus sojae*, que actua en un pH òptim de 8,4, apte per a la pintura al fresc. L'enzim s'ha dissolt en aigua tamponada mitjançant el compost orgànic Tris (trometamol) a pH 8,2, i la concentració és d'1g d'enzim per 100 ml de solució.

S'ha aplicat la solució a pinzell, prèviament escalfada a 38°C, amb un temps d'acció d'uns 10 minuts. L'aplicació s'ha repetit de 2 a 5 vegades, en funció de la zona a tractar. Un cop solubilitzada la cola s'han retirat els residus mecànicament. L'esbandit final s'ha realitzat amb aigua destil·lada.

Observacions:

Per a retirar la gasa que cobria les pintures, que presenta més estabilitat a l'acció de l'aigua, s'ha realitzat un tractament amb bacteries *Pseudomonas stutzeri A29*. El tractament amb bacteries suposa una exposició a la humitat de com a mínim 10 hores, i no és apte per al contacte directe amb la capa pictòrica.

Per a escollir els enzims adequats per a retirar els residus de cola restants s'han provat diverses peptidases. Les que han donat millors resultats han estat la col·lagenasa tipus IA (E.C.3.4.24.3) i la proteasa tipus XIX (E.C.3.4.11.1). El factor que ha decantat la decisió final ha estat el pressupost, ja que la col·lagenasa té un cost molt més elevat.

Fotografies:



Fig. 1



Fig. 2

Fig. 1 i 2: A dalt fragment de l'obra abans del tractament enzimàtic. A baix mateix fragment després del tractament.

Fig. 3: Retirada de la gasa després de 10 hores de tractament amb bacteries.

[Imatges ©Ranalli, G et al., 2004]



Fig.3

⁴² L'enzim *proteasa tipus XIX* no consta a la base de dades actual degut als canvis en la nomenclatura, però s'ha deduït que el seu equivalent és l'enzim *leucyl aminopeptidase* (E.C.3.4.11.1), per coincidència amb els paràmetres d'actuació i l'organisme d'origen.

Mètode experimental per a regenerar fibres de cel·lulosa

Objecte: Mostres de paper *Claire-Fontaine* i Extra *Strong*, envellides artificialment, i mostres de paper amb 50 anys d'envelliment natural.

Restauradors: Alicia de Lera Santín, M^a Teresa Escohotado, Loïc J. Blum i Christophe Marquette.

Descripció del tractament

[De Lera et al., 2009]

El principal problema per a mantenir la integritat mecànica del paper és la hidròlisi àcida, que provoca la segmentació de les cadenes de cel·lulosa. L'objectiu d'aquest estudi ha estat trobar un mètode per a consolidar el paper que no requereixi l'addició de productes consolidants entre les fibres, com la metilcel·lulosa, o bé que pugui impedir en alguns casos la laminació total de papers molt degradats. Es pretén retornar l'estabilitat mecànica al paper original.

El mètode consisteix en la regeneració de les fibres de cel·lulosa mitjançant un enzim hidrolític, la cel·lulasa (E.C.3.2.1.4), extreta del fong *Trichoderma viride*. Aquest enzim pot actuar re-sintetitzant la cel·lulosa quan hi ha la presència d'un substrat específic (β -cellobiosyl fluoride, un polímer d'origen sintètic).

La solució enzimàtica conté:

- 400 μ l d'acetonitril (un dissolvent polar apròtic miscible en aigua)
- 100 μ l de solució tampó acetat (0,05M) a pH 5,5
- 0,25 mg/ml de cel·lulasa
- 5 mM de β -cellobiosyl fluoride (substrat)

Per a la seva aplicació s'ha emprat un gel d'agar-agar a l'1% en tampó acetat (la solució enzimàtica s'afegeix a la mescla quan l'agar baixa dels 35°C). El gel es diposita a la superfície del paper interposant un reemay® i es deixa actuar durant dues hores. Posteriorment s'esbandeix mitjançant paper secant humitejat amb una mescla del tampó acetat i el dissolvent (1:4), durant 10 min. Per a inhibir possibles restes de l'enzim s'ha aplicat una solució aigua-etanol (1%) durant 5 min.

Observacions:

El mètode encara no ha estat provat amb papers que continguin tintes o pigments en superfície, però els resultats de les proves de resistència mecànica obtinguts fins al moment són molt positius.

Fotografies:

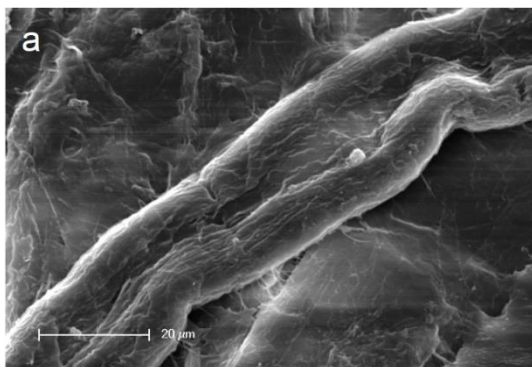


Fig. 1 : Aspecte de les fibres d'un paper envellit naturalment durant 50 anys. Microscopi electrònic (SEM).

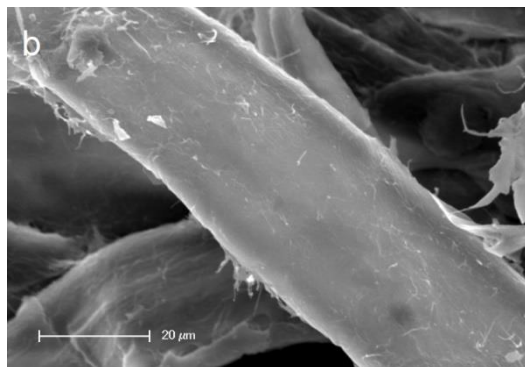


Fig. 2 : Aspecte de les fibres del mateix paper després del tractament. Microscopi electrònic (SEM).

[Imatges ©De Lera et al., 2009]

Eliminació de Paraloid® B-72 mitjançant lipases

Objectes: Tremp d'ou sobre taula "*Visitazione con San Giuseppe, San Zaccaria e quattro angeli*", S.XV.
 Oli sobre tela "*Ritratto d'uomo*", S.XIX.

Restauradors: Roberto Bellucci, Paolo Cremonesi i Ginevra Pignagnoli.

Descripció del tractament

[Bellucci et al. 1999]

Ambdues peces mostren la presència en superfície de la resina acrílica Paraloid® B-72, aplicada al 6% en acetona (segons documentació existent).

En el cas del tremp sobre taula la resina va ser aplicada a principis dels anys 70 a la vora d'una fissura, i la seva solubilitat és pràcticament nul·la. En el cas de la pintura l'oli, el Paraloid està aplicat en un paper d'arròs que cobreix la superfície pictòrica des de fa 12 anys (Fig. 2). És parcialment soluble en acetona, però la seva utilització dissol part de la capa pictòrica. Les proves per a retirar l'empaperat amb toluè, tot i dissoldre parcialment la resina, deixen un aspecte heterogeni i nombroses restes de resina a la capa pictòrica.

En ambdós casos s'ha utilitzat una triglicèrol lipasa (E.C. 3.1.1.3) obtinguda del fong *Candida cylindracea*, que té una activitat específica de 700 a 1500 U/mg. La concentració d'enzim en solució és de 0,8 g/100ml, i s'utilitza un tampó tipus Tris per a mantenir el pH a un valor de 8. La mescla es manté constantment a una temperatura de 39°C.

L'aplicació s'efectua gelificant la solució amb Klucel G® al 3,5%, i pre-escalfant la superfície a 30°C. El temps de l'aplicació sobre el **tremp d'ou** és de 3 a 5 minuts, i en alguns casos és necessari repetir el tractament per a solubilitzar millor la resina; l'esbandit es realitza amb saliva sintètica. En el cas de la **pintura a l'oli** el gel s'aplica durant 3 minuts sobre l'empaperat pre-escalfat a 30°C. Quan s'infla la pel·lícula de Paraloid® es retira el gel de la superfície i s'esbandeix amb saliva sintètica; es retiren la resina i el paper mecànicament interposant una espàtula, sense trencar l'empaperat, per tal de que la lipasa no afecti a la capa pictòrica, de naturalesa grassa.

Observacions:

La pintura sobre taula s'ha tractat amb lipases per a retirar altres materials de la superfície (ceres, repints, capes olioses...); inesperadament ha tingut resultats positius sobre el Paraloid®. Aquests resultats han servit de precedent per a la retirada de l'empaperat de la segona obra, i per a moltes altres intervencions i estudis en aquesta direcció.

El Paraloid® és un èster acrílic (un copolímer de metilacrilat i etilmetilacrilat), i per tant és sensible a l'acció de les esterases. Les triglicèrol lipases, com a esterases, poden hidrolitzar els grups metil i etil de l'èster, produint un polímer similar als àcids poliacrílics, que presenten més capacitat d'interacció amb l'aigua tot i no ser absolutament hidrosolubles.

Fotografies:



Fig. 1 : Fragment de la pintura sobre taula durant el tractament. La mà de l'esquerra ha estat tractada amb lipasa, mentre que la de la dreta no.

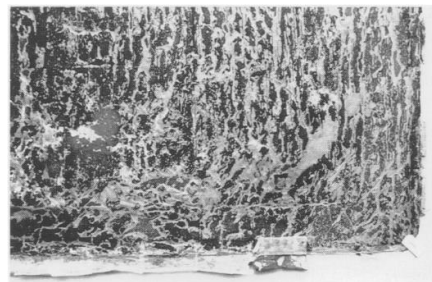


Fig. 2 : Aspecte de l'anvers de la pintura a l'oli del s. XIX, durant el tractament enzimàtic per a retirada de l'empaperat de protecció.

[Imatges © Bellucci et al. 1999]

6_DISSENY EXPERIMENTAL PER A PROVES AMB ENZIMS

Les proves que es duren a terme pretenen comprovar l'eficàcia de l'enzim alfa-amilasa en la hidròlisis del midó de la pasta de farina utilitzada per a reentelar pintura sobre tela. L'estudi està enfocat a aplicar aquest sistema per a retirar un engrut (cola proteica i midó de blat, segons resultats de l'anàlisi mitjançant espectrometria d'infraroig per transformada de fourier [μ FT-IR]⁴³) del revers del quadre "L'últim sopar" (Fig. 22 i 23). Es tracta d'una pintura a l'oli del S. XVIII-XIX, intervinguda al Taller de Conservació i Restauració de la Facultat de Belles Arts de la Universitat de Barcelona (*Memòria de conservació-restauració 737_12*), de la qual s'ha eliminat la tela d'un reentelat antic. La retirada de la tela s'ha realitzat mecànicament en sec, però queden nombroses restes de pasta de farina al revers (Fig. 24).



Fig. 22: Aspecte de l'anvers de l'obra abans del tractament.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2017]



Fig. 23: Aspecte del revers de l'obra abans del tractament.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2017]



Fig. 24: Aspecte de l'obra durant el procés d'eliminació de la tela de reentelat.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2017]

⁴³ Proves realitzades per Ricardo Suárez, CRBMC. 19 d'abril de 2018.

Aquest quadre presenta una alta sensibilitat als tractaments aquosos, degut a la fragilitat de la capa pictòrica, que en alguns punts deixa la capa de preparació a la vista i n'augmenta la disgregació. Per tal de reduir els moviments i tensions en la tela, i per a no agreujar el deteriorament dels materials constituents, es planteja un tractament amb la mínima aportació d'humiditat al suport. Tot i que la pasta de farina del revers sembla solubilitzar-se lleugerament mitjançant un gel d'agar aplicat en calent (veure annex 1, proves 2/3), el tractament deixa nombroses restes de pasta de farina i gel adherides entre les fibres de la tela, que requereixen una acció mecànica molt agressiva per a ser retirades. Això afecta a les fibres de cànem de la tela original, lleugerament oxidades i acidificades; la mitjana de pH del suport original és de 4,83⁴⁴ (Fig. 25). Aquesta acidesa podria venir induïda per alguns components de la pròpia pasta, com el vinagre o l'alum de roca (Oriola, 2013), tot i que no se'n ha confirmat la presència. Altres tractaments aquosos a temperatura ambient no han resultat efectius en la solubilització de la pasta.

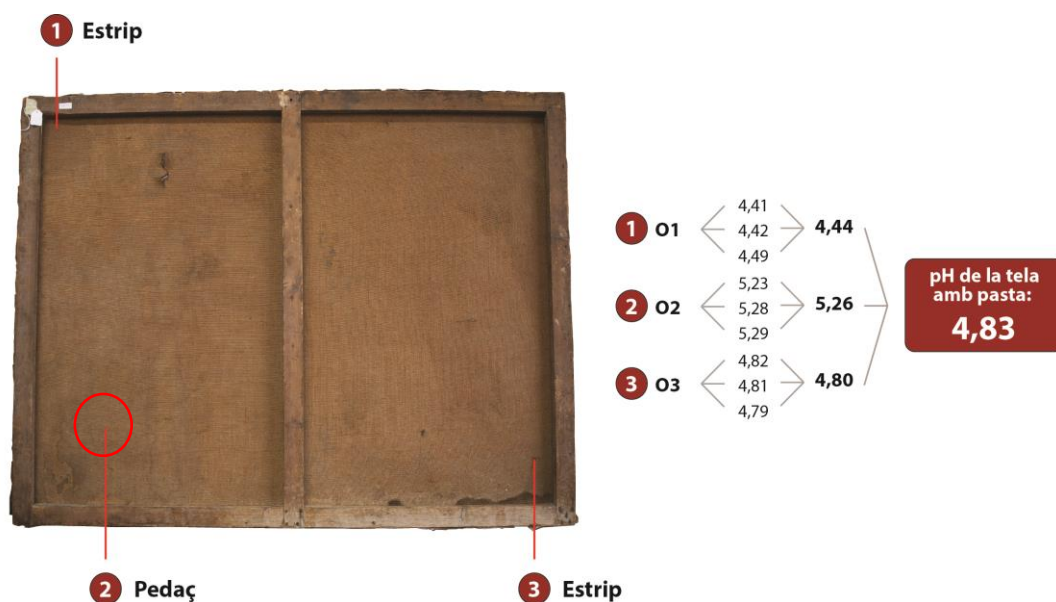


Fig. 25: Localització de la presa de mostres per a l'anàlisi del grau de pH. S'observa que a la zona amb la presència d'un pedaç (contingut entre les dues teles) el pH puja lleugerament, probablement degut a les característiques de l'adhesiu emprat per a la fixació del propi pedaç, de composició desconeguda.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

⁴⁴ Per a la presa del valor de pH s'ha utilitzat un mesurador *Waterproof Meter IQ160*. S'ha mesurat el valor de 3 mostres de fil d'uns 3 mm de llargada (aprox. 250-350 µg), que han reposat durant 24 hores en un vial amb 100 µl d'aigua destil·lada. De cada mostra s'ha realitzat la mitjana de tres lectures. La mitjana de les tres mostres determina el pH aproximat de la globalitat de la tela.

6.1_DESCRIPCIÓ DE LA METODOLOGIA UTILITZADA

Per tal de provar el mètode d'eliminació de l'engrut sense posar en risc l'obra original es provarà el sistema enzimàtic en dos contextos diferents: en primer lloc es realitzaran unes **proves prèvies** sobre portaobjectes, per tal de poder observar al microscopi els efectes de l'amilasa en els glòbuls de midó; en segon lloc es provarà el mètode en **mostres de tela de lli natural**, que contenen pasta de farina assecada durant un any⁴⁵.

Aquestes proves permetran valorar si el tractament pot ser apte per a l'obra esmentada, i complementaran les proves amb sistemes aquosos realitzades anteriorment. En cas que en un futur es vulgui dur a terme la intervenció, però, cal remarcar que seran necessàries noves proves sobre el suport original.

La pasta de farina utilitzada en aquest assaig respon a la recepta més bàsica, utilitzada per l' *School of Conservation* de Dinamarca (Oriola, 2016):

- 75 g de farina de blat d'ús alimentari
- 30 g de cola de conill, hidratada en 270 ml. d'aigua

S'ha escollit aquesta recepta perquè no incorpora altres additius⁴⁶ (alum de roca⁴⁷, mel, fel de bou, conservants...), i això facilitarà una millor avaluació dels efectes del pH, la temperatura i el temps d'actuació de l'enzim, sense haver de tenir en compte la possible inhibició per part d'additius no controlats⁴⁸.

Per a l'obtenció de l' α -amilasa s'ha decidit emprar un producte comercial ja preparat, que ha estat dissenyat per a la separació de papers encolats amb pasta de farina.

⁴⁵ Reentelat realitzat durant l'assignatura *Tractaments 5* del curs 2016-17, (Grau en conservació-restauració de Béns Culturals, Universitat de Barcelona) impartida per Marta Oriola.

⁴⁶ Altres receptes de pasta de farina tradicionalment utilitzades incorporen altres ingredients, que varien en funció de la zona i les costums de l'època.

⁴⁷ Sulfat doble d'alumini i de potassi.

⁴⁸ Tot i aquestes mesures, el producte emprat tolera la presència d'alum i de cola animal (segons el fabricant).

6.2_DESCRIPCIÓ DEL PRODUCTE UTILITZAT

Albertina-Kompresse® de la casa comercial *Klug Conservation*

Es tracta d'una compresa de polipropilè⁴⁹ perforada, que conté una mescla d'enzims α -amilasa extrets de bacteris de l'espècie *bacillus*. Incorpora additius (entre ells els cofactors necessaris per a la reacció) i partícules en pols de metilcel·lulosa⁵⁰. El producte es ven en sec i cal hidratar-lo per a l'activació dels enzims i la formació del gel. La compresa no incorpora cap amortidor de pH, que en cas de ser necessari caldrà afegir a l'aigua del tractament.

Alguns dels materials necessaris per a la correcta utilització de la compresa venen inclosos en el paquet de compra. S'hi adjunten dues fulles de paper de seda per a utilitzar com a estrat intermig entre la compresa i la superfície a tractar⁵¹, així com un cartró secant per a humectar la preparació⁵². Altres materials més habituals d'utilitzar, com el film de tereftalat de polietilè (Melinex®) i els pesos, no s'incorporen al paquet. El producte es ven en dues mides, la compresa de 20 x 30 cm i la compresa de 29 x 39 cm. A Espanya les comercialitza la casa *Productos de Conservación*, amb seu a Madrid⁵³.

6.2.1_ESPECIFICACIONS TÈCNIQUES

La compresa deixa un residu molt baix d'enzims a la superfície, per la qual cosa els tractaments realitzats no requereixen esbandit. Per a mesurar la quantitat de components de la compresa que queden a la superfície, Ingrid Schwarz (desenvolupadora del prototip de la compresa) va fer proves sobre plaques de coure de 3cm² (150g/m²). Va comprovar que el residu d'enzim va des de 2,3 µg a 7,6 µg, mentre que els residus d'alguns components auxiliars (agents humectants no especificats) van des de 4,6 a 6,8 µg.

També es van realitzar proves d'envelliment artificial (de temperatura [ISO 9706], d'incidència lumínica [xenotest] i fluctuacions d'humitat [a 90°, amb cicles del 35% al 80% d'Humitat Relativa]). Aquestes proves corroboren la poca quantitat de residus en les mostres, ja que amb un major residu les mostres agafen una coloració groc-marronosa durant els processos d'envelliment accelerat. (Schwarz, 2000).

⁴⁹ Un teixit-no-teixit, absorbent i químicament inert (Schwarz, 2000).

⁵⁰ El fabricant no proporciona informació més concreta sobre els components de la compresa, ja que la recepta del gel d' α -amilasa es basa en una recepta prèviament patentada (Schwarz, 2000).

⁵¹ Impedeix el pas de l'agent gelificant a l'obra, però permet el pas de la humitat i els enzims.

⁵² Es dedueix que tant el paper de seda com el cartró humectant no porten reserva alcalina, però se'n desconeix la composició.

⁵³ Actualment la petita té un preu de 105'94€, i la gran de 174'85€.

6.2.2_RECOMANACIONS D'ÚS SEGONS EL FABRICANT

- Es recomana utilitzar film de polièster, tant per a impermeabilitzar la superfície de treball com per cobrir la compresa durant el temps d'actuació. L'objectiu és evitar l'asseccament prematur del cartró humectant.
- El pes recomanat pel fabricant és de 150 a 200g/10cm² de compresa.
- El paper de seda separador ha de ser com a mínim 2mm per banda més gran que la compresa.
- Es recomana afegir un 5% d'etanol a l'aigua per a disminuir la tensió superficial i millorar la penetrabilitat de la solució enzimàtica, així com per evitar la formació d'aurèoles. Superar aquesta quantitat podria tenir efectes inhibidors. La quantitat de solució mínima és de 0,08 ml de solució per a cada 4cm² de cartró humectant.
- El temps mínim de tractament és de 15-30 minuts, tot i que el temps varia en funció de la quantitat d'aigua aportada, la temperatura i els gruixos dels materials a tractar.

6.3 ESTRATS DE L'APLICACIÓ

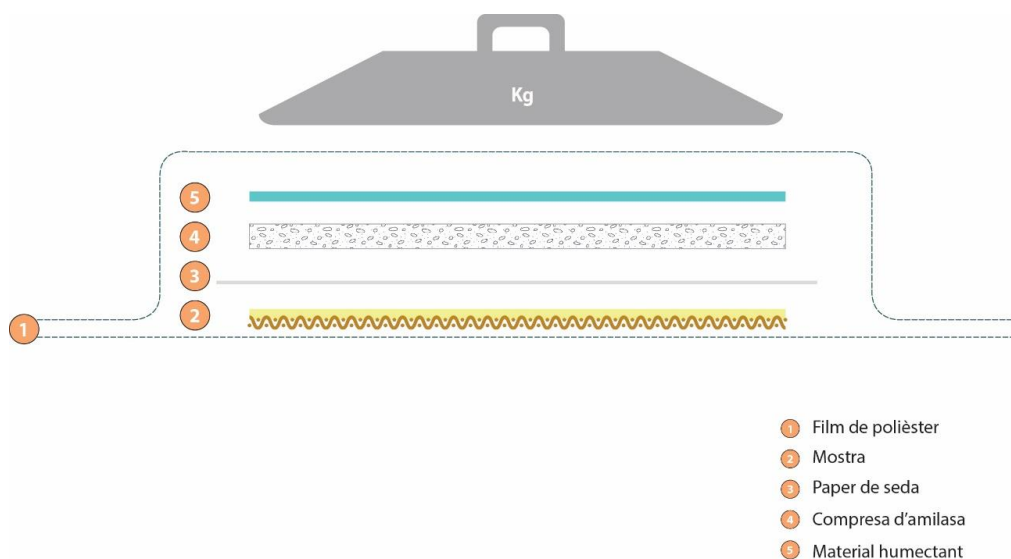


Fig. 26: Representació dels materials en l'ordre correcte de disposició.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018, a partir de ©Klug-conservation, 2017]

6.4_PROVES PRÈVIES

Observació dels efectes de l'enzim en la morfologia del midó de la pasta de farina

S'han observat els canvis morfològics dels grans de midó de blat sota els efectes de tres variables: la temperatura, el pH i el temps de tractament enzimàtic.

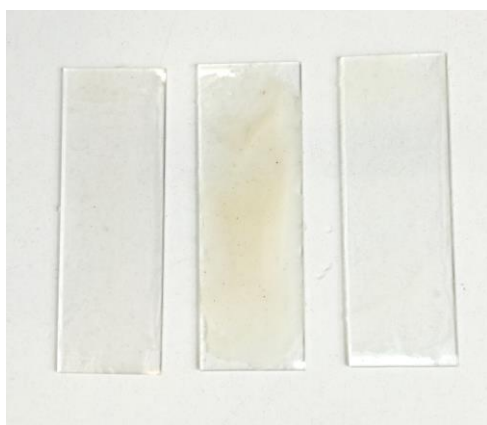


Fig. 27: Aspecte d'alguns dels portaobjectes amb la pasta de farina.

[imatge ©Nina Viladrich, 2018]

Per a la preparació de les mostres s'han impregnat portaobjectes amb pasta de farina (preparada segons recepta descrita anteriorment) amb un gruix de pasta de 0,2 mm (exceptuant la mostra **P2**, en la que s'ha doblat el gruix de pasta per a avaluar la capacitat de la solució per a penetrar en gruixos majors) (Fig. 27). També s'han impregnat dos portaobjectes amb els components de la pasta per separat (farina de blat dispersa en aigua i deixada assecat / cola de conill al 10%) per tal de poder caracteritzar els materials.

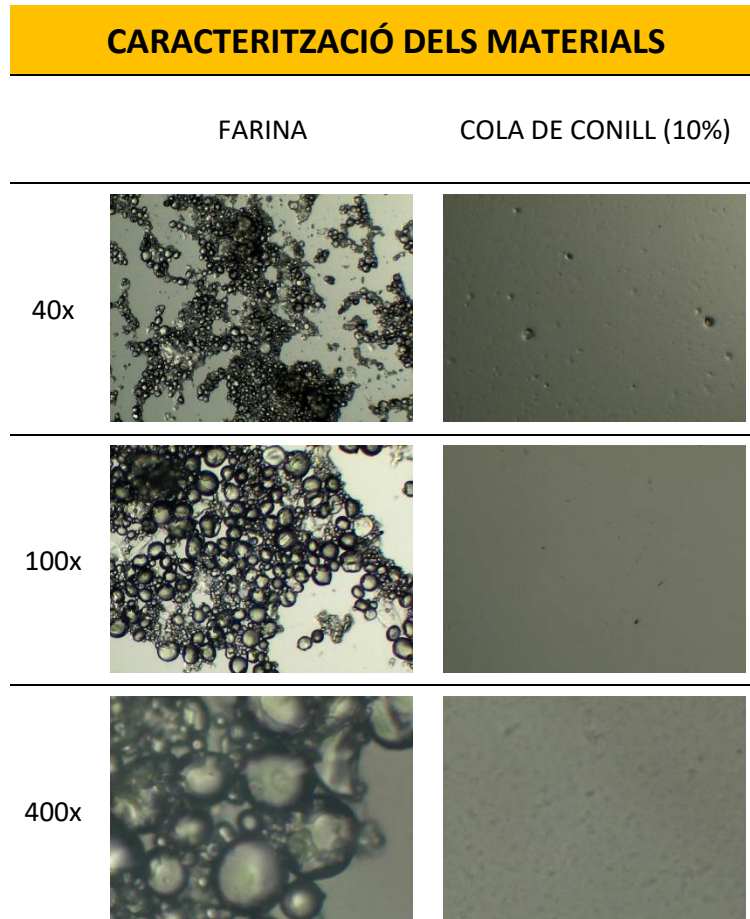
Les mostres s'han sotmès al tractament d'amilasa mitjançant *Albertina-Kompresse*®, variant cada un dels tres paràmetres. En tots els casos el pes aplicat sobre les mostres ha estat de 70g/4cm², i la quantitat d'aigua aportada al cartró absorbent ha estat de 0,8 ml. Durant el procés s'han cobert les mostres amb Melinex® per a evitar l'evaporació de l'aigua. La solució tampó utilitzada s'ha preparat a partir de bicarbonat sòdic (0,22g/100ml), amb addició d'àcid clorhídric (1M) per a establir un pH de 7. Per a l'escalfor ambiental s'ha utilitzat un forn d'assecatge Heraeus®.

Un cop finalitzat el tractament s'han observat els canvis morfològics del midó a 40x, 100x i 400x augments⁵⁴. També s'ha valorat subjectivament la resistència mecànica⁵⁵ de la pasta de farina després de la hidròlisi del midó, per saber quina importància té la farina (en contraposició amb la cola de conill, els components de la qual no s'hidrolitzen) en el poder adherent d'aquestes pastes.

⁵⁴ Microscopi Kyowa Medilux-20 (4x, 10x, 40x), amb càmera ocular digital Optika 4083.B0.5. (10x).

⁵⁵ Resistència a les ratllades mitjançant bisturí.

6.4.1_RESULTATS DE LES PROVES PRÈVIES

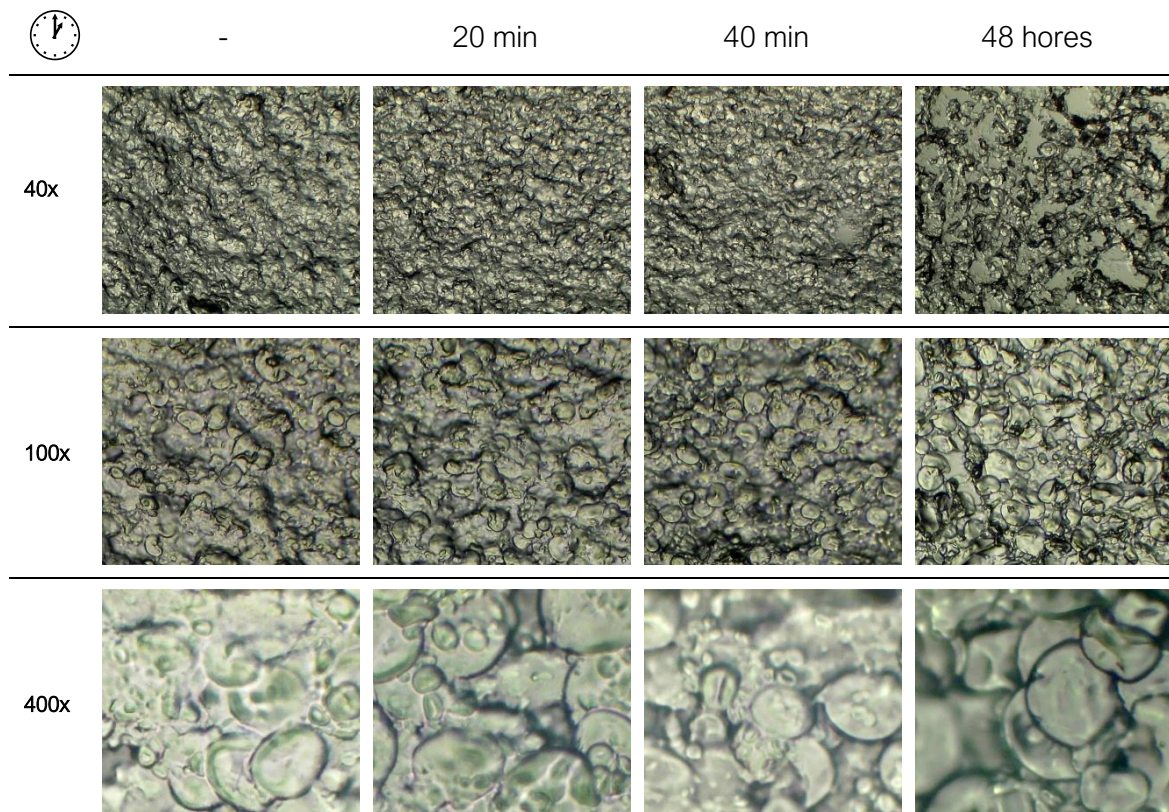


OBSERVACIONS:

Es comprova que el midó té una morfologia globular molt definida amb grans de mida variable, mentre que la cola de conill es mostra com una fase homogènia d'estructura pràcticament imperceptible a aquests augments.

MOSTRA DE CONTROL

Aigua destil·lada aplicada mitjançant paper secant, a través de Holytex®



OBSERVACIONS:

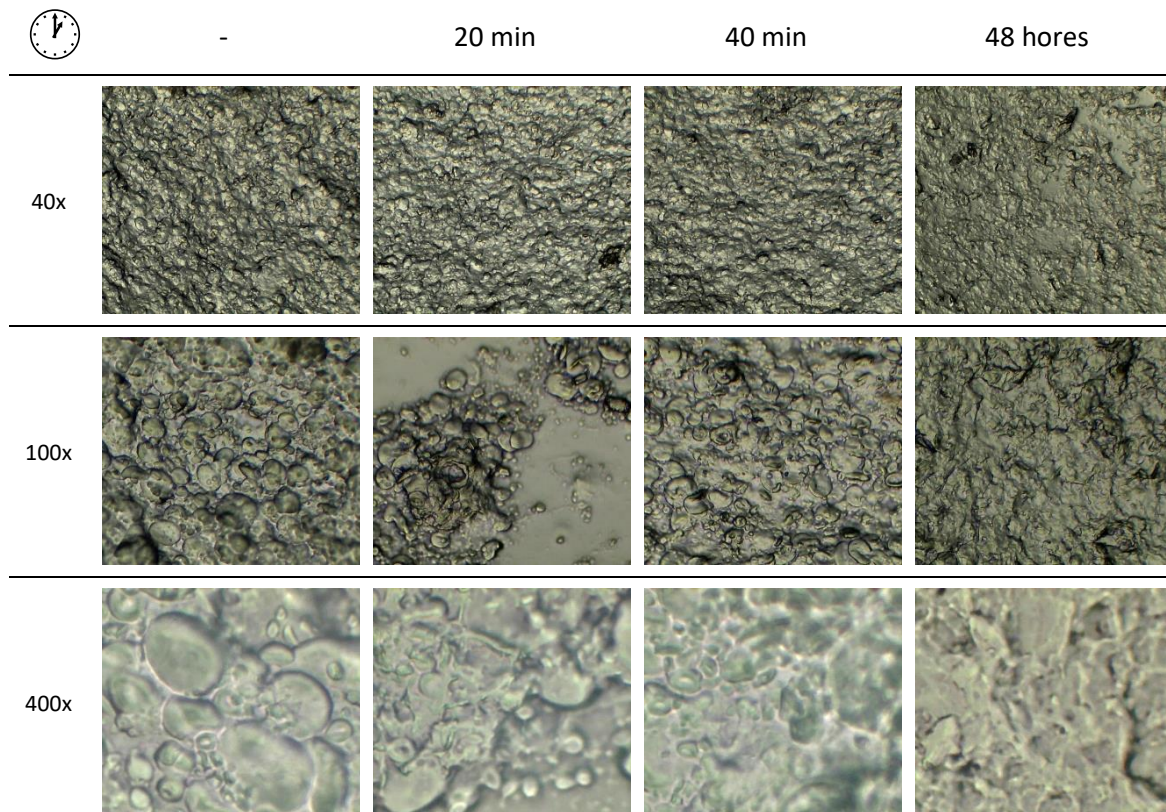
En la mostra de control s'ha aplicat un tractament que simula les característiques del tractament amb Albertina Kompress®[®], però sense l'adició de l'enzim. Per a la simulació s'han aplicat 0,8 ml d'aigua destil·lada en un paper secant, que ha humectat la superfície a través d'un teixit-no-teixit de polièster.

No s'observen canvis en la morfologia globular del midó ni a 20 min, ni a 40 min, ni a 48 hores de tractament.

P1

Pasta de farina **0,2 mm** de gruix + Albertina Kompresse®

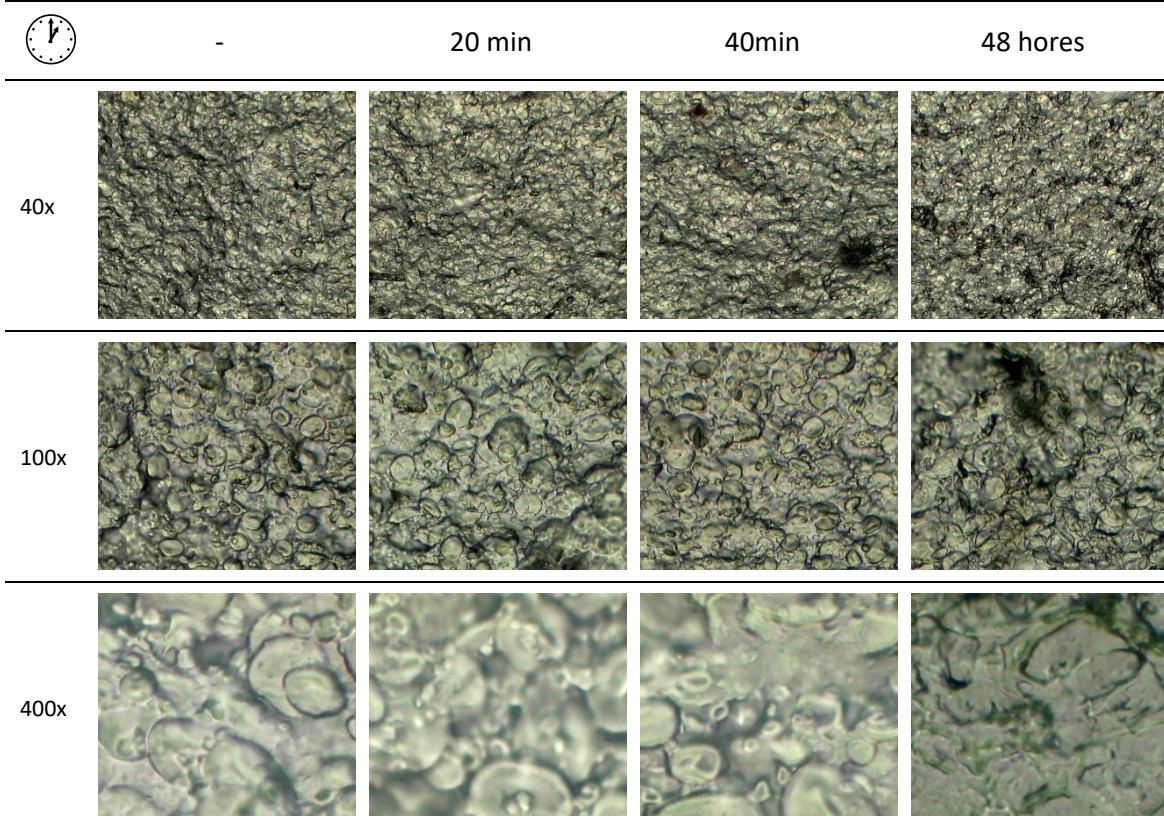
Aigua destil·lada / Temperatura ambient (23º)



OBSERVACIONS:

La forma globular del midó sofreix canvis lleus als 20 min, que es van tornant més evidents amb l'augment del temps de tractament. A 40 min s'observen alguns glòbuls deformats, però calen 48 hores de tractament per a observar canvis significatius.

P2
 Pasta de farina **0,4** mm de gruix + Albertina Kompresse*
Aigua destil·lada / Temperatura ambient (23º)



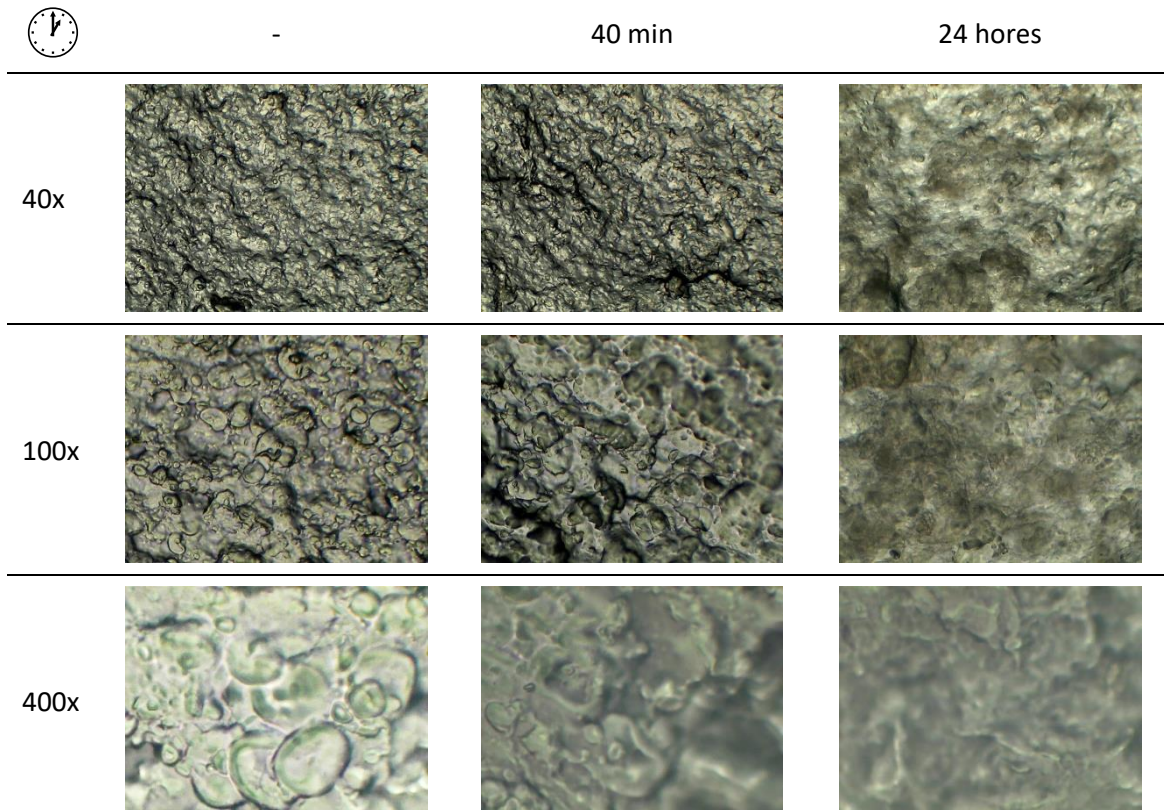
OBSERVACIONS:

Amb l'augment del gruix de pasta aplicada al portaobjectes s'observa una disminució dels efectes del tractament respecte la mostra P1. Als 40 minuts la mostra no ha sofert canvis evidents, mentre que a 48 hores de tractament es pot observar una lleu variació de la morfologia dels glòbuls, visible en alguns punts a 400x.

P3

Pasta de farina **0,2 mm** de gruix + Albertina Kompresse[®]

Aigua tamponada pH 7 / Temperatura ambient (23^o)



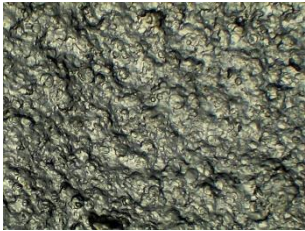
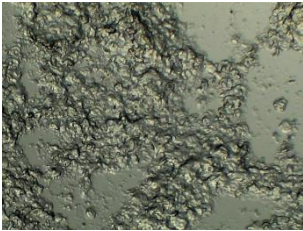
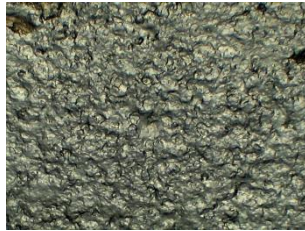
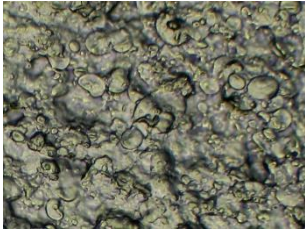
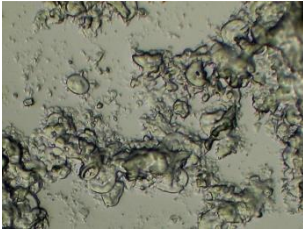
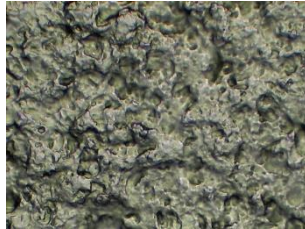
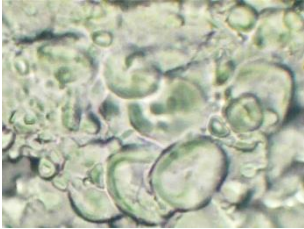
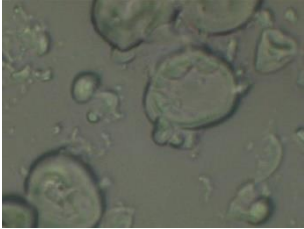

OBSERVACIONS:

Tamponant a un valor de 7 el pH de l'aigua aplicada s'observa una pèrdua de l'estructura globular del midó, essent mitjanament observable a 40 minuts de tractament, i molt evident a les 24 hores de tractament (40x, 100x i 400x).

P4

Pasta de farina **0,2 mm** de gruix + Albertina Kompresse®

Aigua destil·lada / Escalfor ambiental 35 Cº

		40 min / 35ºC	40 min / 35ºC + 24 hores a temperatura ambient
🕒	-		
40x			
100x			
400x			

OBSERVACIONS:

L'augment de la temperatura durant els primers 40 minuts de tractament no suposa un canvi notable en la morfologia del midó, però la solubilització de la cola de conill deguda a l'augment de la temperatura resulta en una textura semi-liquida o pastosa de la mostra.

El refredament i repòs dels components, prolongant el tractament durant 24 hores a temperatura ambient, provoca la pèrdua de l'estructura globular del midó.

6.4.2_VALORACIÓ DELS RESULTATS DE LES PROVES PRÈVIES

- El tractament enzimàtic suposa una major deformació dels grans de midó respecte el tractament aquós sense enzims, que no provoca canvis observables passades 48 hores d'humidificació.
- El gruix de la pasta de farina influeix en la velocitat del tractament, essent més lent a un major gruix de pasta. Això es deu probablement a la menor penetrabilitat de la solució enzimàtica a la pasta.
- Tamponant l'aigua a un pH de 7 s'observa un augment notable de la velocitat de reacció. Probablement el pH de la cola de conill (5,5) influeix en la disminució de la funció enzimàtica, ja que el rang de pH recomanat per a les α -amilases és de 6- 7.
- L'augment de la temperatura fins als 35°C no suposa un augment gaire important de la velocitat de reacció de l'enzim respecte el tractament a temperatura ambient. La temperatura provoca la solubilització de la cola de conill, propiciant una textura enganxosa de la pasta de farina, poc adequada per a la seva eliminació de la superfície. Si que s'observen canvis prolongant el tractament durant 24 hores a temperatura ambient, per la qual cosa és probable que un augment de la temperatura a l'inici del tractament estimuli l'inici de la funció enzimàtica.
- Pel que fa a la resistència mecànica de la pasta un cop seca, s'ha observat que la hidròlisi del midó no suposa una pèrdua important de poder adherent, ja que la cola de conill manté la pasta cohesionada i adherida al suport. Aquesta característica podria variar en funció de l'envelliment dels materials constituents de la pasta.

Es determina que el sistema que requereix el mínim temps d'aplicació per al tractament amb Albertina-Kompresse® en una pasta de les característiques descrites és mitjançant la utilització de **0,8ml / 4cm²** d'aigua tamponada a un **pH de 7** (mitjançant un tampó acetat), aplicada a **temperatura ambient (23°)** amb un pes de **70g**⁵⁶.

Els resultats d'aquestes proves prèvies estableixen alguns dels paràmetres que s'utilitzaran per a les proves sobre tela que s'exposen a continuació.

⁵⁶ Tant el pes (70g) com la quantitat d'aigua (0,8ml) no han estat modificats degut a la humectació de la superfície en un grau correcte.

6.5_PROVES PER A L'ELIMINACIÓ DE PASTA DE FARINA D'UN SUPORT DE TELA DE LLI

Avaluació del grau de retirada de la pasta de farina d'entre el teixit⁵⁷, en funció del gruix de pasta en superfície, del temps de tractament i de la penetrabilitat de la solució.

S'ha immobilitzat la tela de lli en un suport rígid, interposant una làmina de Melinex® per a impermeabilitzar el suport i evitar variacions de pH (Fig. 28). Mitjançant una altra làmina de Melinex® s'ha creat una plantilla que deixa descobertes zones de 4cm², per a ser utilitzades en les proves enzimàtiques (Fig. 29). Abans de començar les proves s'ha pres el valor de pH de la tela i de la tela amb pasta de farina (Fig. 30). Aquest últim serà revisat al final del tractament.



Fig. 28: Aspecte de la tela impregnada de pasta de farina, assecada durant un any, fixada al suport interposant un Melinex®

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

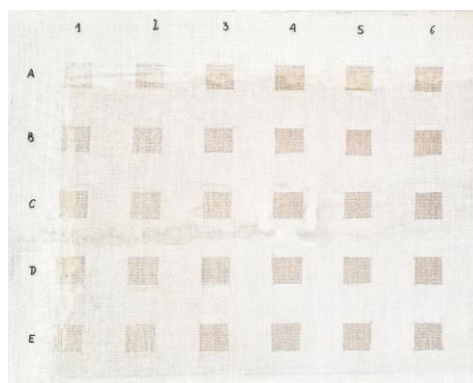


Fig. 29: Aspecte de la plantilla de Melinex® per a realitzar les proves, col·locada damunt la tela.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]



Fig. 30: Valors de pH. Amb groc localització de les preses del valor de pH de la tela (6,39), i amb blau localització de les preses de valor de pH de la tela impregnada amb pasta de farina (6,18).

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

⁵⁷ Tela de lli natural sense blanquejar, teixida en tafetà. L'entramat és bastant obert i el gruix dels filis és d'aproximadament 1mm. El sentit de la torsió de trama i ordit és en Z.

Per a la realització de les proves s'han tingut en compte els diferents gruixos d'engrut existents a la tela, comprovant l'eficàcia de cada tractament en dues zones de diferents característiques: una zona amb regruix de pasta i una zona amb poca quantitat de pasta, dispersa entre les fibres. La distribució de les mostres en funció del gruix d'engrut és la següent (Fig. 31):

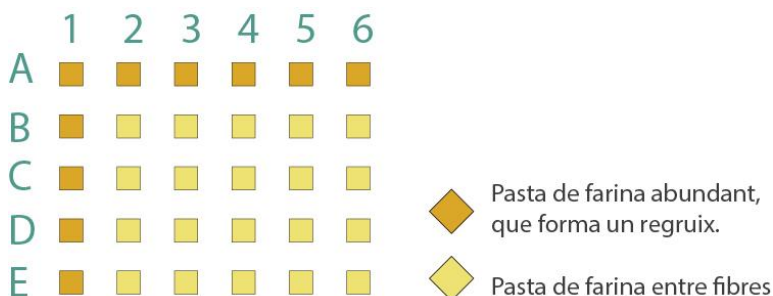


Fig. 31: Distribució de les mostres en funció del gruix de pasta a la tela.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

S'han avaluat diferents graus de solubilització de la pasta en funció del temps d'actuació i/o l'addició d'etanol (3%) a la mescla, per tal de rebaixar la tensió superficial de l'aigua i augmentar la penetració de la solució. La distribució de les solucions aplicades a cada prova és la següent (Fig. 32):



Fig. 32: Distribució de les mostres en funció de la solució aplicada.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

En tots els casos la disposició dels materials ha estat la mateixa que en les proves anteriors sobre portaobjectes, col·locant en primera instància el paper de seda, seguit de la compresa d'amilasa, el cartró humectant impregnat amb la solució aquosa, i finalment una làmina de Melinex® i el pes (Fig. 33).

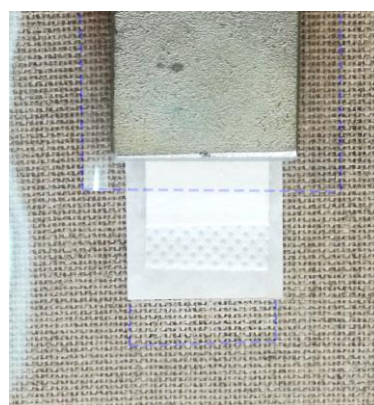


Fig. 33: Ordre de disposició dels materials.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

També s'han provat diversos sistemes de retirada de les restes de pasta de farina i esbandit dels residus (Fig. 36). Per a les zones amb més gruix de pasta aquesta s'ha retirat en tots els casos mitjançant espàtula (Fig. 35).







Fig. 35: Exemple de la retirada d'un regruix de pasta un cop finalitzat el tractament enzimàtic.

[Imatge ©Nina Viladrich, 2018]

Sense el regruix d'engrut aquestes mostres presenten un aspecte similar al de les zones amb menys gruix (quedant restes d'engrut entre les fibres de la tela) per la qual cosa han estat tractades provant els mateixos sistemes:

- Absorció mitjançant pressió i paper tissú
- Absorció per aspiració en humit
- Hisops secs i posterior esbandit amb hisops humits.

Fig. 36: Llegenda de símbols dels mecanismes de retirada de les restes, a tenir en compte per a la interpretació dels resultats:

Retirada mecànica mitjançant espàtula	
Absorció mitjançant pressió i paper tissú	
Absorció per aspiració en humit	
Hisops secs i posterior esbandit amb hisops humits amb aigua destil·lada.	

6.5.1_RESULTATS⁵⁸

6.5.1.1_MOSTRES DE CONTROL SENSE TRACTAMENT ENZIMATIC

Per tal de poder comparar l'aspecte de les fibres abans i després del tractament, s'han pres també imatges de la tela amb i sense pasta (Fig. 37), i s'han realitzat dues mostres de control amb aigua tamponada sense solució enzimàtica (Fig. 38).



Fig. 37: Aspecte de les fibres sense tractament.

[imatge ©Nina Viladrich, 2018]

⁵⁸ S'han pres fotografies de les zones tractades a 50x i a 220x mitjançant un microscopi digital de superfície (Dinolite®)


MOSTRES DE CONTROL		
	A4	B4
<p>1 2 3 4 5 6</p> <p>A ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>B ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>C ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>D ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>E ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>🕒 1h</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aigua tamponada pH 7 		
<p>Eliminació de les restes</p>		
<p>Observacions</p>	<p>L'adhesiu es solubilitza molt en la superfície i queda molt rígid en zones més internes, quedant encara fortament impregnat a les fibres. S'observa el trencament de la pasta de farina en grumolls sòlids.</p> <p>Un cop sec, s'observa una tonalitat més fosca a les zones tractades. (Fig.1)</p>	
<p>Altres imatges</p>	<p>Fig.1</p>	

Fig. 38: Aspecte de les fibres després d'un tractament aquós sense la incorporació d'enzims.

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018]

6.5.1.2_RESULTATS DELS TRACTAMENTS ENZIMÀTICS

	A2	B2
<p>1 2 3 4 5 6</p> <p>A ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>B ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>C ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>D ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>E ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>🕒 1h</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aigua tamponada pH 7 • Compresa d'amilasa 		
<p>Eliminació de les restes</p>		
<p>Observacions</p>	<p>L'adhesiu es solubilitza mitjanament, permet retirar les restes més superficials mecànicament (A2).</p> <p>L'aspiració és efectiva per a retirar humitat i restes de pasta de farina en superfície, però no té prou força com per a retirar les restes entre les fibres de la tela (A2 / B2).</p> <p>Un cop sec, s'observa una tonalitat més fosca a les zones tractades. (Fig.1)</p>	
<p>Altres imatges</p>	<p>Fig.1</p> 	

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018.]

	A3	B3
<p>1 2 3 4 5 6</p> <p>A ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>B ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>C ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>D ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>E ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p> 1h</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aigua tamponada pH 7 • Compresa d'amilasa 		
<p>Eliminació de les restes</p>		
<p>Observacions</p>	<p>L'adhesiu es solubilitza mitjanament, permet retirar les restes mes superficials mecanicament (A3).</p> <p>El tisú no és efectiu en la captació dels residus superficials ni entre fibres. Absorbeix la humitat però no la pasta de farina.</p> <p>Un cop sec, s'observa una tonalitat més fosca a les zones tractades. (Fig.1)</p>	
<p>Altres imatges</p>	<p>Fig.1</p> 	

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018]

	A5	B5
<p>1 2 3 4 5 6</p> <p>A ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>B ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>C ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>D ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>E ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p> 24h</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aigua tamponada pH 7 • Compresa d'amilasa 	 	 
Eliminació de les restes	  	 
Observacions	<p>L'adhesiu es solubilitza completament, permet retirar la majoria de les restes.</p> <p>L'aspiració combinada amb l'esbandit mitjançant hisops humits dona resultats excel·lents pel que fa a la retirada de la pasta, però s'observa que una excessiva incidència en l'esbandit desfila part dels fils de la tela (B5).</p> <p>Un cop sec, s'observa una tonalitat més clara a les zones tractades, semblant a la de la tela sense pasta de farina. (Fig.1)</p>	
Altres imatges	<p>Fig.1</p> 	

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018]

	A6	B6
<p>1 2 3 4 5 6</p> <p>A ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>B ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>C ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>D ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>E ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>🕒 30 min</p> <p>🕒 30 min</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aigua tamponada pH 7 • Compresa d'amilasa 		
<p>Eliminació de les restes</p>		
<p>Observacions</p>	<p>L'adhesiu es solubilitza mitjanament, permetent retirar part de les restes entre les dues aplicacions. D'aquesta manera la segona aplicació pot actuar a les parts internes de la pasta reduint el temps de tractament. S'ha utilitzat la mateixa compresa d'amilasa per tal de no augmentar la concentració d'enzim en superfície.</p> <p>L'aspiració combinada amb l'esbandit mitjançant hisops humits dona bons resultats pel que fa a la retirada de la pasta. Minimitzant la insistència en l'esbandit s'evita malmetre els fils de la tela. El grau de neteja és acceptable.</p> <p>Un cop sec, s'observa una tonalitat lleugerament més clara a les zones tractades. (Fig.1)</p>	
<p>Altres imatges</p>	<p>Fig.1</p> 	

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018]

	D1	D2
<p>1 2 3 4 5 6</p> <p>A ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>B ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>C ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>D ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>E ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p> 1h</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aigua tamponada pH 7 amb un 3% d'etanol. • Compresa d'amilasa 	 	 
Eliminació de les restes	  	 
Observacions	<p>L'adhesiu es solubilitza bé. Es produeix un augment de la penetració de la solució a la tela. (Fig.1)</p> <p>L'aspiració combinada amb l'esbandit mitjançant hisops humits dona bons resultats pel que fa a la retirada de la pasta, però l'excessiva humectació de la tela propicia majors desfilaments durant l'esbandit.</p> <p>Un cop sec, s'observa una tonalitat lleugerament més clara a les zones tractades. (Fig.2)</p>	
Altres imatges	 	

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018.]

	E1	C1
<p>1 2 3 4 5 6</p> <p>A ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>B ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>C ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>D ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>E ■ ■ ■ ■ ■ ■</p> <p>🕒 20min</p> <p>🕒 20min</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pre-escalfament amb espàtula calenta (30°) • Aigua tamponada pH 7 amb un 3% d'etanol. • Compresa d'amilasa 		
<p>Eliminació de les restes</p>		
<p>Observacions</p>	<p>L'adhesiu es solubilitza molt bé.</p> <p>L'augment de la temperatura de la superfície combinat amb la repetició de l'aplicació (retirant residus entre les dues aplicacions) proporciona un grau de neteja adequat sense deteriorar en excés les fibres de la tela en les zones amb més gruix de pasta. (Fig.1 i 2)</p>	
<p>Altres imatges</p>	<p>Fig.1</p> 	<p>Fig.2</p> 

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018]

						C2
1 2 3 4 5 6 A ■ ■ ■ ■ ■ ■ B ■ ■ ■ ■ ■ ■ C ■ ■ ■ ■ ■ ■ D ■ ■ ■ ■ ■ ■ E ■ ■ ■ ■ ■ ■						
 20 min APLICACIÓ: <ul style="list-style-type: none"> • Pre-escalfament amb espàtula calenta (30°) • Aigua tamponada pH 7 amb un 3% d'etanol. • Compresa d'amilasa 						
Eliminació de les restes						
Observacions						<p>L'adhesiu es solubilitza bastant be, permetent retirar part de les restes entre les fibres amb un temps molt curt de tractament, que impedeix la humectació excesiva del suport. Tot i que queden algunes restes de pasta de farina adherides a les fibres el grau de neteja és bastant adequat. (Fig.1)</p>
Altres imatges						

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018.]

C3						
1 2 3 4 5 6 A ■ ■ ■ ■ ■ ■ B ■ ■ ■ ■ ■ ■ C ■ ■ ■ ■ ■ ■ D ■ ■ ■ ■ ■ ■ E ■ ■ ■ ■ ■ ■						
<p>🕒 20 min</p> <p>🕒 20 min</p> <p>APLICACIÓ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pre-escalfament amb espàtula calenta (30°) • Aigua tamponada pH 7 amb un 3% d'etanol. • Compresa d'amilasa 						
<p>Eliminació de les restes</p>						
<p>Observacions</p>	<p>Repetint el tractament dues vegades l'eliminació dels residus de pasta entre les fibres és gairebé completa, i no s'observen desfilaments a les fibres de la tela amb un esbandit moderat.</p> <p>Les zones tractades presenten un color lleugerament més clar, semblant al de la tela sense pasta de farina. (Fig.1)</p>					
<p>Altres imatges</p>	<p>Fig.1</p> 					

[Imatges ©Nina Viladrich, 2018]

6.5.2_VALORACIÓ DELS RESULTATS

- La solució aquosa sense tractament enzimàtic suposa una solubilització heterogènia de l'engrut. Algunes parts superficials queden pràcticament líquides, mentre que altres zones es mantenen insolubles formant grumolls. En contraposició, les mostres tractades amb enzims mostren una solubilització més homogènia, concedint als regruixos d'engrut una textura més plàstica i flexible que permet la retirada del material de manera compacta.
- L'adició d'un 3% d'etanol a la solució en millora la penetrabilitat. Tot i que això representa un efecte negatiu pel suport de tela és convenient per a reduir el temps de tractament, especialment a les zones amb regruixos.
- El preescalfament de la superfície a tractar a 30°C mitjançant espàtula calenta suposa una prèvia activació de la funció enzimàtica, permetent reduir el temps d'aplicació.
- Pel que fa a la durada dels tractaments, s'observa que és més efectiu realitzar tractaments curts (20-30min) en repetició que no pas un sol tractament de major durada (+ d'1h). La retirada dels residus entre els dos tractaments és imprescindible per a una intervenció eficient. Per altra banda, la curta durada de les aplicacions és beneficiosa per a evitar la humidificació excessiva del suport de tela, que és susceptible de deformacions i tensions no desitjades.
- La retirada dels residus i l'excés d'humitat mitjançant absorció amb paper tissú no resulta adequada. El tissú capta la humitat de la zona tractada sense endur-se els residus de pasta entre les fibres.
- La retirada dels residus mitjançant aspiració en humit és adequada. Tot i que no es retiren la totalitat dels residus, l'aspiració permet extreure les restes de pasta més superficials, a més de contribuir en l'assecatge de les fibres de la tela.
- L'esbandit mitjançant hisops humits és necessari per a la retirada de la pasta entre les fibres. L'acció mecànica amb moviments circulars contribueix a l'extracció de la pasta atrapada, però no convenen moviments excessius per a no deteriorar la tela.

- Pel que fa a l'aspecte de la tela un cop seca, s'observa que els tractaments més superficials resulten en una coloració marronosa de la superfície (probablement deguda a la redistribució dels residus solubilitzats però no retirats), mentre que les neteges més exhaustives, mitjançant esbandit entre les diverses aplicacions, resulten en un color clar de la tela fruit de la retirada gairebé completa dels residus.

6.6_CONCLUSIONS DE LA PART EXPERIMENTAL

Un cop finalitzades les proves es pot afirmar que el valor de pH de la solució és molt determinant per a l'eficàcia del tractament. Tal i com es descriu al punt 3.1.2 d'aquest treball, les amilases acostumen a requerir un pH neutre per a la seva acció, i la lleugera acidesa de la pasta de farina no propicia un medi adequat per a l'acció enzimàtica. Pel que fa a la temperatura, aquesta contribueix a l'acceleració de la velocitat de reacció, però no esdevé un factor que requereixi ser regulat amb tanta precisió. El rang de temperatura òptima de les amilases es troba entre els 30 i els 39°C, mentre que la temperatura ambiental durant les proves ha estat d'uns 23°C. Aquestes condicions disminueixen l'acció enzimàtica però no l'inhibeixen completament. Tenint en compte la presència de cola de conill, i per tal de no solubilitzar-la en excés, ha estat suficient aplicar una temperatura superficial de 30°C durant uns segons per a notar una disminució del temps de tractament. Aquesta millora en la reacció enzimàtica es pot deure a tres motius: en primer lloc a l'acostament al rang de temperatura funcional de l'enzim, en segon lloc a la lleu solubilització del medi, que facilita el traspàs de substàncies, i en tercer lloc a l'aportació energètica intrínseca de l'energia calorífica, que facilita la mobilitat molecular.

L'addició d'un petit percentatge d'etanol disminueix la tensió superficial de l'aigua i millora la penetrabilitat de la solució. No s'han observat efectes inhibidors produïts per la seva presència.

Així doncs, el sistema que ha resultat més adequat per a retirar la pasta de farina del suport de tela de lli ha estat el següent:

Aplicació d'una solució d'**aigua tamponada a pH7** ($\text{NaHCO}_3 + \text{HCl}$) amb addició d'un **3% d'etanol**, preescalfant la **superfície a 30°C**. Pel que fa al temps de tractament, es consideren adequats **20 min** per a superfícies amb poca quantitat d'engrut, amb els que s'assoleix un grau de neteja acceptable efectuant una retirada dels residus mitjançant aspiració i esbandit amb hisops humits. Per a les zones amb regruixos de pasta es requereix una **aplicació prèvia de 20 min**, amb la corresponent retirada dels residus mitjançant espàtula, aspiració i esbandit amb hisops humits.

Basant-nos en les característiques de la tela amb la que s'han realitzat les proves, per a una retirada homogènia de la pasta de farina s'haurien de tractar primer tots els regruixos, i posteriorment realitzar una segona aplicació del tractament de manera homogènia a tota la superfície (Fig. 39, C1 i C2).

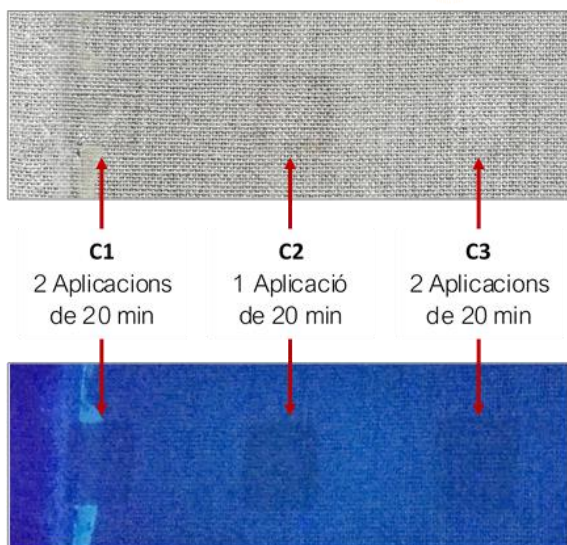


Fig. 39: Aspecte de les mostres C1, C2 i C3, que presenten diversos graus de neteja. Llum visible i llum ultraviolada.

[imatge ©Nina Viladrich, 2018]

En cas de requerir un grau molt elevat de neteja es podria realitzar una tercera aplicació (que seria la segona per a les zones amb poc gruix), la qual resultaria en una neteja gairebé completa del suport de tela, tornant a aquesta el color i aspecte originals (Fig. 39, C3). Tot i això, cal valorar el risc de deteriorar els fils del teixit durant la fase d'esbandit, per la qual cosa es recomana prescindir d'aquesta última aplicació en cas que no sigui estrictament necessari.

Pel que fa a la successió de tractaments, cal recordar que si es canvia la compresa enzimàtica es podria produir un augment de la

concentració d'enzim en superfície, per la qual cosa és aconsellable reciclar la compresa i canviar només el paper de seda de la part inferior.

En referència al pH de les zones tractades, s'ha observat que la utilització d'aigua tamponada a un pH de 7 no ha tingut una incidència gaire notable al pH final de la tela, que ha passat d'un valor de 6,18 a un de 6,34. Probablement l'esbandit amb aigua destil·lada propicia la retirada dels residus de la majoria dels components de la solució amortidora (Fig. 40).



Fig. 40: Localització de la presa de mostres per a obtenir el valor de pH final.

[imatge ©Nina Viladrich, 2018]

Els resultats obtinguts en les mostres de tela de lli no són concloents a l'hora de plantejar un tractament per a l'obra "L'últim sopar", ja que la pasta de farina utilitzada en les proves és d'aplicació recent (1 any d'envelliment), mentre que l'engrut de l'obra original presenta molt poca solubilització en aigua i se'n desconeix la presència d'additius. Tot i això, les proves sí que han permès determinar quins són els factors a tenir en compte per a un funcionament òptim del mètode, i poden suposar un bon punt de partida per a plantejar una neteja enzimàtica del revers mitjançant Albertina-Kompresse®.

7_CONSIDERACIONS FINALS DEL TREBALL

En la primera part d'aquest document, de caire una mica més explicatiu i de definició de conceptes, s'ha resolt què és un enzim i el perquè de la seva funció catalítica. És de comú enteniment que no es pot abordar el tema de les aplicacions enzimàtiques en conservació-restauració si no s'ha entès primer la naturalesa del propi enzim, i aquesta és la meta que s'ha perseguit en la primera fase de l'estudi. S'ha procurat aprofundir prou com per a poder entendre les propietats bàsiques dels enzims, sense entrar excessivament en tecnicismes més propis de la bioquímica que de la conservació-restauració.

Un cop assumides aquestes qüestions bàsiques, ha resultat molt més senzill entendre perquè ens poden ser útils els enzims a l'hora d'intervenir obres d'art, així com quins paràmetres s'han de tenir en compte per a emprar-los i quines limitacions té la seva utilització. Més enllà de la recopilació de dades al respecte de la metodologia que cal seguir per a fer-ne un ús correcte, la revisió de casos pràctics ha donat una idea de la transversalitat de la seva acció en les diferents disciplines de la conservació-restauració, i ha permès agafar una visió global del tipus d'intervencions en les que han estat efectius. D'aquesta manera s'han introduït els enzims dins el ventall de possibilitats a tenir en compte a l'hora d'escollir el tractament adequat per a una peça.

Per últim, s'ha comprovat que la part de la teoria estudiada en relació a les glicosidases es correspon amb la pràctica. Les proves plantejades han permès veure quins efectes produeixen els canvis de pH i de temperatura en l'eficàcia dels tractaments amb amilasa, a través de l'observació de variacions en l'estructura del midó. També s'han pogut observar els requeriments reals quan es planteja un tractament enzimàtic, sobretot pel que fa a mitjans tècnics i metodologia.

Un dels aprenentatges que es considera de més vàlua per a futurs tractaments amb enzims és la familiarització amb la base de dades BRENDA, que proporciona molta informació per a la correcta utilització dels enzims, però que d'entrada pot semblar una mica complexa per a una persona aliena al món de la enzimologia.

Per a la redacció d'aquest estudi sobre els enzims i les seves aplicacions no s'han tingut en compte les qüestions de pressupost, que de manera general es consideren d'importància en tractaments de conservació-restauració, especialment al sector privat. Això ha estat així perquè no s'ha volgut potenciar la idea de que els tractaments amb enzims resulten més costosos que la resta de tractaments, ja que en nombroses ocasions s'intervenien peces amb altres mètodes que també suposen una inversió econòmica important (ja sigui pels materials utilitzats o pel temps que suposa la intervenció). Al mercat hi ha enzims de moltes característiques i preus diferents, i el que comporta un increment notable del preu final, en definitiva, és l'anàlisi dels materials constituents de l'obra i les seves degradacions. Això implica un treball en col·laboració amb altres professionals, i en conjunt suposa un hàbit molt positiu per a la documentació prèvia de les obres i per avançar cap a una metodologia cada cop més científica en els tractaments.

No s'han proposat proves amb reactius per a realitzar aquestes tasques d'anàlisi, ja que es considera que aquest tipus de pràctiques poc precises haurien de perdre popularitat en benefici d'altres estudis més acurats, cada vegada més accessibles als professionals de la conservació-restauració. El cost que suposen les proves prèvies i les anàlisis forma part de la tasca del conservador-restaurador, i no s'hauria de considerar un cost afegit.

Una de les raons del poc ús dels enzims al nostre entorn es deu probablement a la falta de bibliografia específica traduïda al castellà. Aquest factor ha pogut influir en la poca repercussió dels tractaments enzimàtics a les pràctiques habituals en tallers privats del nostre país. La falta de formació específica als estudis superiors de conservació-restauració tampoc en facilita la popularització. Sortosament, sí que es donen les eines i recursos per a entendre les propietats químiques dels materials, i això facilita la comprensió dels tractaments enzimàtics a aquells que volen explorar-ne les possibilitats.

És molt convenient conèixer els aspectes fonamentals dels tractaments amb enzims, encara que exigeixi per part del conservador-restaurador un treball d'aprenentatge i sistematització dels processos. La seva utilització enriqueix i posa en valor el gran potencial dels tractaments aquosos, apreciats per la seva innocuïtat i la seva baixa toxicitat. Constitueix un mètode de neteja que es pot emprar en totes les especialitats de la professió, essent, en algunes peces amb problemàtiques complexes, l'únic mètode viable per a dur a terme una intervenció segura, selectiva i sense riscos.

8_REFERÈNCIES I BIBLIOGRAFIA

Bellucci, R., Cremonesi, P., Pignagnoli, G. (1999). A Preliminary Note on the Use of Enzymes in Conservation: The Removal of Aged Acrylic Resin Coatings with Lipase. *Studies in Conservation*, Vol. 44, N° 4 278-281. Londres, Regne Unit. DOI: 10.2307/1506657.

Blasco, I., De la viña, S., San Andrés, M. (2005). Criterios. Fundamentos y antecedentes de la utilización de enzimas en tratamientos de limpieza. *PH Boletín del Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico*. N° 53, p. 24-34.

Cremonesi, P. (2002). *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome*. 2a Edició. Ed. Il Pratto, Padova, Italia. ISBN 88-87243-37-9

Cremonesi, P. (2010). Rigid gels and enzyme cleaning. En Marion F., Mecklenburg, A., Charola, E., & Koestler, R. (Comp.) *New Insights into the Cleaning of Paintings, Proceedings from the Cleaning 2010 International Conference* (2013). Smithsonian Institution Scholarly Press, n°3 179-184. Washington, D.C, Estats Units d'Amèrica. Recuperat de: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.591.7432&rep=rep1&type=pdf>

De Lera, A., (2011). *Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa* (tesis doctoral). Universitat del País Basc, Biscaia. ISBN: 978-84-9082-095-7. Recuperat de: <https://addi.ehu.es/handle/10810/14292>

De Lera, A., Escohotado, M. T., Blum, L. J., Marquette, C. A. (2009). Método experimental para consolidar fibras de papel (I parte del estudio). *Ge-Conservación: Publicación Digital Hispano-Lusa de Conservación y Restauración*, n°0 177-188. Recuperat de: <https://www.ge-iic.com/ojs/index.php/revista/article/view/69>

Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4a Edició. Ed. Reverte. Barcelona, Espanya. ISBN 9788429172089

Domedel, L., Silvestre, D. (2012). *Introducció dels enzims en el protocol de neteges del CRBMC*. (Document intern del Centre de Restauració de Béns Mobles de Catalunya, no publicat).

Eisner, F., Ossa C., Benavente A. (2005). Interpretación de resultados de un test de solubilidad para barnices. En *Conserva*, n°9 29-42. Servicio Nacional de Patrimonio Cultural. Santiago de Chile, Chile. Recuperat de: <http://www.cncr.cl/611/w3-article-4672.html?noredirect=1>

Erickson, H. (1992). Usage Recommendations for α -Amylases: Maximizing Enzyme Activity while Minimizing Enzyme-Artifact Binding Residues. En *The Book and Paper group annual*, n°11 24-33. The American Institute for Conservation. Washington, D.C, Estats Units d'Amèrica. Recuperat de: <http://cool.conservation-us.org/byauth/erickson/enzymes/erickson1992amylases.pdf>

- Klug-conservation** (2017). *Application technique* [Technical data sheet]. Recuperat de: https://www.klug-conservation.com/medien/Produktinformationen/10_Zubehoer/06_Albertina_Kompresse/Datenblatt/klug_627x297_A4_web_2017_en_download.pdf
- Lange, C.** (1886). *Friedrich Wilhelm Kühne* [fotografia]. Arxiu digital de la col·lecció gràfica de la Universitat de Heidelberg. Recuperada de: <http://heidicon.ub.uni-heidelberg.de/id/28859>
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M.** (2005). *Principios de Bioquímica*, 4^o Edició. Ed. Omega. Barcelona, Espanya. ISBN 9788428214100
- McCall, R.** (2010). *Physics of the Human Body*. Johns Hopkins University Press. Baltimor, Estats Units d'America. ISBN 978-0-8018-9455-8
- Muñoz, M. D.** (15 de novembre de 2010). *Enzimas. Diferencias entre catalizador quimico y biologico*. [Arxiu de slideshare]. Recuperat de: <https://es.slideshare.net/mdmunozc01/enzimas-2010>
- Nualart, A.** (2017) *Tractaments aplicats als béns culturals V i VII - Pintura sobre fusta*. Universitat de Barcelona curs 2016-2017, Barcelona, Espanya (Document no publicat)
- Oriola, M.** (2013). Valors típics de pH i DP del suport de tela en la pintura de cavallet. En Iglesias, M. (Ed), *La Recerca en Conservació des de la visió del Conservador-Restaurador II*, 21-27. Universitat de Barcelona, Espanya. ISBN 978-84-697-1559-8
- Oriola, M.** (2017) *Tractaments aplicats als béns culturals V i VII - Pintura sobre tela*. Universitat de Barcelona curs 2016-2017, Barcelona, Espanya (Document no publicat)
- Ranalli, G., Alfano, G., Belli, C., Lustrato, G., Colombini, M. P., Bonaduce, I., Zanardini, E., Abbruscato, P., Cappitelli F., Sorlini C.** (2004). *Journal of Applied Microbiology*, n^o 98, Issue 1, 73–83. Londres, Regne Unit. Recuperat de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2004.02429.x>
- Rydberg, E.H., Li, C., Maurus, R., Overall, C.M., Brayer, G.D., Withers, S.G.** (2002). *Pancreatic alpha-amylase* [representació 3D]. RCSB Protein Data Bank, Biochemistry 41 4492-4502. Recuperada de: <https://www.rcsb.org/structure/1SMD>
- Schwarz, I.** (2000). A Pre-packaged α -Amylase Poulticing System: Albertina-Kompresse. En *The Book and Paper group annual*, n^o19 19-26. The American Institute for Conservation. Washington, D.C, Estats Units d'Amèrica. Recuperat de: <http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v19/bp19-26.html>
- Seymour, R., Carraher, C.** (2002). *Introducción a la química de los polímeros*. Ed. Reverte. Barcelona, Espanya. ISBN 84-291-7926-7
- Viniegra, S.** (2016). *Enzimas, conceptos generales*. [vídeo, min. 6:25]. Universitat Miguel Hernández de Elche, Departament de bioquímica i biologia molecular. Recuperat de: <https://www.youtube.com/watch?v=kAd9WdZO2BU&list=PLgNZC746IGA6ETXnE56PGXFxYqX9RnMzZ&t=0s&index=6>

Voet, D., Voet, J., Pratt, C. (2016). *Fundamentos de Bioquímica*. 4a Edició .Ed. Medica Panamericana, Ciutat de Mèxic, Mèxic. ISBN 978-9356-96-5

Vokić, D., Berovič, M. (2012). Application of Enzymes in Cleaning of Oil and Tempera Paintings. En Trček Pečak, T. & Madžarac, N. (Comp.), *Conservation and Restoration Today*, 120-135. Institut per a la Protecció del Patrimoni Cultural d'Eslovènia. Ljubljana, Eslovènia. ISBN 978-961-6902-08-3. Recuperat de:
http://www.zvkds.si/sites/www.zvkds.si/files/uploads/files/publication/znanost_za_umetnost_posamezne_2012.pdf

Whaap, F. (2007). Treatment of two Coptic tapestry fragments. En *Victoria & Albert's Conservation Journal*, nº 55 11-12. Londres, Regne Unit.
Recuperat de: http://www.vam.ac.uk/_data/assets/pdf_file/0007/177622/36098_file.pdf

Wolbers, R. (2004). Un approccio aquoso alla pulitura dei dipinti. *Quaderni N°1, Cesmar* 7. Ed. Il Prato, Padova, Italia. ISBN 88-87243-83-2

Wolbers, R. (2018). *General cleaning materials and methods for wall paintings*. Curs organitzat pel Centre de Restauració de Béns mobles de Catalunya. Barcelona, Espanya (document no publicat).