



Aplicación de los enzimas en la conservación y restauración pictóricas

En las intervenciones de restauración, cualquier proceso presenta riesgos y contraindicaciones, pero la limpieza es una de las fases más arriesgadas. La limpieza implica una acción directa pero no totalmente controlable sobre la superficie pictórica a través de medios mecánicos (bisturí), fisicoquímicos (disolventes), químicos (ácidos, bases, agentes quelantes) o bioquímicos (enzimas).

Una pintura, sea sobre tabla, tela, mural o cualquier otro soporte, se puede considerar como una estructura con sustratos físicamente diferenciados, pero íntimamente ligados unos a otros y con interacciones fisicoquímicas más o menos fuertes. Los disolventes son líquidos volátiles, de origen orgánico y bajo peso molecular. El disolvente actúa intercalándose en las partículas del sólido y facilitando su eliminación.

La acción de un disolvente sobre un sustrato se concreta en tres acciones:

- 1.- Penetración: a través de los espacios vacíos o porosos del sustrato.
- 2.- Evaporación: la evaporación regula el tiempo de actuación de un disolvente sobre un sustrato.
- 3.- Disolución: debida a una cierta similitud entre el conjunto de enlaces del sólido del sustrato y los enlaces de las moléculas del disolvente.

ENZIMAS: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

Los materiales orgánicos utilizados como aglutinantes y barnices protectores en la tradición pictórica son productos naturales y como tales, presentan degradaciones de sus agentes bioquímicos. Por la vía química, su descomposición parcial necesita tratamiento más bien energético, que en los organismos vivos es obra parcialmente de enzimas, catalizadores biológicos.

Los enzimas son proteínas que existen en los seres vivos en pequeñas cantidades. Tienen la función de catalizador específico de reacciones de metabolismo animal, vegetal y microbiano y aumentan considerablemente la velocidad de las reacciones en las que intervienen.

Características:

- Especificidad: es la propiedad de actuar sobre una única sustancia o sobre un grupo de sustancias. Esto los distingue de la mayor parte de los catalizadores.
- Gran eficiencia catalítica: presentan la capacidad de simplificar un elevado número de moléculas del sustrato.

La perspectiva de utilizarlos en las intervenciones de restauración nace de la necesidad de encontrar una solución alternativa a los medios físico-químicos tradicionales, que presentan numerosos inconvenientes, entre ellos la agresividad y la no especificidad.

La utilización de enzimas permitiría seleccionar una clase de compuestos definidos, operar en condiciones menos duras para la obra de arte que en un limpieza química y sobretodo, sin interferir en los materiales orgánicos de diferente composición y que se quieren mantener intactos. Por ejemplo: una estratificación de materiales proteicos bajo un aceite, un enzima que catalice la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, no actúa con las moléculas del triglicérido del aceite.

Naturalmente, la selección del enzima adecuado para un caso específico implica una analítica química previa del material que se quiere eliminar o ablandar y del material que hay que proteger. Además, hay que considerar los parámetros físico-químicos en los que se basa la influencia de la actividad enzimática:

- 1.- Temperatura óptima: cada enzima tiene una temperatura óptima en la que cataliza a la máxima velocidad.
- 2.- Intervalo de pH: cada enzima tiene un intervalo en que su actividad es máxima. En un pH inferior o superior, su velocidad de reacción disminuye.
- 3.- Presencia de activadores e inhibidores: entre los inhibidores de la actividad enzimática, están los cationes de metales pesados (plomo, hierro y cobre), que forman parte de la composición de muchos pigmentos inorgánicos. Su presencia es suficiente para bloquear la actividad de éstos.

Estructura:

Desde el punto de vista estructural, los enzimas son proteínas, simples o conjugadas, largas cadenas polipeptídicas, formadas por aminoácidos ligados entre ellos, mediante enlaces peptídicos.

Los aminoácidos son moléculas formadas por un radical hidrocarbonado, un grupo carboxilo y un grupo amino: (ver figura)

El enlace peptídico lo constituyen el grupo carboxilo del aminoácido 1 y el grupo amino del aminoácido 2: (ver figura).

Los enzimas extracelulares juegan un papel importante en la degradación de las obras de arte. Su función principal es provocar cambios químicos en los nutrientes presentes en el medio para transformarlos en alimentos para la célula. Estos enzimas, degradan complejas moléculas como proteínas, celulosa, lignina, en estructuras más simples que son solubles en agua.

Los enlaces entre las cadenas de aminoácidos se pueden alterar por diferentes causas:

- La temperatura
- El pH del medio.
- La presencia de sustancias iónicas.

La estructura de una proteína determina su función biológica: las proteínas fibrosas tienen funciones de tipo estructural, mientras que las proteínas consideradas globulares tienen funciones de transporte o enzimáticas. Si la forma se ve alterada, también cambia su actividad.

ESPECIFICIDAD DE LOS ENZIMAS:

Cada enzima tiene una parte llamada parte activa o centro activo y su composición permite la reacción con un sustrato de estructura espacial determinada. Entre las numerosas moléculas que se encuentran rodeando el enzima, éste tiene la capacidad de reconocer la que tiene la estructura adecuada y que encajará perfectamente con la suya, iniciando así el proceso que constituye el ciclo catalítico del enzima. Las otras moléculas del sustrato, que no tienen esta estructura específica para reaccionar con el enzima, no se verán afectadas por la acción de éste. Esta especificidad se conoce como principio de "key.lock" o llave-cerradura.

CICLO CATALÍTICO DE LOS ENZIMAS:

Si simbolizamos los enzimas por E y el sustrato sobre el que actúa por S, el ciclo catalítico del enzima se puede representar sencillamente en el esquema (ver figura).

El sustrato y el enzima se acercan. Se forma un complejo enzima-sustrato. En este punto se producen cambios en la estructura del enzima que permiten la formación de nuevos enlaces como fuerzas de atracción de tipo polar, apolar y enlaces de hidrógeno y la disociación de los enlaces preexistentes transformando el complejo en ES(1). En el caso de una reacción de hidrólisis, se rompe la molécula del sustrato. Con la transformación, la nueva estructura del sustrato no reaccionará con el enzima y el complejo ES(1) se disociará otra vez liberando el sustrato formado S(1) y el enzima inalterado E, finalizando el ciclo catalítico.

Algunas moléculas orgánicas tienen una gran afinidad con ciertos enzimas, es decir, tienen la capacidad de enlazar con el centro activo con un enlace tan fuerte que el complejo se estabiliza indefinidamente e impide la disociación. Entonces la función del enzima se ve inhibida. Otros factores, como la variación del pH, la temperatura, la presencia de ciertos iones, modifican la estructura del enzima y alteran la actividad.

ACCION DE LOS ENZIMAS EN RESTAURACION:

A partir de los años 70 los enzimas pudieron ser aislados de forma estable y purificados y desde entonces se experimenta su utilización en el campo de la restauración, en intervenciones de consolidación y de limpieza de obras de arte.

Los enzimas utilizados en el campo de la restauración son las hidrolasas, capaces de catalizar el fraccionamiento de las macromoléculas. Más concretamente, son enzimas proteolíticas (catalizan proteínas), lipídicas (catalizan lípidos) y glucosidasas (catalizan polisacáridos). La utilización de enzimas puede representar una alternativa al uso de ácidos y bases para ablandar y eliminar sustancias polimerizadas y envejecidas.

PROTEASAS:

Los enzimas proteolíticos pueden ser, según su origen:

- Animal: derivados del tejido orgánico: pepsina, tripsina, pancreatina y proteínas gástricas.
- Vegetal: obtenidas del ananá (bromelaina), papaya (papaína) y higos (ficina)
- Microbiano: después de aislar algún tipo de bacteria (Bacillus) u hongo (Aspergillus). Las proteasas pueden necesitar un medio básico (las de origen microbiano), neutro (papaína) o ácido (pepsina y tripsina). Por su capacidad de degradar péptidos, son



adecuados para ablandar materiales como colas y gelatinas animales, albúmina, caseína y huevo.

LIPASAS:

Las lipasas necesitan de un medio de pH neutro-básico. Gracias a su acción hidrolítica ante los triglicéridos, las lipasas pueden ser utilizadas en intervenciones de limpieza que necesitan ablandar aceites secantes (barnices oleo-resinosos y repintes). Algunas lipasas, formadas por ésteres, pueden ser utilizadas para el ablandamiento de ceras y resinas sintéticas como ésteres acrílicos y vinílicos.

En repintes al óleo, algunos metales pesados actúan como inhibidores del enzima. Estos metales, a la vez, son componentes de numerosos pigmentos, sobretodo antiguos, como Cinabrio, Minio, ocre y tierras, azurita y malaquita, de uso muy común. Como consecuencia, es posible que un repinte al óleo, sea resistente a la acción de los enzimas.

AMILASAS:

Las amilasas necesitan para actuar un pH neutro. Pueden ser utilizadas para la eliminación de diferentes sustancias usadas en restauración. Por ejemplo, la pasta de almidón, goma arábiga y gomas vegetales y no es necesario un proceso de hidrólisis para ablandarlas. Las amilasas no degradan la celulosa y por lo tanto no interactúan con el papel, la tela o la madera. Su aplicación sobre una pintura para ablandar los residuos de un adhesivo de entelado, es segura. Hay que tener en cuenta, que el adhesivo de una pintura a la acuarela, una aguada o algún tipo de témpera, está formado por gomas polisacáridas que se degradan con las amilasas. También es un aglutinante muy susceptible al agua.

PARÁMETROS PARA ESCOGER UN ENZIMA:

Como ya se ha comentado, una de las principales características de los enzimas es su especificidad. La naturaleza del material a ablandar, determinará el tipo a utilizar: proteasas, lipasas o amilasas. Pero también hay que tener en cuenta la naturaleza de otros materiales originales que deben ser conservados. Una vez escogido el tipo de hidrolasa, el enzima vendrá determinado en función de las condiciones óptimas que requiere: tiene que ser compatible con el tipo de pintura a intervenir.

1.- Actividad específica: característica de cada preparación enzimática comercial, que se expresa en unidades de sustrato transformado / miligramo de preparación enzimática. Si el valor es más alto, significa una más alta capacidad catalítica de una cierta cantidad de enzima.

Por ejemplo: algunas lipasas y la pepsina tienen una actividad específica entre 1500-2000 unidades por miligramo, mientras que las proteasas microbianas, tienen un valor de 0.1-1 unidades por miligramo. Cuando se trata de utilizar enzimas de baja actividad específica, habrá que ajustar otros parámetros que también influyen en su actividad y que son la temperatura y el pH.

2.- pH óptimo por cada enzima. Si el medio acuoso en el que se encuentra el enzima, el pH se aleja de su valor óptimo, su función disminuye.

3.- El coste. Éste varía en función del tipo y su pureza. A más pureza, significa más actividad específica y actividad enzimática pero también un alto coste económico.

CONDICIONES EXPERIMENTALES EN EL USO DE ENZIMAS:

- Utilización del enzima en medio acuoso, ya que la actividad óptima está asociada a las particulares características de éste en medios acuosos. Suelen ser en forma de gel y si hace falta, añadiendo un espesante a base de derivados de la celulosa que aseguran una óptima transparencia y buena conservación.

- pH del medio acuoso lo más estable posible, dentro de unos límites mediante soluciones tampón, que tienen la capacidad de mantener la invariabilidad del pH. En el caso del enzima, es necesario utilizar soluciones tampón de origen biológico, que sean compatibles con las proteínas y que no desnaturalicen los enzimas. La proporción de estas soluciones suele ser unos 100-200 mg de enzima de alta actividad específica hasta 1 mg de los de baja actividad específica por 100 ml. de agua.

- Temperatura óptima en torno a los 35-40°C. Si las condiciones ambientales superan esta temperatura, se produce un ablandamiento y calentamiento de la superficie a tratar y de la solución enzimática. Nunca habría que superar los 45-50°C porque muchos enzimas se transforman en inactivos cuando superan estas temperaturas.

APLICACIONES:

La solución contiene el enzima a la temperatura adecuada y se aplica tamponando sobre una pequeña superficie. El tiempo de aplicación vendrá determinado cada vez y generalmente oscila entre 1 y 10 minutos. Es indispensable, en un tiempo prolongado de aplicación, evitar que el gel enzimático se seque sobre la superficie. Antes de su aplicación será necesario limpiar con agua la superficie donde se aplicará el gel enzimático. Al acabar el tiempo de aplicación, habrá que limpiar tamponando con agua y después una última limpieza con un disolvente volátil (hidrocarburo, esencia de petróleo, white spirit...). Si es necesario repetir la aplicación, habrá que seguir todos los pasos otra vez.

También es posible la aplicación de diferentes tipos de enzimas de forma sucesiva, dejando el enzima proteolítico para el final, porque su acción hidrolítica sobre las proteínas podría ralentizar la acción de los enzimas aplicados anteriormente. Los enzimas deben conservarse refrigerados, teniendo en cuenta que en forma de solución se alteran rápidamente. Pueden ser utilizados durante aproximadamente dos semanas, pero con una sucesiva disminución de actividad específica hasta ser inservibles. La capacidad de los enzimas de disgregar macromoléculas orgánicas hace pensar en otras utilidades aparte de la limpieza de superficies policromadas. Por ejemplo, se pueden utilizar para eliminar los residuos de cola orgánica utilizada para un entelado, en el reverso de una tela.

Históricamente, se han utilizado para operaciones de limpieza, la pancreatina, pero con malos resultados. Es una sustancia que contiene todas las actividades enzimáticas principales: proteolíticas, lipídicas y amilíticas. Pero no cumple la principal característica de los enzimas, la especificidad, y por lo tanto no debería utilizarse en soportes materialmente complejos, como son la pintura, donde es muy importante conocer la actividad enzimática que se está utilizando. Si se utiliza un enzima mediante una preparación de gel, existe la ventaja de una menor penetración en el medio acuoso, mientras que la presencia de un enzima reduce el tiempo de aplicación respecto al uso de agua (ver figura). Hasta la aplicación de los enzimas en otras intervenciones de restauración el primer campo de aplicación fue en el de documento. Suele operarse por baño o por inmersión.

GELES ENZIMÁTICOS ESPECÍFICOS:

El año 1988, Richard Wolbers, restaurador de *The Getty Conservation Institute*, expuso los resultados de sus experimentos con geles enzimáticos aplicados a la limpieza de superficies pictóricas durante unas jornadas en Los Ángeles en las que participaron conservadores de diferentes países. Los resultados, publicados bajo el nombre de "New Methods in the Cleaning of Paintings" se han convertido en punto de referencia en la investigación para la aplicación de enzimas en limpieza de superficies pictóricas.

El gel enzimático formulado por Wolbers permite eliminar repintes al óleo situados bajo una capa de barniz intacto y ésta es su fórmula:

Agua + solución tampón Tris-HCl* + Tritón X-100 (humectante) + Lipasa tipos VII (Sigma) (enzima) + hidroxipropilmetilcelulosa (espesante) (10ml: 66.6mg; 0.01ml: 100mg 150mg). *Tris-HCl és (2-amino-2(hidroximetil)1,3-propanediol).

Preparación: se prepara el tampón en agua de Tris-HCl y se lleva a pH 8.5. Se añade el tensoactivo y a continuación el enzima, que hidroliza los aceites secantes y cuya actividad es de 400-900 unidades/mg y se incorpora el espesante agitando. Exige una exacta identificación del sustrato y un elevado tiempo de actuación. Wolbers lo dejó actuar entre 5 y 20 minutos. Es aconsejable su uso sólo en casos extremos.

Los métodos de limpieza mediante geles enzimáticos de R. Wolbers, han sido experimentados durante la década de los 90 por los laboratorios de los principales museos del mundo. En el año 1993 tuvo lugar en Valencia una conferencia de Mr. Raimond White, conservador de la National Gallery, sobre los geles humectantes aplicados a la limpieza de pinturas. Un artículo sobre esta conferencia apareció publicado en el boletín del Grup Tècnic de Conservació-Restauració del mismo año. En este artículo, los autores exponen el peligro de utilizar Tritón X-100, un tensoactivo dispersante, utilizado como humectante secundario, para mantener el barniz a eliminar en suspensión. Es de difícil evaporación y deja residuos sobre la pintura, que pueden causar ciertos problemas. Parece ser que los residuos de Tritón X-100 favorecen las reacciones de oxidación en un tiempo breve y que podrían llevar a confusión al datar una pintura, ya que provocan un envejecimiento prematuro. Ocurre lo mismo con los sustitutos del Tritón X-100, como Ethomeen C-25 (amina alifática terciaria humectante). Crean que se trata de encontrar humectantes que actúen en un pH inferior a 8.5 y que tengan estructura plana para no interactuar con el ácido abiótico y el ácido deoxocólico que actúan como humectantes principales. Como el estudio se encontraba en fase experimental, aconsejaban la utilización de humectantes con precaución y eliminando a conciencia los residuos. También se tendría que encontrar un sustituto del Tritón X-100 que fuera fluorescente y se pudiese detectar bajo la luz ultravioleta. Con todo lo expuesto hasta aquí, sólo decir que la utilización de enzimas en la limpieza de pinturas se encuentra aún en fase experimental, debido a su especificidad, que pide una analítica previa del material del sustrato a eliminar, para formular exactamente el enzima necesario. Esta analítica previa sólo pueden llevarla a cabo los laboratorios de grandes museos y centros de conservación e implica un elevado coste económico y unos medios científicos que no están al alcance de todas las galerías. La ventaja que tendría la utilización de enzimas respecto a la de disolventes tradicionales, sería la baja toxicidad de los primeros, ya que, debido a su origen bioquímico, son clasificados como no tóxicos.

Fotografías:

1-Ejemplo de zona limpiada mediante la aplicación de enzimas.