



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Fernanda do Nascimento Corrêa

**Estudos arqueométricos e de conservação preventiva do patrimônio
cultural de papel**

Rio de Janeiro

2016

Fernanda do Nascimento Corrêa

Estudos arqueométricos e de conservação preventiva do patrimônio cultural de papel

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadores: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa
Dra. Márcia Teresa Soares Lutterbach

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

C824 Corrêa, Fernanda do Nascimento
Estudos arqueométricos e de conservação preventiva do
patrimônio cultural de papel / Fernanda do Nascimento Corrêa
- 2016.
128 f.

Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa.
Orientador: Márcia Teresa Soares Lutterbach.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Química.

1. Conservação de acervo – Preservação de acervo - Teses.
2. Arqueometria – Teses. 3. Patrimônio cultural- Teses I.
Costa, Antonio Carlos Augusto da. II. Lutterbach, Márcia
Teresa Soares III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Química. IV. Título.

CDU 025.85

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese.

Assinatura

Data

Fernanda do Nascimento Corrêa

Estudos arqueométricos e de conservação preventiva do patrimônio cultural de papel

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovada em 26 de setembro de 2016.

Orientadores:

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa
Instituto de Química – UERJ

Dra. Márcia Teresa Soares Lutterbach
Instituto Nacional de Tecnologia - MCTI

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Gisele Birman Tonietto
Departamento de Química - PUC-Rio

Dr. Walter Barreiro Cravo Junior
Instituto Nacional de Tecnologia - MCTI

Prof.^a Dra. Dalva Cristina Baptista do Lago
Instituto de Química - UERJ

Dra. Sonia Couri
Instituto de Química - UERJ

Prof.^a Dra. Marta Antunes Pereira Langone
Instituto de Química - UERJ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os familiares e amigos que verdadeiramente sempre torceram
pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido professor e orientador, Antonio Carlos Augusto da Costa, pelo apoio, atenção, amizade e, principalmente, generosidade, tornando este trabalho muito agradável e prazeroso de desenvolver.

À minha co-orientadora Márcia Teresa Soares Lutterbach, pela colaboração e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo fomento à pesquisa. Número do Processo: E-26/101.732/2014.

Às instituições parceiras, que colaboraram com análises de fundamental importância para o desenvolvimento do meu trabalho: Pontífica Universidade Católica (PUC-RJ) e Instituto Nacional de Tecnologia (INT).

À Márcia Carreira, pelo apoio técnico e pelo carinho.

Ao colega Gustavo Sant'anna pela ajuda e parceria no laboratório.

Aos secretários do programa de pós-graduação em engenharia química, Marco Antônio e Renata, por sempre me atenderem muito bem.

Aos meus familiares e amigos, aos quais dedico mais essa vitória. Em especial aos meus pais, minha irmã, meu tio de coração, Flávio Roberto e em memória de sua esposa, Marinalva; que representam a parte mais importante da pessoa digna que eu me tornei.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

CORRÊA, Fernanda do Nascimento. *Estudos arqueométricos e de conservação preventiva do patrimônio cultural de papel*. 2016. 128f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O patrimônio cultural de papel engloba documentos antigos que devem ser preservados, por apresentarem risco de deterioração. A conservação preventiva é a melhor forma de proteger tais objetos, e, para isso, é necessário se ter o conhecimento de métodos analíticos adequados para cada caso específico de dano. A Arqueometria oferece um grande leque de ferramentas que contribuem para o estudo, conservação e tratamento da herança cultural. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi investigar o emprego de diversas ferramentas arqueométricas para a preservação e conservação preventiva do patrimônio cultural de papel. No primeiro capítulo a microbiota presente em uma biblioteca pública especializada foi caracterizada através do emprego de microbiologia clássica e biologia molecular e a concentração mínima inibitória de um agente químico sobre o crescimento das espécies isoladas foi investigada. Os resultados indicaram a ausência de contaminação cruzada na biblioteca e a boa eficiência do ortofenilfenol como fungistático na concentração de 400 mg.L⁻¹. No segundo capítulo foram estudadas tintas ferrogálicas preparadas a partir de taninos comerciais hidrolisáveis e condensados, contendo diferentes concentrações de ferro, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) como técnica de investigação de depósitos de ferro não reativos em superfície de papel, e determinou-se, por ensaios químicos, o conteúdo de taninos totais e condensados nas tintas, visando confirmar os resultados obtidos por MEV. Os resultados mostraram que os taninos hidrolisáveis da *Castanea sativa* e *Caesalpinia spinosa* foram mais estáveis devido à maior reatividade com o ferro, enquanto que os taninos condensados da *Acacia* sp. apresentaram menor reatividade, contribuindo assim para a formação de agregados na superfície das tiras de papel, podendo-se concluir que os padrões de degradação podem ser explicados em termos de reatividade. Além disso, a determinação da concentração de taninos condensados explicou a formação de partículas de agregado em observações microscópicas. No capítulo três estudou-se, com o auxílio da espectrometria de absorção atômica (EAA), a dessorção do ferro não reativo de quatro tintas ferrogálicas com diferentes concentrações de ferro, avaliando a cinética de remoção do ferro por duas soluções de fitato de cálcio, aplicando os modelos de pseudo-primeira e segunda ordem. Os resultados apresentaram uma cinética de remoção em torno de 15 minutos, por ambas as soluções de fitato. A solução mais diluída de fitato de cálcio mostrou ser tão eficiente quanto a solução mais concentrada. O modelo cinético de pseudo-primeira ordem ajustou melhor os dados experimentais, confirmando uma cinética rápida; que permite a introdução de banhos simultâneos numa ampla gama de documentos. No capítulo quatro, oito tipos diferentes de papel foram estudados com relação à sua capacidade de impregnação de tintas ferrogálicas, ao acúmulo de ferro não reativo e à susceptibilidade fúngica. As técnicas EAA e MEV mostraram que a interação das tintas com os papéis depende diretamente das características particulares desses suportes. Além disso, a corrosão química, provocada pelo uso da tinta ferrogálica, favoreceu a corrosão microbiológica por fungos em todos os tipos de papel.

Palavras chaves: Patrimônio cultural. Arqueometria. Biologia molecular. Microscopia eletrônica de varredura. Espectrometria de absorção atômica.

ABSTRACT

CORRÊA, Fernanda do Nascimento. *Archaeometric and preventive conservation studies of cultural heritage of paper*. 2016. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Cultural heritage includes, mostly, ancient materials that must be preserved, and that are subjected to deterioration. Preventive conservation is the best way to protect the materials, and, for that purpose, it is necessary to have suitable knowledge on analytical methods for each specific damage on the materials. Archaeometry can offer a wide range of possibilities that can contribute for the study, conservation and treatment of the cultural heritage. Thus, the aim of this study was to investigate the use of various archeometric tools for the preservation and preventive conservation of cultural heritage of paper. In the first chapter, a study of the microbiota present in specialized public library was characterized via classic microbiology and molecular biology and the inhibitory concentration of a chemical compound was established on the growth of the single species. The results indicated the lack of cross contamination in the library and a good efficiency of ortophenylphenol as a fungistatic agent in the concentration of 400 mg.L⁻¹. In the second chapter it was studied iron-gall inks prepared from hydrolysable and condensed tannins, at different iron concentrations, using scanning electron microscopy (SEM) technique as research to observe nonreactive iron deposits in paper surface, and it was determined by chemical tests, the content of total and condensed tannins in the inks, to confirm the results obtained by SEM. The results indicated that in the first simulation hydrolysable tannins from *Castanea sativa* and *Caesalpinia spinosa* were more stable due to the higher reactivity with iron, while condensed tannins from *Acacia* sp. presented reduced reactivity, contributing for the formation of aggregates in the surface of paper strips, leading to the conclusion that degradation patterns could be explained in terms of reactivity. Beyond this, the determination of tannins concentration explained the formation of aggregate particles by microscopy. In chapter three a study with the help of atomic absorption spectrometry (AAS), desorption of non-removal iron for four iron gall inks with different concentrations of iron was conducted, evaluating the kinetics of iron-removal for two calcium phytate solutions applying pseudo first-order and second-order models. The results presented an iron kinetics removal around 15 minutes for both phytate solutions. The most diluted calcium phytate solution proved to be as efficient as the most concentrated solution. Pseudo first-order equation fit experimental data more precisely, thus confirming the rapid kinetics, confirming the possibility of introducing simultaneous baths in a wide range of documents. In chapter four, eight different types of paper were studied with respect to its capacity to impregnate iron gall ink, the non-reactive iron accumulation and fungal attack susceptibility. The EAA and SEM techniques showed that the interaction of inks with the papers directly depends on the particular characteristics of these supports. Furthermore, the chemical corrosion caused by the use of iron gall ink favored microbiological corrosion by fungi in all types of paper.

Keywords: Cultural heritage. Archaeometry. Molecular biology. Scanning electron microscopy. Atomic absorption spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estante com presença de cal solubilizada.	27
Figura 2 - Livros danificados e com aparente presença de fungos.	27
Figura 3 - Etapa de seleção dos livros química e biologicamente danificados.	28
Figura 4 - Estatística da seleção e tratamento dos livros na biblioteca após o alagamento.	32
Figura 5 - Capas de couro danificadas pela umidade e pela cal solubilizada.	33
Figura 6 - Fungos identificados no ar e nas coleções especiais de livros de uma biblioteca em um museu científico.	34
Figura 7 - Mecanismo de reação de oxidação do tanino na presença de sulfato ferroso.	43
Figura 8 - MEV das tiras de papel Whatman não impregnadas com tinta ferrogálica (ampliação de 400x).	52
Figura 9 - MEV das tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas do Grupo 1 (razão ferro:tanino 1,0:5,5).	53
Figura 10 - MEV das tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas do Grupo 2 (razão ferro:tanino 2,0:5,5).	54
Figura 11 - MEV das tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas do Grupo 3 (razão ferro:tanino 3,0:5,5).	55
Figura 12 - Cinética de remoção do ferro em solução de fitato 1, 1ª e 2ª lavagem, respectivamente.	73
Figura 13 - Cinética de remoção do ferro em solução de fitato 2, 1ª e 2ª lavagem, respectivamente.	74
Figura 14 - Spot test das amostras de papéis.	93
Figura 15 - Amostra G sem impregnação de tinta: presença de micro-organismos.	99
Figura 16 - Imagens das amostras de papéis em branco e impregnadas (continua).	100
Figura 17 - Resultados do crescimento fúngico nas amostras de papéis sem tinta ferrogálica.	105
Figura 18 - Resultados do crescimento fúngico nas amostras de papéis com a tinta 1. .	106
Figura 19 - Resultados do crescimento fúngico nas amostras de papéis com a tinta 2. .	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados do tratamento de fungos sobre nutriente Agar Sabouraud Dextrose com ortofenilfenol em duas concentrações.	39
Tabela 2 -	Composição química das tintas ferrogálicas confeccionadas.	48
Tabela 3 -	Concentração de taninos totais em extrato vegetal.	56
Tabela 4 -	Concentração de tanino total em espécie Acacia.	58
Tabela 5 -	Quantificação de taninos condensados em amostras vegetais comerciais. ...	59
Tabela 6 -	Composição química das tintas ferrogálicas confeccionadas.	68
Tabela 7 -	Composição química das soluções de fitato para a extração de ferro.	69
Tabela 8 -	Quantidade média de ferro removido na 1ª lavagem em função da concentração de ferro na tinta.	77
Tabela 9 -	Remoção de ferro em função da tinta.	78
Tabela 10 -	Composição química das tintas ferrogálicas confeccionadas.	84
Tabela 11 -	Especificações dos papéis e sua respectiva imagem (continua).	86
Tabela 12 -	Solução para o preparo do meio de cultura sem fonte de carbono.	91
Tabela 13 -	Resultado da concentração de ferro na solução digestora por espectrometria de absorção atômica, de acordo com as condições a, b e c descritas acima.	96

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA DE CONTAMINANTES DE ACERVOS CIENTÍFICOS EM UMA BIBLIOTECA PÚBLICA ESPECIALIZADA	17
1.1	Revisão bibliográfica	17
1.1.1	<u>O papel</u>	17
1.1.2	<u>Os fungos</u>	19
1.1.3	<u>Biologia molecular</u>	22
1.1.4	<u>Métodos químicos</u>	23
1.2	Metodologia	26
1.2.1	<u>Considerações gerais</u>	26
1.2.2	<u>Monitoramento e identificação microbiológica por biologia molecular</u>	28
1.2.3	<u>Tratamento químico de livros selecionados contaminados com fungos</u>	31
1.3	Resultados e discussão	31
1.3.1	<u>Monitoramento e identificação microbiológica por biologia molecular</u>	31
1.3.2	<u>Tratamento químico de livros selecionados contaminados com fungos</u>	39
	Conclusões	40
2	CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE TINTAS FERROGÁLICAS DE DIFERENTES FONTES DE TANINOS – APLICAÇÕES PARA PATRIMÔNIO CULTURAL	42
2.1	Revisão bibliográfica	42
2.1.1	<u>Tintas ferrogálicas</u>	42
2.1.2	<u>Taninos vegetais</u>	44
2.1.3	<u>Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura</u>	46
2.2	Metodologia	47
2.2.1	<u>Confecção das tintas ferrogálicas</u>	47
2.2.2	<u>Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura</u>	48

2.2.3	<u>Obtenção dos extratos de tanino bruto a partir de taninos vegetais</u>	49
2.3	Resultados e discussão	50
2.3.1	<u>Confecção das tintas ferrogálicas</u>	50
2.3.2	<u>Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura</u>	51
2.3.3	<u>Quantificação dos taninos totais</u>	56
2.3.4	<u>Quantificação dos taninos condensados</u>	58
	Conclusões	60
3	ESTUDO CINÉTICO DA REMOÇÃO DE FERRO NÃO REATIVO EM TINTAS	61
3.1	Revisão bibliográfica	61
3.1.1	<u>Corrosão</u>	61
3.1.2	<u>Fitato de cálcio</u>	64
3.1.3	<u>Cinética de dessorção</u>	66
3.2	Metodologia	68
3.2.1	<u>Confecção das tintas ferrogálicas</u>	68
3.2.2	<u>Impregnação das tintas em tiras de papel</u>	69
3.2.3	<u>Solução de fitato de cálcio para remoção de Fe²⁺ não reativo</u>	69
3.2.4	<u>Cinética da remoção de ferro pelas soluções de fitato</u>	70
3.2.5	<u>Determinação analítica do ferro</u>	70
3.3	Resultados e discussão	71
3.3.1	<u>Cinética da remoção de ferro pelas soluções de fitato</u>	71
3.3.2	<u>Modelagem cinética da remoção de ferro</u>	78
	Conclusões	79
4	PAPÉIS ÁCIDOS E ALCALINOS IMPREGNADOS COM TINTAS FERROGÁLICAS – ESTUDOS DE ESTEQUIOMETRIA, ESTABILIZAÇÃO DA OXIDAÇÃO DO FERRO, MICROSCOPIA E SUSCEPTIBILIDADE FÚNGICA	81
4.1	Revisão bibliográfica	81
4.1.1	<u>Degradação do papel</u>	81
4.1.2	<u>Encolagem</u>	83
4.2	Metodologia	84
4.2.1	<u>Confecção das tintas ferrogálicas</u>	84

4.2.2	<u>Papéis</u>	85
4.2.3	<u>Espectroscopia de absorção atômica</u>	90
4.2.4	<u>Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura</u>	90
4.2.5	<u>Investigação microbiológica</u>	91
4.3	Resultados e discussão	92
4.3.1	<u>Tintas ferrogálicas</u>	92
4.3.2	<u>Papéis</u>	92
4.3.3	<u>Espectroscopia de absorção atômica</u>	95
4.3.4	<u>Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura</u>	98
4.3.5	<u>Investigação microbiológica</u>	104
	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICE – Trabalhos publicado e submetido em artigos científicos	128

INTRODUÇÃO

O patrimônio cultural, como engloba diversos materiais tais como artefatos, documentos, monumentos, etc. de valor patriótico e de importância histórica. Apesar do seu valor inestimável, em muitos casos, esses elementos não são bem conservados, seja pelo mau manuseio e/ou armazenamento ou, e principalmente, por fatores climáticos; e podem sofrer danos às vezes irreversíveis.

A necessidade de se preservar o patrimônio cultural vem, finalmente, se tornando consciente nos últimos anos. A ideia de "conservação preventiva" vem sendo entendida como necessária, mais eficaz e ainda mais econômica que a "conservação corretiva" ou de restauração do objeto degradado. Entretanto a conservação preventiva exige um grau de conhecimento elevado, não só do objeto, mas dos fenômenos e variáveis envolvidas, pois o emprego de técnicas sofisticadas não apresentará resultado algum se, preventivamente, a conservação não estiver sendo devidamente aplicada (Güths, 2006).

O desenvolvimento de métodos analíticos não destrutivos na análise de obras de arte e objetos arqueológicos vem adquirindo crescente interesse, possibilitando a datação desses artefatos e ainda fornecendo informações acerca das técnicas utilizadas e do local de manufatura, permitindo estabelecer, desta forma, sua autenticidade, além de possibilitar uma avaliação de tratamentos de conservação e restauração (Calza *et al.*, 2007).

Desta forma, a caracterização dos objetos arqueológicos através de análises físicas e químicas avançadas permite uma melhor preservação e conservação do patrimônio cultural.

Neste sentido, a necessidade de uma área de pesquisa interdisciplinar envolvida no desenvolvimento e uso de métodos científicos, a fim de responder a questões relacionadas com a história da humanidade, levou à criação da arqueometria; do grego *arkhé*, que significa "princípio de tudo" e *metria*, "medida". A arqueometria permite responder a questões relacionadas com a história da civilização por uso e desenvolvimento de métodos científicos de outras disciplinas, como física, química, biologia, etc. (Vázquez *et al.*, 2008).

O estudo arqueométrico inicialmente era entendido como a aplicação de tecnologias físicas inovadoras para a datação de achados arqueológicos que eram difíceis de datar por métodos arqueólogos convencionais, como estratigrafia. Atualmente a arqueometria significa, de um modo geral, a aplicação de métodos e técnicas experimentais modernas em datação, investigação e identificação de materiais que constituem artefatos antigos e as consequências de tais estudos nas áreas relacionadas de arqueologia e história da arte. Então, fica claro que a

arqueometria é um assunto interdisciplinar, abrangendo ambos os campos científicos e humanísticos, incluindo a química analítica, a química orgânica e as ciências biológicas, física e por último, antropologia, história, história da arte e arqueologia, ciência da conservação e museologia. Para Spizzichino e Fantoni (2014) trabalhar com artefatos vulneráveis, frágeis e raros que muitas vezes têm uma importância social associada ao seu valor histórico é um desafio.

Syta *et al.* (2014) ressaltam que as investigações arqueométricas de objetos do patrimônio cultural exigem um profundo entendimento de um contexto histórico do artefato, bem como o reconhecimento da natureza físico-química geral das amostras analisadas. As ferramentas que o campo da arqueometria necessita a fim de alcançar resultados bem sucedidos são principalmente técnicas analíticas. As técnicas analíticas desempenham um papel importante, a fim de fornecer informação química sobre os bens culturais. Portanto, vários requisitos devem ser cumpridos para a técnica selecionada. Em primeiro lugar é de caráter obrigatório que se conserve as características intrínsecas da amostra, considerando que, na maioria dos casos, o objeto de estudo é original e insubstituível (Vázquez *et al.*, 2008).

Em particular, é necessário o desenvolvimento de técnicas cada vez mais apropriadas que, por si só ou em combinação, podem proporcionar tanto quanto possível uma informação completa, apresentando-se como uma relevante alternativa para a conservação preventiva (Spizzichino e Fantoni, 2014). O uso racionalizado das técnicas é o ponto chave para sua adequada aplicação. Portanto, definir quando e com que objetivo se deve utilizá-las se torna decisivo para o devido aproveitamento dos seus potenciais.

O uso da varredura a laser aerotransportado (Baltsavias, 1999) em estudos de monitoramento da herança cultural norueguesa nos últimos 50 anos (Risbøl *et al.*, 2015), da cromatografia líquida de alta performance para detecção de corantes naturais em lãs de tapetes antigos (Manhita *et al.*, 2014), do conjunto de técnicas de micro fluorescência de raio x, difração de raio x, microscopia Raman, espalhamento Raman de superfície reforçada, reflexão de infravermelho com transformada de Fourier na região média, e técnicas espectroscópicas de reflexão UV-vis e de fluorescência UV-vis para a caracterização de pigmentos inorgânicos e corantes orgânicos em dois antigos manuscritos marroquinos (El Bakkali *et al.*, 2014), do sequenciamento de DNA para identificar as comunidades de fungos encontrados em biofilmes em paredes de barro (taipa, pau-a-pique e adobe) de edifícios históricos rurais e semiurbanos representantes da primeira fase do ciclo do café brasileiro (1820-1880) (Fazio *et al.*, 2015) e até mesmo do uso de folhas de plantas como barreiras biológicas usadas na proteção do

patrimônio cultural, contra a presença de metais pesados (Kocić *et al.*, 2014) são algumas das diversas aplicações inseridas no conceito de arqueometria.

As formas de degradação de objetos, monumentos e acervos de importância histórica são diversas, mas quase todas estão associadas aos níveis de temperatura e umidade relativa do ambiente. Um tipo de degradação de natureza química ocorre por oxidação e hidrólise, que destrói as cadeias de materiais orgânicos, tornando-os frágeis e quebradiços. Contudo em climas quentes e úmidos pode-se considerar que a principal causa de degradação de acervos seja biológica: ataques de insetos, bactérias e fungos. A deterioração causada por esses agentes ambientais e micro-organismos é considerada uma das piores formas de degradação (Gutarowska *et al.*, 2012; Güths, 2006).

Apesar da sua incontestável importância, a produção de trabalhos sobre arqueometria no Brasil ainda é recente, sendo o acervo de artigos nacionais ainda pequeno (Bastos *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2012).

Diante dessas considerações, o objetivo geral da presente tese foi investigar o emprego de diversas ferramentas arqueométricas para a preservação e conservação preventiva do patrimônio cultural de papel através de diversos estudos que foram divididos em quatro partes, com seus respectivos objetivos específicos, provendo-se de amostras tanto sintéticas como reais para a avaliação da eficiência das técnicas utilizadas. Cada parte é composta por revisão bibliográfica, metodologia, resultados e discussão e conclusões.

Na primeira parte foi realizada a caracterização microbiana em uma biblioteca pública especializada através do emprego de microbiologia clássica e biologia molecular. O objetivo específico foi investigar a concentração mínima inibitória de um agente químico sobre o crescimento das espécies isoladas.

Na segunda parte foi feita a caracterização de tintas ferrogálicas confeccionadas com diferentes fontes de taninos comerciais hidrolisáveis e condensados, por microscopia eletrônica de varredura. Os objetivos específicos foram investigar os depósitos de ferro não reativo em superfície de papel e determinar, por ensaios químicos, o conteúdo de taninos totais e condensados, visando confirmar os resultados obtidos por microscopia eletrônica.

Na terceira parte, um estudo cinético da remoção de ferro não reativo em tintas ferrogálicas foi realizado com o objetivo específico de estudar, com o auxílio da espectrometria de absorção atômica, a eficiência de soluções de fitato de cálcio na dessorção do ferro não reativo de diferentes tintas ferrogálicas, preparadas com distintas concentrações ferro, ajustando os resultados aos modelos de pseudo-primeira ordem e segunda ordem.

E, na quarta e última parte, foi feito um estudo com papéis ácidos e alcalinos impregnados com tintas ferrogálicas, no qual os objetivos específicos foram: estudar, com o auxílio da espectrometria de absorção atômica, a digestão química de papéis impregnados com tintas ferrogálicas antes e após o tratamento alcalino com fitato de cálcio; avaliar o efeito da incorporação de tintas ferrogálicas, com diferentes teores de ferro, nestes papéis com distintos tipos de encolagem superficial; obter informações acerca dos efeitos microscópicos decorrentes do tipo de encolagem do papel, utilizando a microscopia eletrônica de varredura como técnica de investigação e; investigar a relação da susceptibilidade fúngica nos papéis com o tipo de encolagem e as tintas ferrogálicas utilizadas.

1 CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA DE CONTAMINANTES DE ACERVOS CIENTÍFICOS EM UMA BIBLIOTECA PÚBLICA ESPECIALIZADA

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 O papel

Desde a sua invenção, o papel tornou-se um dos principais portadores da nossa informação cultural, científica, política, econômica e histórica. Dada à importância deste material, sua preservação é uma questão de grande interesse (Sequeira *et al.*, 2012). As bibliotecas e museus são responsáveis pela preservação do nosso patrimônio; eles têm o desafio de preservar milhões de livros impressos em frágeis papéis fabricados por meio de processos rudimentares ao longo de séculos (Egan *et al.*, 1995).

O papel é uma folha fina, feita com pastas de materiais fibrosos, moídos, branqueados e desagregados em água, secos e consolidados por procedimentos especiais. Suas aplicações são muito variadas, pois nele se escreve, imprime, desenha, pinta, entre outros usos. Os principais componentes do papel são as fibras ou material fibroso e os aditivos funcionais: encolante, carga, alvejantes óticos e agentes consolidantes. Do ponto de vista químico, a fibra ou material fibroso contém basicamente celulose e, em menor quantidade, polímeros como lignina, hemicelulose e outras macromoléculas aderidas fortemente às estruturas fito tissulares (Callol, 2013).

Como todos os outros materiais, o papel é degradado inevitavelmente ao longo do tempo. Sua taxa de deterioração pode, no entanto, ser acelerada por fatores endógenos, como acidez, íons metálicos, lignina ou produtos de degradação, e fatores exógenos, como calor, umidade, luz UV, oxigênio, poluentes ou biodeteriorantes (Strlic *et al.*, 2005); por isso, o mecanismo de degradação da celulose em si ainda é questionado.

No que se refere às técnicas para investigar a composição do papel, pouca atenção foi dada no passado para este tema, devido às dificuldades de análise e aos materiais altamente heterogêneos de documentos históricos. No entanto, é fato que a fonte de celulose (trapos linho, algodão, polpa de madeira), compostos de encolagem (amido, gelatina, resina), revestimentos (amido, adesivos naturais/sintéticos), compostos inorgânicos (carbonatos, sulfatos, argila) e contaminantes (metais pesados) desempenham um papel importante no ataque de micro-organismos. Por se tratar de um material orgânico, o papel está sujeito a

numerosos processos de biodeterioração, que podem causar a degradação irreversível de importantes documentos e obras de arte. Muitos fatores químicos e físicos podem afetar estes processos e o seu comportamento, e os fungos parecem desempenhar um papel-chave na biodeterioração de materiais de papel (Zotti *et al.*, 2008).

A decomposição da celulose por fungos celulolíticos é devido à produção e secreção de um complexo de enzimas extracelulares - celulases - que hidrolisam a macromolécula de celulose em pequenos açúcares solúveis em água que podem então ser processados pelos fungos (Gallo *et al.*, 1998). A deterioração causada por estas enzimas e também pela excreção de ácidos orgânicos causa uma perda gradual de força mecânica do papel. Em uma fase final de deterioração, o papel não pode ser manuseado sem a desintegração e perda de informação (Abdel-Kareem, 2010; Valentin, 2007).

Ao longo da história, vários métodos têm sido utilizados para prevenir e conter a deterioração fúngica em materiais à base de papel.

A prevenção e tratamento da biodeterioração de papel é uma das principais preocupações no campo da conservação do papel. A combinação da alta bioreceptividade do papel com as condições de armazenamento inadequadas ou situações de emergência relacionadas com a água, torna este material muito susceptível à deterioração microbiana. A bioreceptividade do papel para fungos é considerada alta devido a sua higroscopicidade e composição (celulose, hemicelulose, lignina, adesivos, colas), o que representa uma fonte de carbono abundante para estes organismos heterotróficos (Sequeira *et al.*, 2012).

Embora algum esforço tenha sido feito no passado para caracterizar documentos históricos por meio de espectroscopia de infravermelho, a estrutura multicomponente do papel produz uma grande sobreposição de bandas, que permite a interpretação dos resultados obtidos apenas nos casos mais simples (Zotti *et al.*, 2008).

Com relação ao couro utilizado nas encadernações, o colágeno em couro curtido é mais resistente ao crescimento de fungos do que em couro não curtido. Os couros curtidos ao cromo são relativamente impermeáveis, entretanto, os couros curtidos com taninos vegetais são consideravelmente menos. Os couros de capas de livros são, infelizmente, couros curtidos com taninos vegetais. Os couros curtidos ao cromo são usados principalmente em calçados, bagagem e outros itens.

Estudos indicam que o crescimento de fungos em couro não é afetado do mesmo modo que na celulose. Os fungos, aparentemente, não atacam a complexidade do couro curtido (lubrificantes, materiais de acondicionamento e acabamento) em si. De acordo com a

literatura, a umidade relativa do ambiente, em vez dos altos danos pelos fungos, é a principal causa da deterioração de couro.

O couro especialmente utilizado para encadernar livros é atualmente curtido com taninos vegetais não-hidrolisáveis (Florian *et al.*, 1994).

1.1.2 Os fungos

Compostos por milhares de gêneros e espécies, os fungos são particularmente relevantes devido a sua forte adaptabilidade e resiliência a ambientes menos favoráveis. Embora eles sejam incrivelmente benéficos em algumas áreas, o mundo está mais acostumado a ver os fungos como uma ameaça à saúde, e não é errado pensar assim. No entanto não é só a saúde humana que está em perigo quando o contato próximo é estabelecido com algumas espécies de fungos e a sua presença é mantida em ambiente contaminado. Os fungos podem hidrolisar uma grande variedade de polímeros como um resultado das suas eficientes enzimas hidrolíticas.

Dependendo do ambiente, fungos de diferentes gêneros podem ser encontrados, mas, independentemente das condições de umidade e temperatura, alguns fungos tipicamente cosmopolitas são identificados (Pinheiro, 2016).

Na natureza, os fungos têm uma função necessária como parte do ciclo através do qual a matéria orgânica é reutilizada. Este ciclo é dependente da temperatura e umidade. Os fungos são capazes de viver em atividade de baixo d'água, eles estão perfeitamente adaptados a ambientes internos e crescem em nichos microclimáticos causados pela condensação, falta de ventilação ou retenção de líquidos por materiais higroscópicos (Sterflinger e Pinzari, 2012; Florian *et al.*, 1994). A biodegradação de materiais orgânicos é muito importante como um processo de reciclagem, no entanto, em alguns casos, este processo destrói também registros históricos, o que resulta na perda de informações valiosas (Mesquita *et al.*, 2009).

Os fungos são os agentes mais importantes da biodeterioração em museus, salas de armazenamento dos museus, nas bibliotecas, em arquivos e coleções e nos estúdios de restauração, e, nesses ambientes, o controle ambiental é um instrumento essencial para prevenir a germinação e crescimento.

Ambos, o potencial deteriorante e patogênico de fungos, têm consequências para a manipulação de objetos, sua conservação, sua limpeza e seu armazenamento, bem como para a segurança e saúde das pessoas do museu (funcionários, restauradores e visitantes) (Sterflinger e Pinzari, 2012).

De acordo com Silva *et al.* (2006), os países tropicais, como o Brasil, onde a alta umidade e temperatura são frequentes, têm condições ambientais que incentivam o desenvolvimento desses micro-organismos. Esta situação pode trazer riscos para a saúde humana pela contaminação por fungos de livros e documentos – as micotoxinas produzidas pelos fungos entram no corpo através da inalação de esporos toxicogênicos e contato dérmico direto, e pode causar várias doenças das quais, infecções das vias aéreas, micoses, problemas do sistema imunológico, e asma são exemplos – além de causar a deterioração destas publicações, que às vezes são antigas e raras (Mesquita *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2002).

Segundo Florian *et al.* (1994), pelo menos 180 gêneros ou espécies de fungos são conhecidos como destruidores de celulose. Os gêneros de fungos mais importantes encontrados nos museus são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichodermae* e o gênero de levedura *Rhodotorula* com uma elevada afinidade para ambientes osmóticos.

Do ponto de vista da biodeterioração, os fungos que atacam o patrimônio cultural podem ser divididos em dois principais grupos funcionais: (i) fungos oportunistas, que crescem em praticamente todos os tipos de materiais, se houver umidade suficiente. Estes fungos não são capazes de degradar o material enzimaticamente e usá-lo como principal fonte de carbono, e (ii) agentes patogênicos relevantes “reais”, que são capazes de degradar materiais específicos de obras de arte, tais como fungos celulolíticos em papel e fungos queratinolíticos no couro, pelos e penas (Błyskal, 2009). Ambos os grupos podem causar danos grave, mas apenas os fungos que pertencem ao segundo grupo podem deteriorar o material em si.

Os fungos deterioram valiosas peças de arte estética, química e mecanicamente e por degradação de componentes orgânicos. Materiais históricos feitos de papel e pinturas a óleo com quantidades elevadas de ligantes orgânicos são especialmente suscetíveis à deterioração fúngica (Sterflinger e Pinzari, 2012).

O mecanismo pelo qual os fungos degradam o papel se dá pela hidrólise de uma ampla variedade de polímeros, incluindo celulose, como um resultado das suas enzimas degradativas eficientes (Bennett e Faison, 1997). As enzimas celulolíticas têm um papel importante em processos de biodegradação naturais de plantas em que materiais lignocelulósicos são degradados eficientemente por fungos celulolíticos, bactérias, actinomicetos e protozoários. Na indústria, estas enzimas têm encontrado novas aplicações para a produção de açúcares

fermentáveis e etanol, ácidos orgânicos, detergentes e outras substâncias químicas (Ito *et al.*, 1998). Celulases fúngicas são enzimas induzíveis que são normalmente excretadas para o meio ambiente (Bhat e Bhat, 1997) e que dependem do tipo celulósico (cristalina ou amorfa), que atua sobre o organismo (Ortega *et al.*, 2001). Os fungos celulolíticos, que utilizam a celulose como substrato, quando crescendo em condições ambientais favoráveis, podem destruir material de papel de forma muito rápida (Adamo *et al.*, 2003).

Com base na natureza onipresente de mofo em arquivos, bibliotecas e museus, a utilização sistemática de índices de fungos pode fornecer informações práticas para a conservação, sendo uma ferramenta útil para o controle integrado de pragas em bibliotecas, arquivos e museus (Abe e Murata, 2014).

Uma possível remediação de contaminação fúngica é normalmente cara e existe um risco de danos maiores devido aos materiais degradados (Sequeira *et al.*, 2012). Neste caso, quanto mais cedo for possível detectar o crescimento de fungos, menor a necessidade de tratamentos invasivos para remediar a contaminação fúngica.

Várias alternativas estão sendo testadas contra a proliferação de fungos em objetos e documentos do patrimônio cultural. A maioria das alternativas baseia-se na utilização de produtos químicos, geralmente eficazes contra fungos, mas, por vezes prejudiciais para os objetos testados, dependendo da sua estrutura química.

A fim de evitar a contaminação por fungos ou tratar objetos já contaminados é necessário uma abordagem integrada que inclui o controle de temperatura, material de limpeza específico e aplicação de biocidas cuidadosamente selecionados (Sterflinger e Pinzari, 2012).

De acordo com Zotti *et al.* (2008), tendo conhecimento que as condições ambientais (por exemplo, temperatura, umidade, luz) influenciam o processo e a taxa de biodeterioração do papel por um grande número de espécies de fungos, muitas atividades de pesquisas são dedicadas a definir protocolos otimizados de isolamento à base de DNA. De fato, vários trabalhos recentes que lidam com manchas de papel, por exemplo, adotam a análise por DNA, a fim de identificar os fungos envolvidos em processos de coloração. Apesar do objetivo deste tipo de análise, algumas questões surgem ao observar a lista de espécies de fungos detectados – muitas vezes é difícil de explicar e compreender a sua presença. Na verdade, essas espécies são certamente celulolíticas, mas a sua contribuição em biodeterioração de papel é desconhecida.

1.1.3 Biologia molecular

Um novo conjunto de técnicas moleculares desenvolvidas durante os anos 1990 revolucionaram a investigação microbiana. Entre estas técnicas, a clonagem e a criação de uma biblioteca de genes, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e a hibridização fluorescente in situ com sondas de DNA (FISH) se destacam.

A possibilidade de identificar populações específicas de micro-organismos em seu *habitat* nativo, sem a necessidade de isolá-los vem revolucionando a ecologia microbiana e dando origem a várias novas aplicações em vários campos de pesquisa (Sanz e Köchling, 2007).

A identificação de espécies de fungos isolados de materiais de museus ainda é baseada em estudos morfológicos, utilizando chaves de identificação apropriadas para diferentes grupos taxonômicos. No entanto, a identificação confiável com resolução de espécies estreitamente relacionadas é baseada na análise de *Multi Locus Sequencing Typing* (MLST), incluindo DNAr 18S, DNAr 26S e as regiões ITS (espaçador interno transcrito) 1 e 2. A região ITS é discutida como a candidata mais adequada para DNA com base em código de barras, apesar do fato de que esta região não resolve todas as espécies de fungos.

A fim de detectar também a porção fúngica não cultivável da comunidade de fungos ou para analisar uma contaminação fúngica extinta como uma retrospectiva sobre a história dos objetos, impressões digitais moleculares são realizadas com base na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de DNA a partir de amostras do material. A partir do sequenciamento do fragmento do DNA-alvo amplificado é possível caracterizar as espécies de fungos encontrados em ambientes de acervos utilizando um banco de dados especializado (NCBI, 2014).

O método mais utilizado para analisar o papel e pergaminho é o DGGE. Os genes rRNA amplificados ou de suas sequências de diferentes espécies de fungos revelam diferentes padrões eletroforéticos de migração. Como consequência, a comunidade fúngica de uma amostra pode ser visualizada pelo seu perfil eletroforético. Isto permite a análise da diversidade microbiana de uma amostra específica, sua comparação com a impressão digital de outras amostras, bem como a avaliação e/ou monitoramento de sítios e séries temporais. A PCR em tempo real, além disso, permite a quantificação de uma única espécie ou taxas superiores sobre e dentro das amostras. Recentemente, a aplicação da PCR de transcriptase reversa é otimizada para a sua utilização para medir a atividade dos fungos em papéis e pergaminhos, bem como para monitorar a expressão de um único gene que é responsável pela

atividade deteriorante (por exemplo, genes que codificam celulase). Isso ajuda a compreender os processos de biodeterioração fúngica como uma grande base para elaborar e aperfeiçoar os métodos de prevenção e tratamento (Sterflinger e Pinzari, 2012; Massart e Jijakli, 2007).

No atual estudo a identificação filogenética foi realizada por meio de técnicas de biologia molecular, onde a lise celular foi realizada ao longo de três ciclos de congelamento/descongelamento, seguidos por extração de DNA com um kit comercial. O gene que codifica a região ITS foi amplificado utilizando o conjunto de iniciadores ITS-5 (senso, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS-4 (anti-senso, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Os produtos da reação em cadeia polimerase (PCR) foram purificados, utilizando um kit específico para este objetivo, e depois sequenciados. As chaves de identificação foram baseadas em procedimentos padrão (Ellis, 2001; Barnett e Hunter, 1972).

1.1.4 Métodos químicos

A filtração de ar para remover materiais particulados e boas práticas de manutenção que impedem a acumulação de poeira pode reduzir a incidência de crescimento de fungos, mas não pode eliminá-los completamente. Os esporos dos fungos e seu potencial para crescer estão presentes em todos os ambientes (Florian *et al.*, 1994).

Um largo espectro de tratamentos químicos e não químicos em massa tem sido utilizado para matar microfungos que atacam objetos feitos de papel, numa tentativa de inibir a degradação deste e realizar uma desinfecção recente e/ou progressiva. Os tratamentos químicos incluem biocidas líquidos e fumigação com gases. Os tratamentos tópicos com substâncias químicas podem ser úteis, mas a eficácia depende da sensibilidade das espécies de fungos individuais e da tolerância do suporte tratado (Sterflinger e Pinzari, 2012).

As substâncias químicas antifúngicas agem sobre os fungos através da interação entre os seus ingredientes ativos e os sítios do alvo específico sobre e dentro das células microbianas. A sua eficácia pode estar relacionada à estrutura química e as propriedades químicas e físicas (Sequeira *et al.*, 2012).

A maioria dos biocidas utilizados para a proteção do material pode ser caracterizada de acordo com seu mecanismo de ação como sendo por membranas ativas ou eletrofilicamente ativos.

Biocidas por membrana ativa incluem: álcoois, fenóis, ácidos, salicilanilidas, carbanilidas, dibenzamidinas, biguanidas, sais de amônio quaternário, e antifúngicos azóis.

Estes biocidas agem por revestimento da parede celular por adsorção (formando uma película fina sobre a sua superfície), e causando alterações na membrana externa e ao longo da parede da célula. Ao perder a sua integridade, estas barreiras permitirão que o biocida acesse a membrana citoplasmática, onde irá causar os seus efeitos letais.

Biocidas eletrofilicamente ativos incluem: aldeídos, compostos com um grupo vinila na posição α , β em um grupo eletronegativo, compostos que tem um átomo de halogênio ativado na posição α e/ou um grupo vinila em um grupo eletronegativo, compostos com uma ligação N-S ativada como um elemento toxicofórico estrutural (fragmento molecular responsável por uma resposta tóxica dos fármacos direta ou indiretamente), e compostos organometálicos. Quanto maior for a eletrofilicidade do biocida, maior será a sua eficácia antimicrobiana. Estes compostos são atraídos para os componentes da célula microbiana com alta densidade de elétrons, tais como componentes nucleofílicos. Por reação através da adição ou substituição eletrofílica, os biocidas ativos eletrofilicamente podem levar à inativação das enzimas (Paulus, 2004).

Existem vários derivados fenólicos com propriedades conservantes utilizados como desinfetante. Estes compostos são antifúngicos de membrana ativa, causando, principalmente, danos à membrana plasmática dos fungos (Russell, 2003). Assim como os ácidos, os derivados do fenol dissociam íons de hidrogênio na solução e são capazes de formar sais. O seu efeito antimicrobiano ocorre apenas no estado não dissociado. Quando o composto é dissociado, seus ânions com carga negativa são repelidos pela superfície carregada negativamente da célula microbiana, e, portanto, não pode exercer os seus efeitos antimicrobianos. Isto significa que, a fim de manter as propriedades antimicrobianas destes compostos num máximo, tem de estar ciente do seu valor de pKa – o pH ao qual 50% do fenol está no estado dissociado (Paulus, 2004). A um pH abaixo do seu pKa, o composto existe como uma espécie neutra, enquanto que o valor acima do seu pKa atingirá uma carga negativa. Deste modo, por exemplo, se um valor de pKa de um fenol é de 5,0, este será mais eficaz a valores de pH abaixo de 5,0.

O ortofenilfenol ($C_{12}H_{10}O$), também conhecido pelo nome comercial Preventol, é um biocida por membrana ativa com um amplo espectro de atividade, abrangendo as bactérias, as leveduras e os fungos (Florian *et al.*, 1994; Valentin e Garcia, 1999; Paulus, 2004). Este composto exibe uma ação antimicrobiana mesmo a baixas concentrações (entre 10 e 50 ppm, pH 5-8) e o seu efeito de inibição aumenta com o aumento do pH (seu pKa é de 11,6) (Paulus, 2004).

Por ser menos tóxico, o uso de ortofenilfenol começou a ser recomendado em substituição àqueles compostos utilizados em câmaras de fumigação. Ele também foi aplicado diretamente nos documentos infestados, por intercalação ou acondicionado com papel de embrulho embebido em uma solução aquosa a 10% m/v. Devido à baixa volatilidade do ortofenilfenol, a sua atividade de fumigação pode durar por seis meses ou mais (Strassberg, 1978). Além disso, esse biocida foi utilizado como um conservante em produtos de restauração, adesivos sintéticos e colas de origem animal (Valentin e Garcia, 1999).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) o ortofenilfenol não é classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos (Grupo 3), embora o sal de sódio de ortofenilfenol seja considerado como um possível carcinogênico para os seres humanos (Grupo 2B) (Sequeira *et al.*, 2012).

A fumigação com óxido de etileno está proibida em alguns países por ser extremamente tóxico, mas ele ainda representa o sistema mais eficaz para tratamento em massa de materiais de biblioteca mofados. A radiação gama é muito eficaz contra fungos e seus esporos. Entretanto, uma vez que a dose para fungos tende a ser consideravelmente alta, este método também afeta muitos materiais e a sua aplicação é restrita. A aplicação de raios gama pode resultar na despolimerização cumulativa da celulose e em características de envelhecimento severas (Adamo *et al.*, 1998; Butterfield, 1987).

Uma grande variedade de materiais e procedimentos fungistáticos e fungicidas tem sido usada para o controle de mofos. Os materiais e procedimentos fungicidas, tais como óxido de etileno, matam os fungos e os esporos dos fungos com um elevado grau de eficácia e confiabilidade. Os materiais e procedimentos fungistáticos, tais como o timol e o ortofenilfenol, inativam os fungos e desencorajam o seu crescimento, mas não obrigatoriamente os matam. Foi verificado que os materiais e procedimentos fungicidas são muito tóxicos e/ou muito prejudicial para materiais de acervos para se recomendar o seu uso continuado. Além disso, nenhum dos materiais tradicionalmente utilizados confere quaisquer proteções residuais, de modo que os materiais que retornam para situações com elevada umidade relativa, tornam-se cada vez mais susceptível a repetidos danos por fungos.

Os procedimentos fungistáticos, especificamente o controle de temperatura e umidade relativa do ar, e o fornecimento de boa circulação de ar são os principais meios de prevenir e parar o crescimento de fungos.

No caso de um grande surto ou um surto envolvendo uma espécie altamente tóxica, profissionais externos podem aconselhar o uso de fungicidas específicos que devem ser aplicados por um profissional licenciado. Eles são mais frequentemente usados para desinfetar

os sistemas de trabalho de dutos, mas alguns podem fornecer proteção residual para áreas de estocagem e materiais de acervos por um tempo limitado. E, segundo Florianet *al.* (1994), nenhum deles foi testado pelos seus efeitos em longo prazo sobre materiais de acervos, sendo que seu uso é um último recurso.

No presente estudo o agente químico ortofenilfenol foi utilizado a fim de agir como fungistático sobre as culturas dos fungos isolados na biblioteca.

1.2 Metodologia

1.2.1 Considerações gerais

Algumas publicações da biblioteca de livros especiais do Museu de Astronomia e Ciências Afins, pertencentes à coleção Brasileira, estavam com sua encadernação de couro aparentemente deteriorada e outras com visível presença de fungos. A área total da biblioteca é de 105 m², sem ar condicionado, ventilada naturalmente. Durante um ano inteiro a temperatura média é de 25±3°C e a umidade relativa média é de 67±15%. O passo imediato foi prosseguir com uma inspeção completa das coleções, especialmente nas coleções Brasileira, Os Pensadores e Documentos Brasileiros, a fim de detectar a quantidade de livros danificados e a fonte do dano químico e/ou degradação biológica. Uma equipe de laboratório foi montada a fim de iniciar os procedimentos necessários para detectar e resolver o problema. Algumas janelas de vidro na biblioteca apresentaram pontos brancos em sua superfície, o que indica claramente que não era apenas água. Estes pontos estavam presentes em várias janelas da biblioteca próximas às estantes. Observou-se que os danos químicos sobre a capa de couro de alguns livros estava relacionada com a presença de cal do teto da biblioteca (Figura 1).

Devido à uma forte tempestade durante esse período, águas pluviais acumularam no telhado do edifício, aumentando a pressão no sentido da biblioteca, solubilizando parcialmente a cal usada para a pintura.

Figura 1 - Estante com presença de cal solubilizada.



Fonte: O autor, 2014.

No entanto, este não foi o principal problema observado; devido a este dano químico inicial, o aumento do nível de umidade abriu espaço para a contaminação microbiana (Figura 2), corroborando com o fato de que o aumento dos níveis de umidade, altamente contribuiu para este fenômeno.

Figura 2 - Livros danificados e com aparente presença de fungos.



Fonte: O autor, 2014

Para resolver este problema, a equipe do laboratório decidiu numerar sequencialmente os livros nas prateleiras, a fim de iniciar, imediatamente, a higienização do espaço e o tratamento químico e remoção física das peças contaminadas provenientes das coleções da biblioteca (Figura 3). Esta seleção durou três dias consecutivos, com uma equipe total de sete técnicos especializados, incluindo conservadores, bibliotecários e bioquímicos. Depois de uma seleção adequada das peças contaminadas, na segunda semana após a inundação, alguns livros foram transferidos para outra sala, a fim de serem tratados quimicamente.

Figura 3 - Etapa de seleção dos livros química e biologicamente danificados.



Fonte: O autor, 2014.

1.2.2 Monitoramento e identificação microbiológica por biologia molecular

De acordo com Horner *et al.* (2008) não existe um método único de amostragem que seja específico e robusto para quantificar de forma confiável o crescimento de fungos. A caracterização microbiológica da microbiota no ar da biblioteca foi feita por sedimentação em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose estéril suplementado com solução de cloranfenicol; um antibiótico de amplo espectro, sendo eficaz contra bactérias Gram-

negativas, Gram-positivas e riquetsias. As amostras foram coletadas a cada metro cúbico de espaço, um metro acima do chão da biblioteca, por 2 horas.

Algumas prateleiras e livros em particular foram monitorados, onde a contaminação por fungos estava claramente presente. Nesse caso, cotonetes estéreis foram usados na superfície de objetos e livros selecionados. Depois de esfregar, os cotonetes contaminados foram colocados dentro de 9,0 mL de água salina 0,9% m/v, seguido de diluições decimais, inoculando 0,1 mL das diluições em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose.

As placas de Petri foram então colocadas dentro de uma câmara de temperatura controlada a 25°C durante 21 dias. Os fungos cultivados sobre as placas foram isolados com o auxílio de cotonetes estéreis em tubos de vidro contendo o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose e armazenados em óleo mineral (Foladi *et al.*, 2013; da Costa *et al.*, 2011).

Após o isolamento de vários fungos, as técnicas de microcultivo foram feitas, seguido de incubação a 25°C, de 7 a 14 dias, dependendo do gênero específico. Após o crescimento, a identificação dos fungos foi realizada inicialmente por meio de observações macroscópicas e microscópicas ópticas, de acordo com protocolos convencionais (Barnett e Hunter, 1972), e, posteriormente, por identificação filogenética. Esta última foi realizada por uma equipe especializada do laboratório de biologia molecular da Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC).

1.2.2.1 Extração de DNA de fungos

Após crescimento em meios específicos, os fungos foram retirados por meio de raspagem da placa de Petri e transferido para um tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi colocado em um cilindro contendo nitrogênio líquido por 5 minutos, aquecido em banho maria à 60°C por 10 minutos e macerado com auxílio de um pistilo. Este procedimento foi repetido por três vezes. Posteriormente, a extração do DNA foi realizada com Kit Ultra Clean Soil Isolation (MO BIO Laboratories) de acordo com as instruções fornecidas pelo vendedor. O DNA foi eluído em 30 mL da solução fornecida no kit e quantificado através da leitura em espectrofotômetro Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

1.2.2.2 Amplificação da região ITS por PCR

Um fragmento de 600 pares de base correspondentes ao gene ITS foi amplificado a partir do DNA genômico utilizando os iniciadores ITS5 (senso, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (anti-senso, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') no termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA). Cada reação incluiu 25 µL de Top Taq Master Mix Kit (PCR Master Mix, Qiagen, Holanda), 0,5 µM de cada iniciador e 5 µL do DNA extraído adicionado a água, num volume total de 50 uL. Uma primeira desnaturação foi realizada a 94 °C durante 4 minutos seguidos de 30 ciclos nas seguintes condições: 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos. O experimento foi encerrado a 72 °C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, EUA), para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados, seguido de sequenciamento adequado (Galvão e Lutterbach, 2014; White *et al.*, 1990). O produto da amplificação foi visualizado através de uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TE 1X.

1.2.2.3 Sequenciamento

Os fragmentos de DNA dos fungos isolados foram submetidos a sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA) em um sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA) com 4 capilares de 50 cm. Os iniciadores ITS-5 (senso) e ITS-4 (anti-senso) foram utilizados para sequenciar a região ± 600 pb e os iniciadores Sadir (senso) e S17 (anti-senso) foram utilizados para sequenciar a região 1500 pb. A concentração dos iniciadores utilizados foi de 3,2 pmol.

Os cromatogramas obtidos do sequenciamento foram submetidos aos programas Chromas Lite, versão 2.01 e Bioedit para análise da qualidade das sequências. As sequências validadas pelos programas foram pareadas às depositadas no banco de dados de DNA do Genbank (NCBI, 2014). Para validar as sequências a ferramenta BLASTn (Basic Alignment Search Tool) foi realizada. Apenas os fragmentos com similaridade acima de 98% são considerados “confiáveis” e anotados.

1.2.3 Tratamento químico de livros selecionados contaminados com fungos

Após a identificação das espécies consideradas agentes contaminantes, um tratamento químico foi realizado a fim de detectar a susceptibilidade do agente químico Preventol (Ortofenilfenol) como fungistático sobre as culturas dos fungos isolados. O produto tem uma solubilidade muito baixa em água e uma elevada solubilidade em etanol e isopropanol. A concentração inibitória mínima do produto, em meio nutriente adequado, é dependente do tipo de espécies, particularmente para os fungos (mg/L): *Alternaria* (100-200), *Aspergillus* (50-200), *Aureobasidium* (35), *Chaetomium* (50-100), *Cladosporium* (40-60), *Mucor* (200), *Penicillium* (35-100), *Rhizopus* (200) e *Trichoderma* (75). Como esta concentração inibitória mínima do produto varia de 35 a 200 mg/L, dependendo do gênero de fungo, foi adotada a maior concentração sugerida, 200 mg/L de Preventol dissolvido em etanol, pulverizado sobre a superfície do meio de cultura antes da inoculação de cada espécie em Sabouraud Dextrose Agar. No entanto, devido à susceptibilidade fúngica do produto não ser descrita no rótulo para todos os fungos identificados, para atingir o objetivo de higienizar a superfície de alguns livros e prateleiras selecionados, uma concentração de 400 mg/L do produto também foi aleatoriamente escolhida e testada, a fim de alcançar efeitos de inibição mínima e eliminação completa de todas as espécies. Para cada gênero fúngico e concentração de ortofenilfenol escolhida, experiências deste conjunto foram realizadas em triplicata.

1.3 Resultados e discussão

1.3.1 Monitoramento e identificação microbiológica por biologia molecular

A Figura 4 apresenta uma visão geral sobre a quantidade total de livros transferidos para o laboratório para a realização dos tratamentos químico e físico.

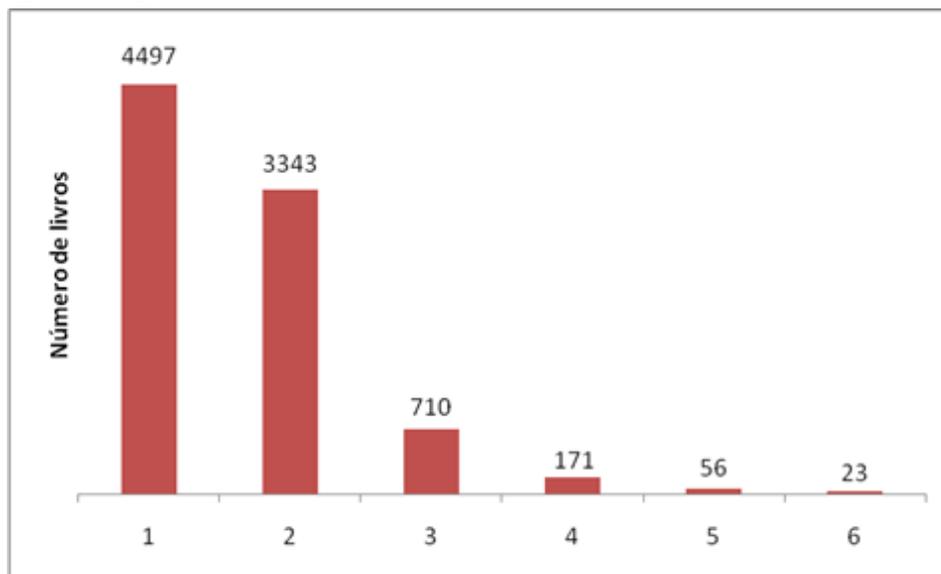
A partir da Figura 4, um total de 250 livros foi separado para o tratamento em laboratório, a maioria deles com problemas associados à presença de fungos ativos. O dano químico promovido pelo ataque da cal nas capas de couro tinha que ser resolvido com uma restauração parcial, um problema solucionado por outra equipe de especialistas.

A principal preocupação com a contaminação microbiológica dos livros estava relacionada à importância das duas coleções bibliográficas afetadas: Brasileira e Os

Pensadores. A primeira delas é de particular importância devido à sua abrangência, cobrindo História, Antropologia, Ciências Políticas e Geografia, Sociologia e Linguística, Economia e Ciências Naturais, com a contribuição de escritores nacionais e estrangeiros que descrevem expedições européias importantes para o Brasil durante o século XIX. A coleção Os Pensadores é uma coleção única no Brasil que se preocupava com a publicação dos escritores mais influentes do conhecimento ocidental. Ambas constituem coleções enormes; a coleção Brasileira possui 357 volumes impressos em sua completa e rara coletânea no Brasil.

Entre as espécies de fungos isolados como resultado desta pesquisa, alguns merecem atenção especial devido à sua possível ação celulolítica em livros. Os gêneros mais importantes caracterizados por biologia molecular serão discutidos brevemente à procura de evidências de atividade celulolítica, embora sua origem seja cosmopolita.

Figura 4 - Estatística da seleção e tratamento dos livros na biblioteca após o alagamento.



Legenda: (1) Total de livros na biblioteca; (2) Livros sem dano aparente; (3) Livros que foram fisicamente limpos para remoção de partículas sólidas e poeira; (4) Livros claramente contaminados com fungos; (5) Livros danificados pela cal em sua capa de couro (danos químicos); (6) Livros contaminados com fungos e apresentando também danos químicos.

Fonte: O autor, 2014.

Em relação aos estragos nas capas de couro de algumas peças das coleções Brasileiras e Os Pensadores, supõe-se que foi causado por uma goteira proveniente do acúmulo de água no teto da biblioteca durante uma forte tempestade na região (Figura 5). Os danos químicos observados nos livros abriram a oportunidade de investigar a maior susceptibilidade de livros

por contaminação fúngica em áreas alagadas. Na verdade, o dano químico observado foi a primeira indicação de que um ataque biológico poderia ocorrer.

Figura 5 - Capas de couro danificadas pela umidade e pela cal solubilizada.



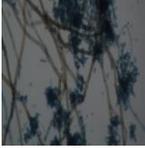
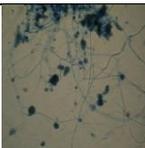
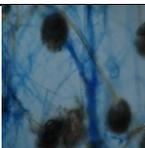
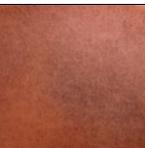
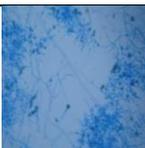
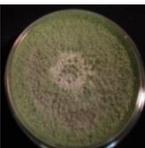
Fonte: O autor, 2014.

As principais espécies de fungos encontradas em livros e no ar, após o alagamento na biblioteca, estão apresentadas na Figura 6. São elas: *Cladosporium cladosporioides*, *Pestalotiopsis* sp., *Hamigera paravellanea*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Hypocrea lixii*, *Periconia macrospinoso* e *Trichoderma longibrachiatum*.

A área central parecia ser o espaço mais fortemente afetado na biblioteca. Nesta área foi encontrada a maioria das espécies de fungos: *Cladosporium cladosporioides*, *Pestalotiopsis* sp, *Hamigera paravellanea* e *Aspergillus flavus*. Com exceção do *Aspergillus flavus*, que também foi detectada na coleção Os Pensadores, as espécies restantes não foram encontradas nos livros, indicando que estavam provavelmente presentes no ar da biblioteca, e não no interior das prateleiras, onde coleções especiais foram armazenadas.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Sato *et al.* (2014), que isolou várias espécies de fungos a partir de documentos em papel embebido com água do mar, oriunda do tsunami seguido do terremoto no Japão em 2011. Embora seus resultados tenham indicado uma alta tolerância de cloreto de sódio, os mesmos gêneros foram encontrados. O potencial biodeteriorante foi confirmado pela presença de alterações nos documentos, como manchas em preto e vermelho, associada à presença de fungos cosmopolitas. Os demais fungos encontrados foram: *Aspergillus niger*, *Hypocrea lixii*, *Periconia macrospinoso*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma viride*.

Figura 6 - Fungos identificados no ar e nas coleções especiais de livros de uma biblioteca em um museu científico.

Origem da amostra	Classificação	Lâmina	Placa
Mesa central da biblioteca	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.		
	<i>Hamigera paravellanea</i>	Não avaliado	
	<i>Aspergillus flavus</i>		
Coleção Brasileira, Volumes 297-299	<i>Trichoderma viride</i>		
Prateleira 16A	<i>Aspergillus niger</i>		
Prateleiras: 13A/18B	<i>Hypocrea lixii</i>		
Coleção Os Pensadores	<i>Periconia macrospinosa</i>		
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>		
	<i>Aspergillus flavus</i>		

Um ponto interessante a ser discutido é a falta de contaminação cruzada dentro da biblioteca; apenas uma espécie de fungo foi encontrada em mais de um espaço ou objeto na biblioteca, com as demais espécies isoladamente encontradas. Esta é uma indicação de que embora se saiba que a biblioteca é deficiente no controle automatizado de umidade e temperatura, a ventilação natural no espaço fornece ar com qualidade suficiente para prevenir a proliferação de fungos. Por outro lado, quando ocorreu a inundação na biblioteca, essas condições não foram mantidas, dando lugar ao crescimento dos fungos. No entanto, logo que as condições originais foram restauradas, pode-se observar que a contaminação cruzada não foi observada, mesmo após o alagamento. Além disso, algumas discussões específicas sobre os gêneros encontrados serão apresentadas, a fim de investigar o potencial de ação celulolítica dos fungos em livros selecionados e prateleiras de madeira.

Cladosporium é um fungo alergênico, usualmente associado aos seres humanos. Este gênero é um dos maiores em espécies; é comumente encontrado como uma cultura marrom escura facilmente cultivada em tetos, banheiros e quadros de janelas encharcados de água. Espécies do gênero *Cladosporium* produzem um grande número de esporos que difundem facilmente através do ar quando ocorre qualquer distúrbio, sendo então inalados causando problemas pulmonares para os seres humanos e para algumas espécies animais. Bensch *et al.* (2010) examinaram um elevado número isolado de espécies *Cladosporium cladosporioides* baseado em sequenciamento de DNA do operão do gene do RNA ribossômico. Como resultado, 22 espécies foram descritas com base em caracteres filogenéticos e distinções morfológicas. De acordo com Stepalska *et al.* (1999) os esporos *Cladosporium* predominam no ar com mudança das concentrações, dependendo da época do ano.

Em um estudo realizado por Foladi *et al.* (2013) uma avaliação da presença de fungos em arquivos de uma província do norte do Irã. No ar interno das salas, as espécies *Cladosporium* spp teve a maior concentração total de unidade formadora de colônia (1227 UFC/m³), referente a 25,1%, *Aspergillus* spp (22,9%), *Penicillium* spp (22,9%) e *Stachybotrys chartarum* (7,9%). Essas espécies tiveram o maior número de frequências.

Na biblioteca fotográfica do Arquivo Nacional da República de Cuba e também no Arquivo Histórico do Museu de La Plata, a presença de espécies de fungos com atividades celulolíticas, proteolíticas e amilolíticas foram investigadas (Borrego *et al.*, 2010). Os métodos utilizados foram os mesmos que os usados no presente trabalho, baseado na sedimentação de partículas em placas de Petri contendo meio de cultura adequado para o crescimento de espécies aéreas. Os autores concluíram que o gênero de fungo predominante no Arquivo

Nacional foi o *Cladosporium* e no Museu de La Plata foi o *Penicillium*, confirmando, assim, a natureza ubíqua de ambos os fungos, de acordo com o presente trabalho.

Guo (2011) estudou amplamente o gênero *Pestalotiopsis*, indicando que algumas espécies são patógenas de plantas e outras são endófitos produtores de novos metabólitos, com aplicações medicinais, agrícolas e industriais (Xu *et al.*, 2010, 2014; Aly *et al.*, 2010). Os autores afirmam que uma identificação precisa das espécies ainda é necessária. As características morfológicas do gênero mostraram a presença de conídios (cinco apêndices celulares), com tamanho médio igual a 25-30 μm x 4-5 μm e oliváceos em forma. Geralmente apresentam 2-3 apêndices apicais, localizado no topo, com comprimento de 10-20 μm , não nodosa. Pouca informação sobre o gênero está disponível na literatura, Guba *apud* Maharachikumburas *et al.* (2014) relatou que várias espécies são isoladas do solo, da água de córrego poluído, da madeira, do papel, tecidos e lã.

Sergeeva *et al.* (2005) descreveram a ocorrência do gênero *Pestalotiopsis* em videiras associado a diversos outros gêneros relacionados. De acordo com o trabalho de Schwartz (1996), a espécie *Pestalotiopsis microspora* foi identificada pelos típicos cinco esporos unicelulares, com três células escuras no centro, cercado por duas células hialinas exteriores. Os esporos são também caracterizados por uma base com 3-4 apêndices apicais. A ocorrência do gênero foi verificada e examinada em 62 plantas em toda *Torreya taxifolia*. A espécie mais frequente foi de *Pestalotiopsis microspora*. O fungo foi isolado em 56 plantas (90%), tanto em galhos (85%), quanto nas folhas em formato de agulha (88%).

Segundo Peterson *et al.* (2010), o gênero *Hamigera* evoluiu de espécies *Talaromyces* que fazem ascos isoladamente e não em cadeias organizadas. Anteriormente, apenas duas espécies eram conhecidas: *Hamigera avellanea* e *Hamigera striata*, e apenas em 2010, a nova espécie *Hamigera paravellanea*. As espécies *Hamigera* têm sido isoladas do ar, solo, tecidos, esterco de animais e de certos insetos. Elas são principalmente decompositoras, mas podem estar envolvidas na deterioração de alimentos, devido à sua natureza termotolerante e osmotolerante. De acordo com o *United States Department of Agriculture* (USDA, 2014), as espécies fúngicas *Hamigera avellanea* e *Hamigera striata* foram inicialmente isoladas de mirtilos estragados. Este gênero apresenta uma grande diferença na aparência, conseqüentemente, precisa de comparações de sequenciamento de DNA.

Khan e Karuppaiyl (2012) analisaram o papel e a natureza ubíqua de fungos em ambientes internos, alertando para sua ação como alergênicos e potencial para infecções e toxicidade. De acordo com os autores, as espécies predominantes encontradas na maioria dos

ambientes são do mesmo gênero encontrado no presente trabalho, indicando a sua presença ubíqua, independentemente da região.

Com base em informações fornecidas pelo Instituto Broad (2014), nenhum outro gênero de fungo contém espécies que são tão prejudiciais e benéficas para os seres humanos como o gênero *Aspergillus*, além do fato de que um grande número de espécies de *Aspergillus* é motivo de preocupação biomédica e industrial. Por exemplo, a *A. nidulans* é uma espécie fúngica amplamente utilizada para genética e biologia celular, a *A. niger* é explorada pela indústria para a produção de ácido cítrico, e a *A. oryzae* está envolvida em processos de fermentação de várias bebidas e molhos. Em oposição, a *A. flavus* é um patógeno que produz a aflatoxina, e várias outras são importantes patógenos oportunistas. As características distintas profundas apresentadas por cada um deste crescente conjunto de espécies *Aspergillus* fazem deste gênero um modelo para resolver questões fundamentais da genômica funcional e comparativa.

A Enciclopédia de Doenças Infecciosas (Infectopedia, 2014) indica que espécies de patógenos comuns de *Aspergillus* incluem as espécies: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. caesiellus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulatus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. terreus*, *A. ustus*, *A. versicolor*. Essas espécies são amplamente encontradas no meio ambiente, particularmente em partículas de poeira, terra, grãos de cereais e estrume. A forma mais comum de transmissão é através da inalação de esporos. Algumas espécies provocam doenças como aspergilose, alergias pulmonares e onicomicose. É importante enfatizar que as doenças causadas pelos *Aspergillus* spp estão diretamente relacionadas com a imunodeficiência.

Guimet *et al.* (2011) investigaram o *biofouling* e a biodeterioração de fotos e mapas do Arquivo Histórico do Museu de La Plata, na Argentina e também nos repositórios do Arquivo Nacional da República de Cuba, a fim de caracterizar e isolar fungos e bactérias do meio ambiente, por meio de amostragem do ar, através de técnicas de sedimentação e raspagem nas amostras de mapas e fotos. A formação de biofilmes foi monitorada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com uma observação clara de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* como gêneros predominantes. Os autores observaram que os fungos isolados degradam celulose e produzem pigmentos e ácidos, comprometendo assim a permanência em longo prazo dos documentos.

Trichoderma spp. são fungos normalmente presentes em solos agrícolas e madeira em decomposição. Espécies de *Trichoderma* costumam crescer tropicalmente em hifas de outras espécies de fungos, degradando a parede celular dos fungos alvo. São muito comuns nas

batatas, pimentões, tomates, pepinos, pomares e vinhas (TradeIndia Corp, 2014). Callol (2013) relacionou alguns dos gêneros fúngicos encontrados como contaminantes de arquivos, sendo o *Trichoderma* um deles; e destacou a fonte de isolamento (papel, cartão e madeiras), os metabólitos que produz (celulase, ácidos celobiótico e acético) e sua atividade deterioradora (manchas micelianas verdes; degradam a fibra).

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, adotado a partir de Janeiro de 2013, apenas um nome oficial será permitido para cada fungo pleomórfico. Isto é particularmente interessante para uma diferenciação apropriada entre *Hypocrea* e *Trichoderma*.

Druzhinina e Kubicek (2005) relataram que *Trichoderma/Hypocrea* é um gênero de fungo com enzimas importantes e produtores de agentes de biocontrole. Eles podem ser agentes patogênicos como também agentes patogênicos oportunistas de seres humanos imunocomprometidos. A identificação das espécies é particularmente difícil com os métodos tradicionais, sendo necessária uma combinação de testes morfológicos, fisiológicos e genéticos para uma confirmação em nível de espécie. As espécies de *Hypocrea lixii* (*Trichoderma harzianum*) (Silva, 2008) produzem enzimas líticas extracelulares que causam deterioração da madeira (Murmanis *et al.*, 1989).

Oliveira (2014) relatou que a *Periconia* sp. foi descrita por Tode (1791) e Fries (1821). O gênero é tipicamente representado por 183 espécies, 12 variedades e duas *formae speciales* descritas no Índice Fungorum. A maioria das espécies de *Periconia* sp. são conhecidas pela sua natureza patogênica em função das toxinas seletivas que produzem. Elas são amplamente encontradas em regiões tropicais e subtropicais, bem como em lagos e oceanos em zonas temperadas. Elas também estão amplamente distribuídas em substratos vegetais, particularmente na cana-de-açúcar. No Brasil, as principais espécies de *Periconia* encontradas associadas às plantas são: *P. atra* Corda, *P. byssoides* Pers., *P. cookei* E. W. Manson & M. B. Ellis, *P. heveae* J. A. Stev. & Imle, *P. laxa* Bat. & Peres, *P. manihoticola* (Vincens) Viégas, *P. minutissima* Corda, *P. sacchari* J. R. Johnst., *P. sidae* Bat. & J. L. Bezerra e *P. stemonitis* (Pers.) Pers. (Embrapa Cenargen, 2010). O gênero *Periconia* apresenta pequenas colônias acastanhadas isoladas. O micélio é imerso, mas, por vezes, apresenta partes aéreas e os estromas são frequentemente presentes.

Trovão *et al.* (2013) avaliaram o papel dos artrópodes como dispersores de fungos contaminantes de documentos do Arquivo da Universidade de Coimbra, Portugal. O sequenciamento da região ITS total combinada com a análise de características taxonômicas macroscópicas e microscópicas, forneceu dados sobre a diversidade de fungos inseridos por

artrópodes. Os resultados mostraram uma alta diversidade de fungos associados com os invertebrados: de um total de mais de 148 isolados, 25 gêneros de fungos e 59 espécies foram identificadas e mantidas em cultura. A espécie *Periconia macrospinosa* foi isolada do acervo do patrimônio e estava associada à ordem Araneae. Os gêneros mais comuns foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*.

1.3.2 Tratamento químico de livros selecionados contaminados com fungos

Em relação ao tratamento químico realizado em livros selecionados contaminados com fungos, os resultados com o biocida (ortofenilfenol) na concentração mínima inibitória recomendada de 200 mg/L em etanol e também com o dobro da concentração, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do tratamento de fungos sobre nutriente Agar Sabouraud Dextrose com ortofenilfenol em duas concentrações.

Espécies	Concentração de ortofenilfenol (mg/L)	
	200	400
<i>Aspergillus flavus</i>	---	---
<i>Aspergillus niger</i>	--+	---
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+++	---
<i>Hamigera paravellanea</i>	---	---
<i>Hypocrea lixii</i>	---	---
<i>Periconia macrospinosa</i>	-++	---
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	-+-	---
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	+--	---
<i>Trichoderma viride</i>	-++	---

Nota: O número de símbolos (+) e (-) correspondem ao número de resultados positivos e negativos do crescimento de espécies de fungos isolados em cada placa de Petri em triplicata.

Fonte: O autor, 2014.

Pode-se observar que o ortofenilfenol na concentração de 200 mg/L não foi completamente eficaz contra todas as espécies de fungos. A esta concentração mais baixa, tal como sugerido pelo fabricante como uma concentração elevada para espécies de fungos cosmopolitas, apenas as espécies *Hamigera paravellanea*, *Aspergillus flavus* e *Hypocrea lixii* foram efetivamente afetadas pela presença do biocida. Embora as espécies tais como *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* e *Periconia macrospinosa* tenham sido afetadas pela presença do biocida, os resultados realizados em triplicata não foram conclusivos. No entanto, quando foi decidido utilizar uma concentração muito superior de ortofenilfenol, de fato o dobro como sugerido provou ser eficaz contra o crescimento de todas

as espécies isoladas da biblioteca. Estes resultados indicam que os tipos de micro-organismos presentes no ar e superfícies da biblioteca são bastante resistentes ao tratamento com biocida ortofenilfenol.

É comum que quando uma contaminação por fungos ocorre em arquivos ou bibliotecas, a desinfecção do contaminado ocorra por uma desinfecção aérea dos depósitos, uma vez esvaziados do seu conteúdo. No trabalho conduzido por Rakotonirainy *et al.* (1999), a termonebulização com uma solução de cloreto de alquil-dimetilbenzil-amônio 13% m/v foi utilizada para a purificação da atmosfera contaminada por fungos. Isto é eficaz na inibição dos esporos em suspensão no ar, mas tem apenas uma ação fraca e limitada a essas espécies depositadas sobre as superfícies. Os autores mostraram que uma solução de tiabendazol [2-(4-tiazolil)-benzimidazol] aplicada em 10% m/v por termonebulização, em 5 mL/m³, torna possível a sanitização eficaz da atmosfera e também apresenta uma ação eficaz sobre os esporos depositados em superfícies. É importante mencionar que, nesta concentração o produto químico não danifica o papel ou causa qualquer degradação visível nas superfícies pintadas e nas prateleiras de metal.

Rakotonirainy e Lavédrine (2005) estudaram uma forma alternativa para eliminar espécies de fungos normalmente encontrados em biblioteca e materiais de arquivo. Em vez de usar preparações alcoólicas clássicas e soluções desinfetantes, os pesquisadores decidiram usar óleos essenciais. Dessa forma, a ação inibitória da fase vapor de óleos de diversos vegetais, tais como, artemísia, cravo, boldo, eucalipto, lavanda, etc. foram testados contra espécies de fungos. Os resultados indicaram que a ação do linalol é fungistática, mas não fungicida nas concentrações e condições testadas. O uso potencial do linalol como uma alternativa ao fungicida químico para desinfetar documentos mofados pode ser difícil de avaliar em grande escala, mas pode ser útil como um tratamento complementar para controle do ambiente interno. A utilização do óleo pareceu não afetar o brilho dos dois tipos de papel e também não afeta a polimerização da celulose. Por outro lado, a ação do produto em papel reduziu o seu pH.

Conclusões

O pequeno número de livros impregnados com colônias de fungos (em torno de 4% do total de livros na biblioteca) apresentou alta diversidade de fungos cosmopolitas e algumas espécies pouco comuns para este tipo de ambiente.

As espécies de fungos isolados e caracterizados estavam limitadas à área central da biblioteca e prateleiras específicas onde as coleções especiais foram colocadas.

Não necessariamente espécies de fungos isolados de amostras do ar contaminado estavam presentes nas coleções especiais, indicando a ausência de contaminação cruzada.

A concentração de 400 mg/L do agente químico ortofenilfenol foi eficiente na inibição das espécies de fungos isoladas.

A utilização de técnicas de biologia molecular para a identificação de espécies de fungos provou ser uma ferramenta útil, contribuindo para a seleção das espécies que não se encontravam especificadas no rótulo do biocida Preventol. Isso permitiu a utilização do agente químico em concentrações mais elevadas, garantindo a ação fungistática desse biocida sobre os fungos identificados.

A ação rápida de uma equipe multidisciplinar revelou-se essencial para minimizar o maior dano que pode ocorrer em livros raros e coleções especiais na situação de alagamento.

2 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE TINTAS FERROGÁLICAS DE DIFERENTES FONTES DE TANINOS – APLICAÇÕES PARA PATRIMÔNIO CULTURAL

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Tintas ferrogálicas

As tintas podem ser definidas como preparações líquidas, semi-líquidas ou sólidas, que podem ser usadas para desenhar sinais gráficos em um suporte (Zappalà, 2004).

As tintas ferrogálicas foram amplamente utilizadas no mundo ocidental entre os séculos XII e XIX, persistindo o uso no Brasil até o início do século XX (Leal, 2010; Albro e Biggs, 2008). As receitas foram modificadas ao longo do tempo: em várias coleções de receita medieval e renascentista as primeiras tintas ferrogálicas foram descritas; por exemplo, em *Schedula diversarum artium*, Theophylus descreveu sua produção por etapas, da maceração de extrato vegetal a adição de sulfato ferroso (Zerdoun Bat-Yahouda, 1983). Entretanto, somente a partir do século XVII que as receitas tornaram-se mais precisamente detalhadas, e as tintas que foram comercializadas foram produzidas usando métodos mais científicos. E apenas por volta do século XIX os corantes sintéticos inovadores foram empregados em formulações de tinta. (Gambaro *et al.*, 2009).

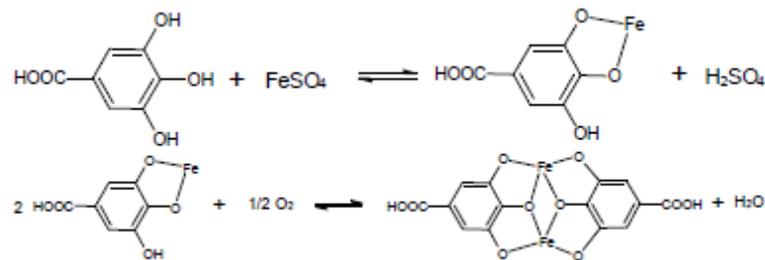
Como é difícil de remover do papel, a tinta também se tornou um padrão para manutenção de registros (Budnar *et al.*, 2006). Bibliotecas, arquivos e instituições culturais de todo o mundo têm agora coleções de documentos históricos com tinta ferrogálica, manuscritos e obras de arte em ambos os suportes de papel e pergaminho. Estes vão desde cartas diárias e documentos de escrituras a medievais manuscritos iluminados e composições musicais e desenhos de grandes artistas (Lee *et al.*, 2006). Leonardo da Vinci, Van Gogh, J. S. Bach e Rembrandt van Rijn foram apenas alguns dos autores mais famosos que usaram a tinta ferrogálica.

De maneira geral, a formulação clássica da tinta ferrogálica possui quatro ingredientes básicos: noz de galha (galhas em sua maioria japonesa e chinesa, galhas de carvalho britânico e americano e galhas de alepo), sulfato ferroso, goma arábica e um meio aquoso como vinho, vinagre, urina, cerveja, etc. Geralmente a goma arábica é associada nas receitas como um aglutinante. Ela cria uma suspensão de partículas escuras e torna a textura da tinta mais

adequada para escrita (Burgaud *et al.*, 2010). Camera (2004) trabalhando com tintas ferrogálicas preparadas em laboratório e com considerável quantidade de tanino, mostrou que um filme de tinta uniforme é formado na superfície do papel, mesmo sem a introdução de compostos aglutinantes. Outros compostos e corantes eram às vezes adicionados para alterar tom, proporcionar visibilidade imediata e ajustar outras propriedades físicas da tinta (Stijnman, 2005; Daniels, 2001). Além da dosagem dos ingredientes, de acordo com Stijnman (2005), existem nos registros de receitas históricas vários métodos de preparação, incluindo a de fervura e/ou fermentação da mistura. Os ingredientes da tinta não eram puros em termos contemporâneos (Budnar *et al.*, 2006).

Independente da forma de preparo, a tinta ferrogálica é formada quando o ácido tânico presente na noz de galha reage com o ferro do sulfato ferroso, dando origem a um complexo solúvel em água conhecido como galotanato ferroso. Devido a esta solubilidade, a tinta penetra com facilidade na superfície do suporte, tornando difícil a sua remoção. Após a exposição a altas concentrações de oxigênio por um período de tempo especificado, um pigmento escuro insolúvel é formado, o qual não é facilmente removível ou degradado (Hahn, 2012; Hahn, 2010; Cleveland, 2000; James, 2000) (Figura7).

Figura 7 - Mecanismo de reação de oxidação do tanino na presença de sulfato ferroso.



Fonte: Maitland, 2009, f. 39.

A tinta ferrogálica torna-se estável quando preparada com uma razão estequiométrica de ácido tânico (ou ácido galotânico) e sulfato ferroso (da Costa *et al.*, 2013). Entretanto, a maioria das tintas ferrogálicas encontradas nos manuscritos antigos possuem excesso de ferro em sua composição, contribuindo assim para a degradação da celulose.

O excesso de ferro presente na tinta pode contribuir para a degradação de manuscritos através de dois mecanismos básicos: o primeiro mecanismo é a hidrólise catalisada por ácido, onde a degradação da celulose é acelerada pela presença de ácido sulfúrico produzido durante a formação do complexo na tinta ferrogálica (Krekel, 1999) (Figura 7); enquanto que o

segundo mecanismo é aquele em que os íons ferrosos solúveis catalisam reações de oxidação em dois processos distintos consecutivos: no primeiro, os íons ferrosos contribuem para a quebra das cadeias celulósicas e liberação de radicais orgânicos e peróxidos, que são ambos altamente reativos, resultando assim num decréscimo da quantidade de polímeros de celulose. No segundo processo o radical hidroxila, altamente reativo, formado pela ação do ferro, extrai facilmente íons hidrogênio de qualquer outra molécula, contribuindo para reações em cadeia da celulose (Maitland, 2009).

2.1.2 Taninos vegetais

A complexidade de se estudar a química da tinta ferrogálica encontra-se nas inúmeras receitas e fontes de ingredientes utilizados, resultando em diferentes composições e proporções dos componentes (Lee *et al.*, 2006). O excesso de oxidação em tintas ferrogálicas em receitas antigas não é apenas atribuído à presença de ferro, mas também à fonte de tanino utilizado. O sulfato de ferro e o tanino variam na composição devido às diferentes fontes e aos métodos para o seu isolamento.

Os taninos desempenham diferentes papéis em documentos de pergaminho: eles podem ser encontrados como parte do substrato ou dos meios de escrita ou mesmo de ambos (Bicchieri *et al.*, 2011).

Tintas à base de tanino têm sido amplamente utilizadas para anotar documentos desde os tempos antigos até o século passado. Na antiga tradição judaica e árabe, por exemplo, sulfato de cobre ou sulfato de ferro era usado em conjunto com vários extratos de plantas (romã, acácia). Bicchieri *et al.* (2011) explicam ainda, que a palavra "tanino" encontra-se em relação a todos os agentes utilizados no curtimento moderno do couro (a distinção entre os chamados taninos minerais e taninos vegetais), ao passo que a definição química de "tanino" aplica-se apenas a este último.

Os taninos são geralmente extraídos da noz de galha por vários meios. Eles contêm grandes quantidades de ácidos fenólicos, que são decompostos por hidrólise em moléculas menores. O ácido gálico é um dos constituintes principais destes extratos, quando a hidrólise é considerada completa (Burgaud *et al.*, 2010).

Os taninos vegetais são compostos polifenólicos naturais que rapidamente formam complexos com proteínas, polissacarídeos e alcalóides (metabólitos secundários de plantas) e sua composição estrutural ampla é encontrada em 30% das plantas superiores (Haroun *et al.*, 2013; Pansera *et al.*, 2003; Haslam, 1989; Zucker, 1983).

A concentração de tanino varia de acordo com os tecidos vegetais, idade da planta, e região onde a planta é tipicamente encontrada (Monteiro *et al.*, 2005). Baseado na sua estrutura química, estes compostos podem ser divididos em taninos hidrolisáveis e condensados ou poliflavonoides. Os taninos hidrolisáveis incluem castanha, vagem, tara, liana, carvalho e vários outros extratos de tanino comercial que são constituídos de misturas de fenóis simples tais como ácido elágico, pirogalol e ésteres de ácidos gálico ou digálico com açúcares, como a glicose, a partir do qual as porções fenólicas são, no entanto, facilmente separadas (Thébault *et al.*, 2014). O ácido galotânico, a espécie química responsável pela reação de complexação com o ferro na formação do pigmento da tinta ferrogálica, é derivado da hidrólise de taninos hidrolisáveis. Desta maneira, o complexo formado na tinta ferrogálica poderia ser facilmente obtido através de taninos vegetais hidrolisáveis (da Costa *et al.*, 2013; Battestin *et al.*, 2004; Hergert, 1989). Por sua vez, os taninos condensados são unidade de flavonóides com graus diferentes de condensação e constituídos por unidades flavanol: flava-3-ols (catequina) ou flava-3,4-diols (leucoantocianinas) (Kraus *et al.*, 2003). Essas substâncias são altamente resistentes à hidrólise, o que caracteriza o seu perfil não reativo com o ferro na produção das tintas ferrogálicas (Trugillho *et al.*, 1997; Haslam, 1989). Mesmo assim, diversos documentos históricos escritos com tinta ferrogálica utilizaram antigas receitas preparadas com fontes de taninos vegetais condensados, ou seja, a formação do complexo com o ferro não ocorreu efetivamente. Conseqüentemente, o processo corrosivo do papel pode ser agravado pelo excesso de ferro no preparo e uma menor quantidade de taninos que podem realmente reagir para formar o pigmento da tinta. Entre os taninos condensados, o extrato de *Acacia* é o preferido, devido à sua utilidade na produção de couros exclusivos e, principalmente, devido ao seu peso e propriedades de enchimento (Kalyanaraman *et al.*, 2015).

Uma vez que a reatividade dos taninos é determinada pela sua estrutura química, análises químicas têm sido experimentadas para estimar a sua atividade; no entanto, tais métodos fornecem informações escassas sobre essa questão (Rodríguez *et al.*, 2015).

Uma das condições associadas à oxidação acelerada devido ao envelhecimento natural das tintas ferrogálicas é a formação de cristais na superfície e/ou entre as fibras do papel pelo excesso de sal inorgânico (Camera, 2004). Um grande número de amostras de manuscritos claramente apresenta sedimentos na forma de cristais ou depósitos amorfos em suas superfícies, particularmente aqueles com um elevado teor de tinta (Ferrer e Sistach, 2013; Ferrer e Sistach, 2005). Os sedimentos comumente encontrados em documentos contendo tintas ferrogálicas são oxalatos de cálcio, potássio e ferro, sulfato de cálcio, carbonato de

cálcio e sulfato ferroso (Ferrer e Sistach, 2013). Materiais cristalinos de fontes externas a tinta também podem depositar-se na superfície de um documento através de uma deposição seca, mas sua aparência é sensivelmente diferente dos cristais oriundos do envelhecimento natural da tinta ferrogálica (Camera, 2004).

O processo de cristalização e a morfologia dos cristais geralmente são observados por microscopia ótica e, somente em raríssimos casos, pode ser observado macroscopicamente. Análises específicas devem ser realizadas para estudar os componentes individuais, uma vez que estes podem estar ligados aos processos de deterioração. As observações por MEV permitem investigar as diferentes morfologias de filmes, a partir de imagens de alta ampliação, e correlacioná-las à sua composição elementar (Gambaro *et al.*, 2009).

2.1.3 Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura

Particularmente, técnicas analíticas de superfície micro-destrutivas, não-destrutivas ou não-invasivas (Faubel *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2001) foram desenvolvidas especificamente para conseguir informações de diagnóstico em papel antigo de significado histórico e arqueológico (arqueometria). As técnicas analíticas capazes de detectar elementos/grupos/compostos inorgânicos ou orgânicos são úteis neste campo, especialmente em vista de determinações a respeito das tintas metalogálicas (cátions de ferro ou de cobre principalmente), amplamente utilizadas há séculos em manuscritos antigos e desenhos da civilização ocidental (Adami *et al.*, 2016).

A importância histórica dessas obras de arte, de valor inestimável, juntamente com o aumento da consciência sobre a conservação do patrimônio cultural, levou à aplicação de técnicas analíticas para o estudo dessas iluminações (Pessanha *et al.*, 2012).

Entre os métodos analíticos instrumentais existentes para determinar o teor de metais das tintas históricas, técnicas como Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrômetro de Energia Dispersiva Acoplado (MEV-EDS), Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF-AAS), ou Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), são utilizadas (Budnar *et al.*, 2006).

A microscopia eletrônica de varredura, como uma das técnicas mais utilizadas na biologia e ciências dos materiais, é um instrumento muito poderoso na investigação do patrimônio cultural, e tem sido tradicionalmente empregada em uma variedade de áreas. Esta ferramenta fornece conhecimento sobre a topografia da superfície das amostras estudadas,

pela visualização da estrutura da superfície das amostras microscópicas, fornecendo imagens 2D para examinar e interpretar as propriedades da superfície de micro objetos (Tafti *et al.*, 2015). A microscopia eletrônica de varredura emprega elétrons em vez de luz para determinar as propriedades de superfície das amostras; e se for acoplada com um detector de dispersão de energia, as informações sobre a composição elementar também são obtidas (Pessanha *et al.*, 2012).

Kautek *et al.* (2000) realizaram o diagnóstico morfológico da limpeza do laser de pigmentos em pergaminho usando MEV. Della Gatta *et al.* (2005) utilizaram as imagens de MEV para avaliar os danos resultantes do impacto ambiental em pergaminhos. Bicchieri *et al.* (2011) também usaram imagens de MEV e espectrometria de energia dispersiva (EDS) para diferenciar processos de fabricação de pergaminho. Aceto *et al.* (2006) fizeram o mesmo para realizar microanálise elementar em um manuscrito italiano do século IX a fim de estudar a degradação de um pigmento de liga.

A possibilidade de análise dos produtos de degradação ou de acréscimos de superfície presentes na tinta é importante do ponto de vista histórico, bem como para os fins de tratamento de conservação e preservação, e auxilia na compreensão do mecanismo da degradação (Lee *et al.*, 2006).

2.2 Metodologia

2.2.1 Confecção das tintas ferrogálicas

Para o preparo das tintas ferrogálicas foram utilizados sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Brasil), ácido tânico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$) (Vetec, Brasil) ou, alternativamente, taninos vegetais provenientes das espécies *Castanea sativa* (castanha), *Caesalpinia spinosa* (vagem) e *Acacia* sp. (liana), fornecidos pela empresa TANAC S.A./Brasil, goma arábica (Vetec, Brasil) e etanol (Vetec, Brasil). As quantidades utilizadas destes reagentes estão descritas na Tabela 2.

As tintas foram separadas em três grupos, que se diferenciam pela quantidade de sulfato ferroso adicionado no seu preparo: Grupo 1 - quantidade estequiométrica; Grupo 2 - o dobro da quantidade estequiométrica; e Grupo 3 - dez vezes a quantidade estequiométrica.

Cada grupo possui quatro tipos distintos de tintas ferrogálicas, de acordo com a origem do tanino: ácido tânico e os taninos vegetais (mais brutos) presentes na liana, castanha e vagem.

Tabela 2 - Composição química das tintas ferrogálicas confeccionadas.

Grupo de tintas	FeSO ₄ .7H ₂ O (g)	Ácido tânico/Tanino vegetal (g)	Goma arábica (g)	Etanol (mL)
1	1,0	5,5	2,0	5,0
2	2,0	5,5	2,0	5,0
3	10,0	5,5	2,0	5,0

Fonte: O autor, 2014.

As tintas ferrogálicas foram preparadas a pressão e temperatura ambientes e expostas ao ar atmosférico por 24 horas, a fim de ajudar na fixação dos componentes nas tiras de papel Whatman e promover o fortalecimento da cor após a formação do complexo galotânico, proveniente da reação entre o ácido tânico e o sulfato ferroso. Após esta etapa, as tintas foram mantidas em frascos âmbar selados protegidos da luz, a temperatura ambiente.

As tiras de papel (6,0 x 1,0 cm) foram imersas verticalmente durante 5 minutos em frascos contendo as tintas. Essas tiras foram secas à temperatura ambiente durante 2 horas e colocadas numa câmara fechada, a 100°C durante 5 dias, de acordo com o procedimento adotado pela Organização Internacional de Padrões para acelerar o envelhecimento e a oxidação.

2.2.2 Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da tinta agregada sobre a superfície das tiras de papel foi observada por MEV (FEI-Inspect S50, Republica Tcheca). Várias imagens foram obtidas para cada amostra em áreas distribuídas, e as Figuras 8-11 mostram zonas representativas para cada amostra, que foram morfologicamente homogêneas. As amostras foram preparadas por revestimento com ouro em equipamento de pulverização catódica (Emitech K550X) durante 3 min a 20 mA. As imagens foram observadas sob o modo de alto vácuo com uma tensão de 20 kV e aumento de 400x para a caracterização completa.

2.2.3 Obtenção dos extratos de tanino bruto a partir de taninos vegetais

Os extratos de tanino bruto foram obtidos a partir das amostras de tanino vegetal comercial fornecidas, através da metodologia descrita por Georgé *et al.* (2005). Para obter os extratos, as amostras de tanino vegetal (0,1 g) foram adicionadas a uma solução de cetona (20 mL, 70% v/v) em frascos Erlenmeyer. Estes frascos foram agitados em um agitador rotativo (Tecnal, Brasil), a 150 RPM durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as soluções contendo os extratos foram filtradas por papel de filtro Whatman e as soluções sobrenadantes foram utilizadas para a determinação de taninos totais e taninos condensados das amostras originais.

2.2.3.1 Quantificação dos taninos totais

Inicialmente, de acordo com o processo sugerido por George *et al.* (2005), compostos fenólicos totais foram quantificados utilizando o extrato bruto (0,5 mL), obtido anteriormente, e adicionando o reagente de Folin-Ciocalteu (2,5 mL, 10% v/v). Depois disso, as amostras foram agitadas à temperatura ambiente durante 2 minutos, e uma solução de carbonato de sódio (2,0 mL, 7,5% v/v) foi adicionada. Em seguida, as soluções foram colocadas em tubos e aquecidas em banho-maria a 50°C durante 15 minutos. Posteriormente, os tubos foram arrefecidos e as leituras dos valores de absorvância foram realizadas em 760 nm utilizando espectrofotômetro (Varian Specord, Brasil).

Os taninos presentes nos extratos brutos foram precipitados diluindo 5,0 mL dos extratos em 10,0 mL de água e adicionando posteriormente 1,0 g de caseína sob agitação constante em temperatura ambiente durante 3 horas, de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al.* (2012). Em seguida, as soluções foram filtradas em papel de filtro e o filtrado resultante foi empregado para a quantificação da concentração de compostos fenólicos residuais pelo método Folin-Ciocalteu.

A quantidade de taninos totais corresponde à diferença entre o valor obtido dos compostos fenólicos totais e o valor encontrado na quantificação dos compostos fenólicos residuais. O padrão utilizado neste método foi o ácido tânico e os resultados foram expressos em mg EAT/g da amostra (EAT = equivalente de ácido tânico).

2.2.3.2 Quantificação dos taninos condensados

A concentração de taninos condensados nas amostras comerciais foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Machado (2007). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,1 mL dos extratos brutos e 0,9 mL de metanol. Em seguida adicionou-se 2,5 mL da solução metanol-ácido (8,0 mL de HCl em 100 mL de metanol) e 2,5 mL da solução de vanilina (1,0 g de vanilina em 100 mL de metanol). As amostras foram aquecidas em banho-maria a 60°C durante 10 minutos e as leituras dos valores de absorvância foram realizadas em 525 nm utilizando espectrofotômetro (Varian Specord, Brasil). A amostra padrão utilizada neste método foi o ácido pirogálico e os resultados foram expressos em mg EAP/g da amostra (EAP = equivalente de ácido pirogálico).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Confecção das tintas ferrogálicas

Macroscopicamente, nenhuma diferença substancial foi encontrada com relação à fluidez, homogeneidade e intensidade da cor das diferentes tintas, preparadas de acordo com a metodologia. Na realidade, a relação estequiométrica para a produção de tintas estáveis é conhecida desde o século XVII. No entanto, sabe-se também que na Europa, do século XV até o século XIX, houve um aumento de 50% no número de receitas distintas, que normalmente diferenciavam-se com base no excesso da quantidade de ferro.

Na atual pesquisa, o envelhecimento térmico acelerado da tinta impregnada nas tiras de papel apresentou mudanças graduais na intensidade da cor e no aspecto. Todas as amostras preparadas, em cada uma das razões de tanino/sulfato ferroso, claramente apresentaram sinais de processos oxidativos. No entanto, essas oxidações foram bastante diferentes em cada preparação. As tintas preparadas com o tanino da vagem apresentou um baixo grau de oxidação, com uma baixa descoloração, que foi particularmente observado nas bordas da tinta nas tiras de papel. É possível observar que a oxidação tende a aumentar das tintas do Grupo 1 para as tintas do Grupo 3, confirmando assim que o excesso de ferro em uma amostra contribui para uma ação corrosiva. Comportamento semelhante ao tanino da vagem foi observado quando se utilizou o tanino da castanha e amostras de ácido tânico comercial.

Por outro lado, as tintas preparadas com o uso do tanino liana apresentaram comportamento completamente diferente em comparação às amostras dos taninos acima mencionados. A oxidação da tinta impregnada nas tiras ocorreu não somente nas bordas do papel, mas também em toda a área das tiras. Este comportamento inicialmente parece confuso, uma vez que a quantidade de tanino liana utilizado foi o mesmo que a utilizada para as demais amostras de tanino. Desta forma, parece que a interação do ferro com o tanino liana foi menor em comparação aos outros.

Reissland (2000b) observou a degradação causada pelas tintas ferrogálicas em teste com tiras de papel preparadas com razão ferro:tanino de 1,0:5,5. As tiras de papel foram artificialmente envelhecidas a 90°C por períodos de 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias e depois examinadas sob luz visível e, também, iluminação ultravioleta. Reissland (2000b) utilizou esta técnica para detectar a degradação progressiva das tiras de papel, devido à presença de tinta oxidada. Ele observou que após três dias uma fluorescência verde foi observada na área que contém a tinta, seguida por uma cor mais forte depois de seis dias. Depois disso, a fluorescência tornou-se pálida, gradualmente chegando ao tom amarelo seguido de descoloração completa. Esta fase final de descoloração foi seguida por uma perda completa de resistência mecânica do papel, indicando o efeito deletério da tinta oxidada em fibras de celulose.

2.3.2 Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura

De acordo com Hey (1971), baixas tensões de aceleração do feixe de elétrons, como por exemplo, 5 e 10 kV, contribuem para uma melhor definição de captura de imagens da superfície do papel. Neste trabalho, 20 kV de tensão foi usado com o objetivo de observar a deposição de cristais na superfície das fibras e não delinear os aspectos morfológicos destes.

A Figura 8 mostra fibras de celulose de uma tira de papel Whatman não impregnada com tinta ferrogálica. As fibras longas, tipicamente dispostas em uma superfície não regular, podem ser observadas na tira de papel, além da presença de espaços vazios e a falta de qualquer material depositado entre as fibras. De acordo com Conceição *et al.* (2012), as fibras de celulose típicas apresentam elevadas quantidades de carbonato de cálcio.

Segundo Anguera (1996) e Camera (2004), a ocorrência de partículas de cristal em desenhos e documentos impregnados com tinta ferrogálica pode ser visto em regiões onde a tinta foi adicionada em quantidades elevadas. Por ação capilar a tinta é gradualmente

absorvida através das fibras, mantendo-se na superfície do papel como pequenos depósitos químicos.

As tiras de papel impregnadas com as tintas ferrogálicas com diferentes razões ferro:tanino apresentaram diferenças marcantes, particularmente em relação à fonte de tanino comercial utilizada na preparação. A Figura 9 mostra imagens por MEV das tintas do Grupo 1, com três diferentes fontes de tanino. A partir das imagens, uma estreita semelhança entre as tiras com tinta ferrogálica impregnada e a amostra em branco pode ser vista. A imagem MEV da amostra de ácido tânico mostra que alguns espaços vazios das fibras de celulose foram preenchidos com tinta, formando um filme duro e com pequenas partículas de cristal. Segundo da Costa *et al.* (2013), o ácido tânico comercial é uma mistura de galotaninos produzidos em diferentes partes de espécies de vegetais. Devido a esta natureza, é possível que uma pequena parcela de ferro presente na tinta não reaja, permanecendo livre para ser oxidado, justificando a pequena presença dos cristais no MEV.

Figura 8 - MEV das tiras de papel Whatman não impregnadas com tinta ferrogálica (ampliação de 400x).

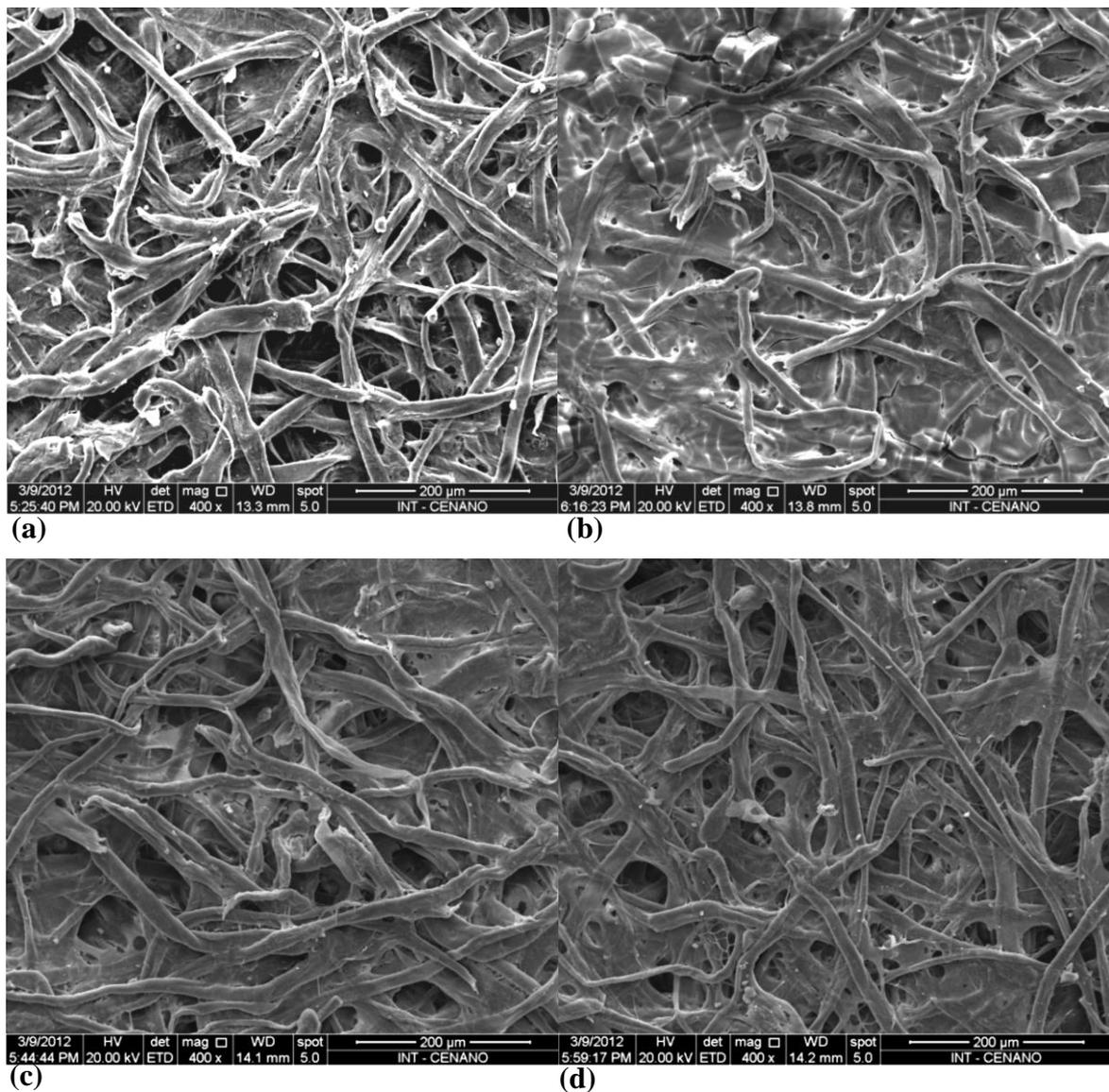


Fonte: O autor, 2014.

Sabe-se também que os taninos da castanha e da vagem, provenientes de fonte vegetal, também possuem variação na composição e na quantidade de taninos presentes. Esta pode ser uma possível explicação para as semelhanças das imagens MEV entre fontes vegetais comerciais e amostra de ácido.

As diferenças entre as imagens da Figura 9 em comparação com o ensaio em branco na Figura 8 são devido a uma película densa contínua sobre os espaços vazios, bem como algumas fibras de celulose completamente cobertas com a mesma película. De acordo com da Costa *et al.* (2013) o tanino liana é um tipo de tanino condensado com muito baixa reatividade para íons metálicos. Devido a esta natureza, taninos condensados são incapazes de formar moléculas complexas com íons de ferro. Assim, em comparação com as outras fontes de tanino previamente testadas, o tanino liana tem um baixo teor de taninos hidrolisáveis disponível para reagir com o ferro.

Figura 9 - MEV das tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas do Grupo 1 (razão ferro:tanino 1,0:5,5).



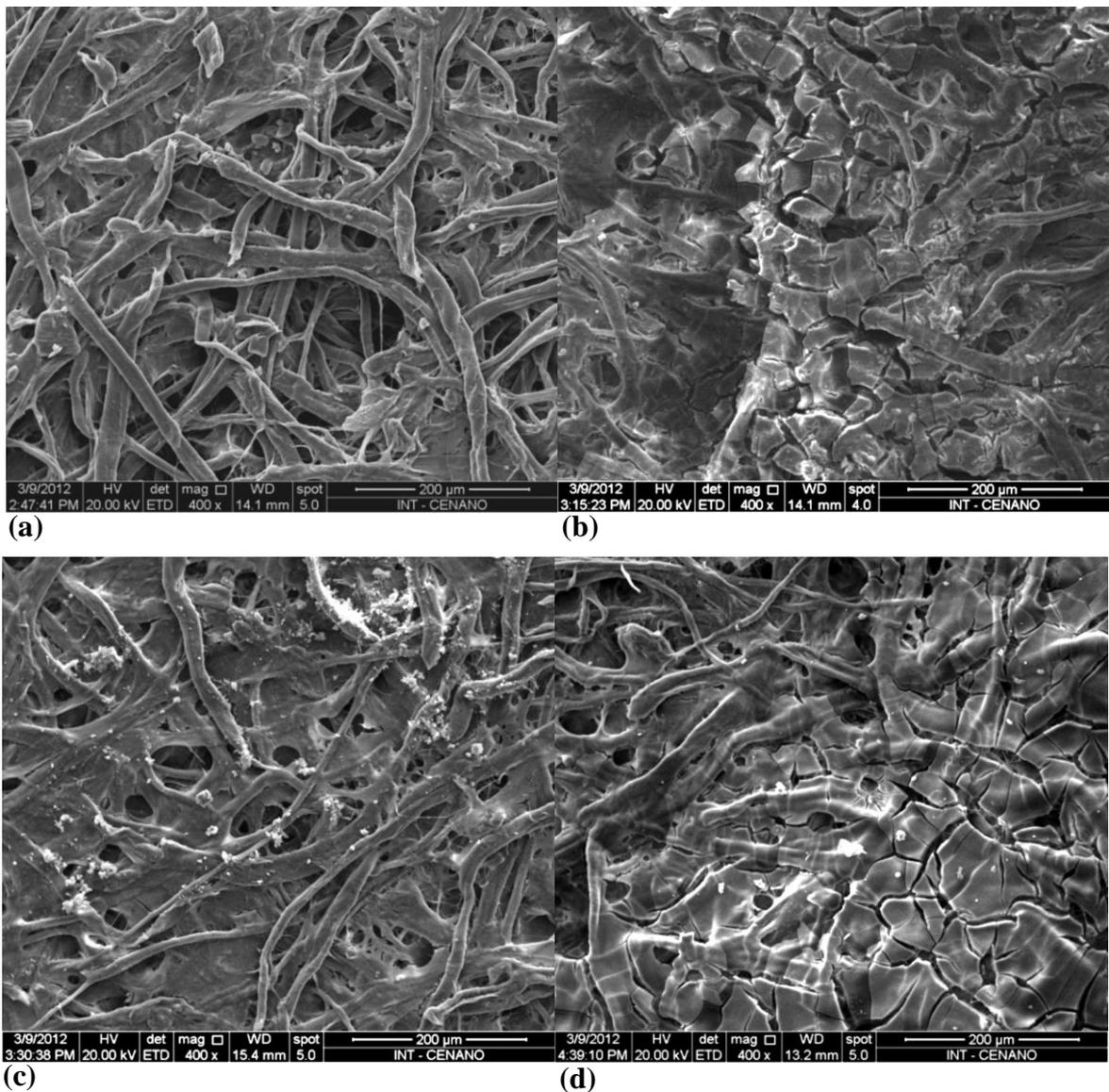
Legenda: (a) ácido tânico; taninos vegetais: (b) liana, (c) castanha, (d) vagem. Ampliação de 400x.

Fonte: O autor, 2014.

Muito provavelmente, cristais de óxidos insolúveis foram formados durante a oxidação do ferro, devido à falta de moléculas de tanino disponíveis para reagir com o metal. Conseqüentemente, a formação de depósitos de cristais nas fibras celulósicas é esperada, e esta formação foi confirmada pelas imagens do MEV.

As tintas do Grupo 2 foram preparadas com 2,0 g de sulfato ferroso em sua formulação. Em comparação com a amostra do papel em branco, pequenos depósitos entre as fibras podem ser observados na Figura 10.

Figura 10 - MEV das tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas do Grupo 2 (razão ferro:tanino 2,0:5,5).



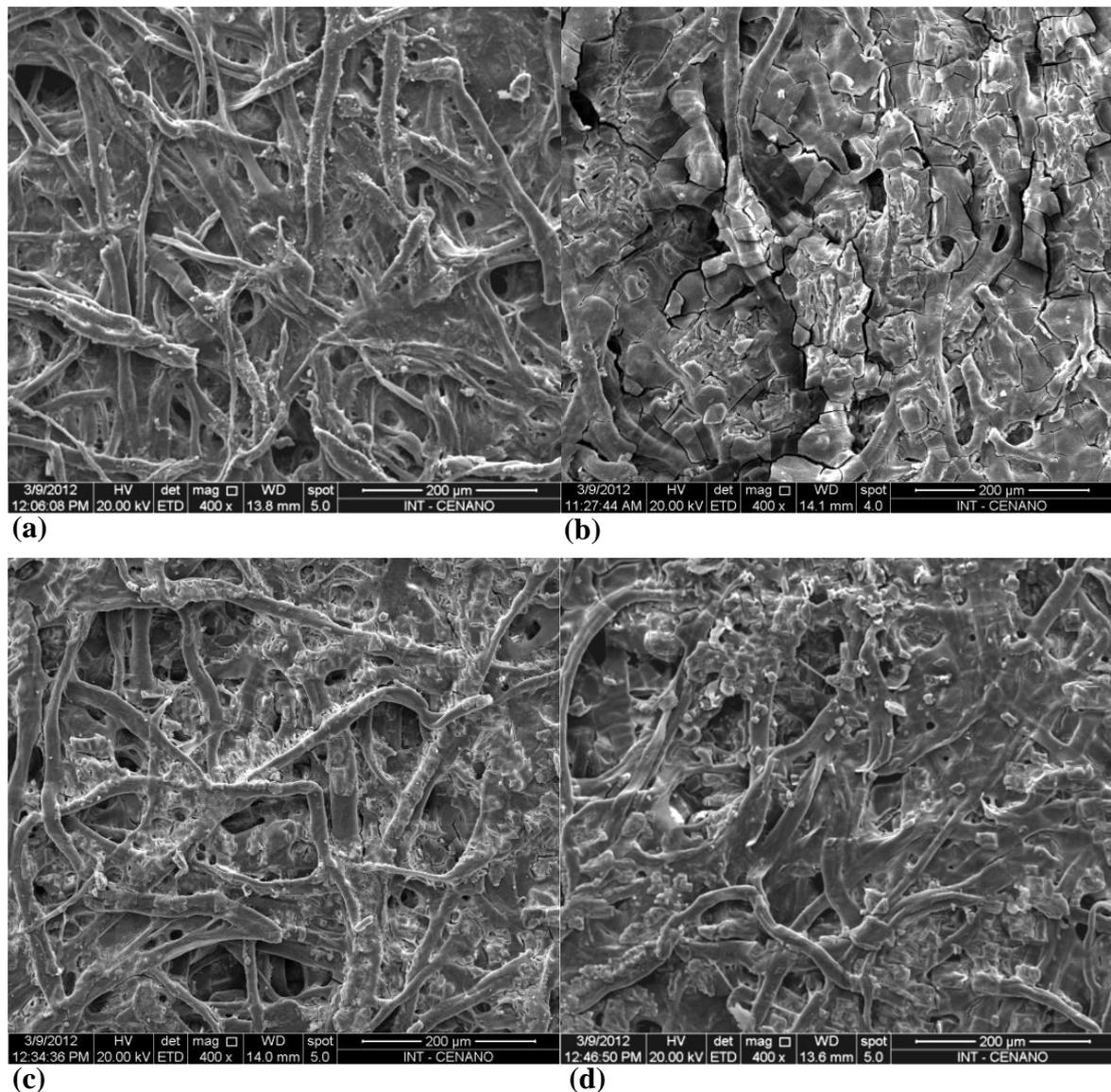
Legenda: (a) ácido tânico; taninos vegetais: (b) liana, (c) castanha, (d) vagem. Ampliação de 400x.

Fonte: O autor, 2014.

Teoricamente, tintas preparadas com amostras de ácido tânico apresentam uma maior reatividade com o ferro entre todas as fontes de taninos utilizadas, tendo em vista que é uma amostra comercial com maior grau de pureza. Desta maneira, espera-se encontrar a menor formação de um filme e/ou depósitos entre as fibras quando amostras de ácido são testadas.

Por outro lado, no caso da utilização dos taninos vegetais comerciais, a formação de depósitos na superfície e entre as fibras do papel é claramente observada.

Figura 11 - MEV das tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas do Grupo 3 (razão ferro:tanino 3,0:5,5).



Legenda: (a) ácido tânico; taninos vegetais: (b) liana, (c) castanha, (d) vagem. Ampliação de 400x.

Fonte: O autor, 2014.

A ocupação dos espaços vazios deu-se pela formação de um filme contínuo, claramente mais denso do que os observados no Grupo 1. Este comportamento, em

comparação com a amostra de ácido tânico, pode ser explicado pela natureza dos taninos presentes nas formulações vegetais comerciais, onde se prevê uma variabilidade natural na concentração. Essa é uma indicação de que a quantidade de tanino adicionado durante a formulação das tintas, embora teoricamente correta, não está diretamente relacionada à reatividade, porque a pureza e a concentração precisam ser confirmadas. Consequentemente, quando as tiras de papel foram impregnadas com tintas ferrogálicas, a receptividade das tintas à oxidação não poderia ser prevista, devido à concentração indefinida de taninos reativos nas amostras comerciais.

Para confirmar essa hipótese, a Figura 11 acima apresenta as imagens MEV das tintas do Grupo 3 (concentração de ferro 10 vezes maior que a do Grupo 1).

Outra vez, as tintas preparadas com as amostras de ácido tânico apresentaram a maior reatividade entre ferro e taninos, confirmado pela ausência de agregados entre as fibras, em comparação com as tintas preparadas com os taninos vegetais comerciais. Como era esperada uma formação muito mais elevada de agregados na superfície de tiras de papel em comparação às tintas do Grupo 1, as tintas preparadas com fontes vegetais comerciais mostraram uma presença marcante de agregados depositados entre as fibras.

2.3.3 Quantificação dos taninos totais

Para determinar a quantidade total de tanino na amostra, o ácido tânico foi usado como substância padrão. Seu alto teor de taninos hidrolisáveis é largamente reconhecido na literatura (Pansera *et al.*, 2003). A Tabela 3 apresenta as concentrações de taninos totais no extrato vegetal usado no presente trabalho.

Tabela 3 - Concentração de taninos totais em extrato vegetal.

Fonte	Conc. de taninos totais (% equivalente ao ácido tânico)
<i>Castanea sativa</i> (castanha)	4,62 ± 0,11
<i>Caesalpinia spinosa</i> (vagem)	3,00 ± 0,53
<i>Acacia</i> sp. (liana)	4,62 ± 0,51

Fonte: O autor, 2014.

Nenhuma diferença marcante foi detectada no teor total de taninos em ambos os extratos vegetais, embora a amostra de *Caesalpinia spinosa* tenha apresentado um teor reduzido.

De acordo com Krisper *et al.* (1992), taninos de plantas *Castanea* são produzidos em diferentes partes do mundo e são facilmente extraídos com água quente. O teor de taninos na planta depende da idade da planta e dos tecidos em particular. Os autores também informaram que as unidades de 15-71 anos apresentaram teor de taninos totais variando de 6,9 a 10,7%. Eles também concluíram que a superfície e as camadas intermediária e interna da planta apresentam teores de taninos variáveis. Em outro estudo, Zhao *et al.* (2011), mostraram que nas espécies de *Castanea mollissima*, o conteúdo total de taninos variou de 2,41 a 5,13%, dependendo da técnica de extração utilizada. Estes resultados parecem concordar com a presente quantificação.

Em relação à espécie *Caesalpinia*, Siqueira *et al.* (2011) investigaram os níveis de taninos e compostos flavonoides em plantas medicinais, utilizando extração com solução de metanol de 50% (v/v). Entre dezenas de espécies estudadas, a *Caesalpinia pyramidalis* apresentou uma das maiores quantidades de taninos totais, cerca de 6,01%.

Quanto ao gênero *Acacia*, na obra de Aganga *et al.* (1997), a concentração total de tanino nas folhas e tiras da planta variou de 0,5 a 11,2%, dependendo das espécies e tecidos (Tabela 4). A amostra de tanino liana utilizada no trabalho de Aganga *et al.* (1997) é uma mistura de várias espécies de *Acacia*. Assim, uma comparação direta entre estes resultados e do presente trabalho não deve ser feita. Se, ao invés disso, se considerar valores médios, um valor de 3,8% é encontrado, que é próximo do valor calculado neste trabalho.

Pansera *et al.* (2003) extraíram taninos da espécie *Acacia mearnsii* usando fluidos supercríticos; altas concentrações de taninos totais foram obtidas. No entanto, quando o metanol, etanol, e água foram utilizados como solventes nas extrações supercríticas, a concentração total de tanino variou de 4,0 para 9,0%, dependendo do solvente utilizado.

Em outro trabalho, Rana *et al.* (2006) encontraram maiores concentrações de taninos totais na espécie *Acácia nilotica*. Os autores atribuíram esse alto teor às variações sazonais e o método utilizado para a extração (solução de cetona 70% v/v e reagente Folin-Ciocalteu, usando ácido tânico como padrão primário). O teor médio total na planta foi igual a 14,6%.

Tabela 4 - Concentração de tanino total em espécie *Acacia*.

Espécie coletada	% taninos totais (g/g)
<i>Acacia burkei</i>	0,8
<i>Acacia erubescens</i>	1,9
<i>Acacia fleckii</i>	1,3
<i>Acacia galpanii</i>	11,2
<i>Acacia girraffae</i>	0,5
<i>Acacia kirkii</i>	6,5
<i>Acacia mellifera</i>	0,9
<i>Acacia robusta</i>	8,0
Média	3,8

Fonte: Aganga *et al.*, 1997, f. 4.

Como pode ser verificado na literatura, existe uma grande variabilidade entre os resultados, dependendo das espécies de plantas, do método de extração e do procedimento para a quantificação. Pode-se assim constatar que a quantificação da concentração total de taninos não pode ser o único procedimento para corroborar com as observações por MEV. Assim, os valores obtidos neste estudo não podem ser utilizados para confirmar o comportamento oxidativo observado nas tiras de papel por meio de MEV. Isto é particularmente verdadeiro se o tanino liana for considerado. Conseqüentemente, a investigação do teor de taninos condensados nas amostras pode elucidar esse fenômeno.

2.3.4 Quantificação dos taninos condensados

A quantificação dos taninos condensados totais é altamente complexa, devido à diversidade de estruturas químicas encontradas neste grupo de compostos. A coleta de amostras, processo de secagem e métodos de extração afetam significativamente a quantificação destes compostos. Estas limitações contribuem para alguns inconvenientes na determinação de substâncias de elevado peso molecular e compostos insolúveis.

A vanilina é muito utilizada devido à sua reatividade com taninos condensados. De acordo com Schofield (2001), a escolha de uma substância padrão adequada para comparar os resultados é o ponto crítico para a determinação dos taninos condensado totais de uma amostra vegetal. Na verdade, um padrão interno, diretamente extraído e purificado a partir do material a ser quantificado é o melhor padrão para ser escolhido. No entanto, nem sempre é

possível realizar esta extração. Assim, de acordo com a literatura, o ácido pirogálico pode ser utilizado como um padrão de confiança. Os resultados do teor de taninos condensados em extratos vegetais são apresentados na Tabela 5.

A partir destes resultados, é visto que o método selecionado não detectou a presença de taninos condensados nos extratos vegetais de castanha e de vagem. Isto está em estreita concordância com os resultados observados por MEV, que mostraram diminuição da detecção de partículas agregadas sobre a superfície das tiras de papel contendo tintas com taninos das espécies *Castanea sativa* e *Caesalpinia spinosa*. O que confirma que os taninos condensados provavelmente estão em menor quantidade nas amostras, contribuindo assim para a reatividade das tintas ferrogálicas.

Tabela 5 - Quantificação de taninos condensados em amostras vegetais comerciais.

Fonte	Conc. de taninos condensados (% equivalente ao ácido pirogálico)
<i>Castanea sativa</i> (castanha)	N. D.
<i>Caesalpinia spinosa</i> (vagem)	N. D.
<i>Acacia</i> sp. (liana)	60± 2,5

Nota: N.D.= Não Detectado.

Fonte: O autor, 2014.

O maior teor de taninos condensados na amostra de *Acacia* também corrobora com as imagens MEV: a quantidade elevada de agregados sobre as tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas pode estar relacionada com a quantidade de taninos condensados, explicando a baixa reatividade de tanino de *Acácia* (liana) com o ferro adicionado às tintas.

Zivkovic *et al.* (2009) extraíram taninos condensados da espécie *Castanea sativa* com solução de etanol 50% v/v, seguido por filtração e quantificação pelo método da vanilina. Os valores médios indicaram a presença de pequenas quantidades de taninos condensados, de 1,02-2,62%. Kardel *et al.*, (2013) estudaram quatro extratos vegetais diferentes, utilizando 70% v/v de cetona e determinando o teor total de taninos condensados por meio do método do butanol. Os autores também encontraram uma baixa concentração de taninos condensados (0,46%) em *Caesalpinia spinosa*, corroborando com os resultados do presente trabalho.

O alto teor de agregados nas fibras de celulose encontrados no extrato vegetal liana, em comparação com os demais extratos, é corroborado pela elevada quantidade de taninos condensados encontrada, cerca de 60%. Carulla *et al.* (2005) trabalhando com o mesmo tanino liana utilizado no presente trabalho encontrou um teor de taninos condensados total igual a 61,5%, consistente com os resultados deste estudo. Grainger *et al.* (2009) também quantificaram o teor total de taninos condensados de *Acacia mearnsii* e encontraram 60,3%, utilizando a metodologia proposta por Carulla *et al.* (2005).

Conclusões

Dependendo da fonte de tanino utilizado na preparação de tintas ferrogálicas, os níveis de oxidação de ferro foram bastante diferentes. Esta oxidação é parcialmente explicada pela formação de partículas densas agregadas sobre a superfície das tiras de papel.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou ser uma ferramenta útil para a investigação dos estágios de degradação da tinta ferrogálica sobre a superfície do papel através da identificação de partículas de cristal e agregados, confirmando a falta de reatividade entre o ferro e taninos de diferentes receitas.

O aumento das concentrações de ferro nas diferentes preparações da tinta pode ser relacionado à oxidação através de análises por MEV. E a natureza do tanino, hidrolisável ou condensado, é uma indicação clara de que os padrões de degradação podem ser explicados em termos de reatividade.

As tintas ferrogálicas preparadas com ácido tânico e por fontes de taninos hidrolisáveis da *Castanea sativa* e *Caesalpinia spinosa* são mais estáveis devido à maior reatividade com o ferro. Os taninos condensados da *Acacia* sp. (liana) apresentam menor reatividade com o ferro, contribuindo assim para a formação de agregados na superfície das tiras de papel, um fato que pode ser confirmado pela microscopia eletrônica de varredura.

A concentração de taninos totais não esclareceu os padrões de reatividade observados nas tintas ferrogálicas. No entanto, a determinação de taninos condensados explicou a formação de partículas de agregado em observações microscópicas. Esta técnica, em associação com a microscopia eletrônica de varredura, apresenta uma visão sobre o uso de técnicas arqueométricas para a preservação do patrimônio cultural.

3 ESTUDO CINÉTICO DA REMOÇÃO DE FERRO NÃO REATIVO EM TINTAS FERROGÁLICAS

3.1 Revisão bibliográfica

3.1.1 Corrosão

O papel sempre foi o portador da notícia e sua estabilidade é de grande importância para a preservação da informação (Šelihet *et al.*, 2007). Durante séculos, as tintas ferrogálicas foram as mais usadas no mundo ocidental. Muitos documentos, manuscritos e obras de arte estão agora sofrendo graus variados de degradação devido à natureza corrosiva e instabilidade da cor da tinta (Kolar *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2006). A dimensão do problema é enorme: até 60% de documentos de arquivos com esta tinta estão amplamente danificados (Steeemers, 2006) e estima-se que cerca de 60-70% das obras de arte de Da Vinci estão afetadas pela corrosão causada pela tinta (Scholten, 1997).

Lee *et al.* (2006) afirmam que muitas tintas ferrogálicas têm uma tendência para sofrer alteração de cor do preto para o marrom, muitas vezes com desbotamento bastante significativo. Determinadas combinações de condições ambientais de armazenamento, composição da tinta e/ou do suporte têm, em muitos casos, resultado na perda parcial ou total do papel ou pergaminho, devido à tinta efetivamente 'comer' o seu caminho através do suporte.

A civilização ocidental deve muito da sua memória documental à estabilidade das tintas ferrogálicas (Albro e Biggs, 2008; Kolar e Strlic, 2006). Os artesãos que produziram as tintas ferrogálicas do passado seguiam uma receita comum, embora houvesse variações nos diversos tipos de fórmulas utilizadas (Rouchon *et al.*, 2013; Botti *et al.*, 2005). Todas estas tintas foram preparadas, basicamente, com uma mistura de um sal metálico e uma solução de tanino extraído da noz de galha. Uma grande quantidade de receitas foi relatada por diferentes autores, mencionando uma gama de ingredientes, cada um deles sendo mais ou menos puro. Todos estes ingredientes podem ter uma influência sobre o processo de degradação do papel. Uma grande quantidade de trabalhos tem sido realizada para explicar o papel da acidez e do teor de ferro na degradação do papel. No entanto, a variedade de aspectos visuais de inscrições originais sugere que muitos efeitos secundários podem ocorrer (Remazeilles *et al.*, 2001).

Os problemas causados por tintas ferrogálicas são conhecidos e estudados já há muito tempo. Em 1765, o químico inglês William Lewis publicou um tratado sobre a estabilidade de tintas ferrogálicas e em 1898 foi realizada na cidade de Saint Gallen, na Suíça, a primeira conferência para tratar sobre o tema – foi o ponto inicial das pesquisas científicas e sistemáticas sobre as causas desse processo degenerativo (Hanus *et al.*, 2009; Neevel e Reissland, 2005).

Dependendo das condições em que os documentos contendo tintas ferrogálicas estão armazenados, o processo de envelhecimento natural pode desencadear corrosão no suporte e causar danos consideráveis e irreversíveis ao papel. Nestes casos, é comum observar perfurações, formação de halos, esmaecimento e migração da tinta (Rouchon *et al.*, 2011a; Botti *et al.*, 2005; Eusman *et al.*, 2000).

Devido ao desconhecimento da estequiometria da reação durante muito tempo, a maioria das receitas históricas de tintas ferrogálicas possuía excesso de íons Fe^{2+} em relação à quantidade de tanino. Inicialmente, na combinação de íons Fe^{2+} com o componente de tanino orgânico, um complexo de ferro (II) é formado. Este complexo é solúvel em água e dá uma cor púrpura cinzenta pálida à tinta (Krekel, 1999). Uma vez que a escrita no suporte é exposta ao oxigênio do ar, este complexo de ferro (II) oxida à complexo de ferro (III), tornando a tinta preta e insolúvel em água. Se a proporção ideal entre o sulfato ferroso e o ácido gálico não é alcançada por quantidades estequiométricas dos ingredientes utilizados (provável no caso de produtos naturais, tais como a noz de galha), o excesso de um ingrediente irá ocorrer (Lee *et al.*, 2006), levando à ação direta das tintas no processo de despolimerização da celulose (Neevel, 1995).

O grande número de documentos históricos que resistem à ação do tempo há milênios, quando estocados em condições adequadas, confirmam o fato de que a celulose é um dos materiais orgânicos mais resistentes da natureza, mas pode sofrer hidrólise de suas ligações por mecanismos desencadeados pela acidez e pela presença de metais de transição livres (comumente presentes nas tintas ferrogálicas) durante o envelhecimento (Kolar e Strlic, 2006). A degradação da celulose é conhecida como dependente do pH do meio macromolecular (Strlič e Kolar, 2005). Em papéis ácidos, produzidos mais ou menos no período de 1850-1990, a hidrólise catalisada por ácido prevalece sobre a oxidação. Tal como a maior parte do papel produzido atualmente, o último processo é dominante em um ambiente alcalino macromolecular (Kolar, 1997).

Sendo assim, o tratamento para a estabilização das tintas ferrogálicas em documentos requer a adição de compostos alcalinos para neutralizar a hidrólise ácida (desacidificação) e

de antioxidantes para inibir o processo oxidativo catalisado por metais nas reações de Fenton (Malešič *et al.*, 2005).

A fim de aumentar a longevidade dos materiais, os tratamentos de estabilização têm sido desenvolvidos durante as últimas duas décadas. A sua eficácia tem sido muitas vezes determinada comparando as taxas de degradação durante os testes de envelhecimento acelerado. No entanto, tal avaliação usando materiais históricos é limitada pela quantidade de material requerido por vários métodos analíticos (Kolar *et al.*, 2012).

O envelhecimento de tintas é uma das causas mais importantes de corrosão dos suportes de papel, o mecanismo do qual depende da natureza dos componentes e as suas interações com o papel. A hidrólise ácida da celulose é causada pelo excesso de ácido sulfúrico na receita (Margutti *et al.*, 2001), enquanto que a oxidação ocorre via reação de íons ferrosos com peróxidos produzidos durante a oxidação de materiais orgânicos, liberando assim radicais hidroxilas, extremamente reativos. A redução de íons Fe^{3+} por muitos compostos orgânicos, ânions superóxidos e até mesmo peróxidos, permite estas reações serem repetidas de forma cíclica, resultando em grandes danos oxiradicaís. A reação primária levando à produção de radicais hidroxilas tinha sido utilizada por Fenton para a oxidação de ácido tartárico em 1876 (Fenton, 1876) e é, desde então, referida como a reação de Fenton:



Supõe-se que a espécie oxidativa resultante seja o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), embora alguns autores argumentam que o íon Fe^{4+} (estado *oxyferryl*) pode ser o oxidante real. Sabe-se que outros metais de transição em um estado de oxidação inferior podem substituir Fe^{2+} na reação acima (Strlič *et al.*, 2003).

A hidrólise ácida da celulose é impedida por desacidificação: os ácidos em papel podem ser neutralizados por imersão em soluções aquosas de hidrogenocarbonatos de cálcio ou de magnésio, ou soluções ou suspensões dos seus óxidos, alcoolatos, etc., em solventes orgânicos. A faixa de pH alcançada depois de tais tratamentos é de aproximadamente 7-9, por conseguinte, em estudos de processos catalisados por metal de transição, este é o intervalo de pH de interesse primário (Šelih *et al.*, 2007). No caso da deterioração oxidativa, esta é geralmente inibida pela adição de antioxidantes (Sala *et al.*, 2006).

No atual trabalho o ácido fítico é utilizado como antioxidante para o tratamento de documentos históricos, este composto pertence ao grupo de compostos que inibem ou retardam a formação dos radicais livres (Botti *et al.*, 2005).

3.1.2 Fitato de cálcio

Recentemente, muitos artigos de revisão sobre antioxidantes provenientes de diferentes fontes e os diferentes procedimentos de extração e quantificação têm sido publicados. Os antioxidantes de frutas, legumes e bebidas desempenham um papel importante na saúde humana, por exemplo, prevenindo câncer e doenças cardiovasculares, e reduzindo a incidência de outras doenças. Recentemente, muitas metodologias de análise envolvendo diversas técnicas instrumentais foram desenvolvidas para a extração, separação, identificação e quantificação destes compostos. Os antioxidantes têm sido quantificados por diferentes investigadores, utilizando um ou mais dos seguintes métodos: *in vivo*, *in vitro*, eletroquímico, quimioluminescente, ressonância de spin eletrônico, cromatografia, eletroforese capilar, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho próximo e métodos de espectrometria de massa (Oroian e Escriche, 2015).

Como já foi dito, a celulose é um polímero estável em ambientes moleculares adequados. Entretanto, a acidez promove a hidrólise da celulose e certos metais de transição promovem a sua oxidação (Šelih *et al.*, 2007; Strlič e Kolar, 2005), ambos componentes de tintas ferrogálica. Vários tratamentos de estabilização têm sido propostos para combater ambos os problemas de acidez e de metais de transição. Tratamentos contendo vários antioxidantes, desde antioxidantes preventivos até eliminadores de radicais e decompositores de peróxido (Kolar *et al.*, 2008; Kolar *et al.*, 2003) foram testados e, alguns, introduzidos na prática (Strlič *et al.*, 2010). De acordo com o seu mecanismo de ação, podem ser classificados em dois grupos: os que interrompem a reação em cadeia dos radicais livres, catalisada pelos metais de transição, e aqueles que inibem ou retardam a formação desses radicais livres a partir dos seus precursores instáveis, particularmente os hidroperóxidos (Scott, 1997). Diversas metodologias para estabilização e conservação de documentos históricos têm sido estudadas e aplicadas ao longo das últimas décadas, mas o que é utilizado com mais frequência é o chamado “método fitato de cálcio” (Neevel, 1995).

O ácido fítico é um antioxidante natural, presente em sementes, cuja principal função é bloquear os processos de oxidação de ácidos graxos insaturados, que são catalisados pela presença do ferro. Sendo assim, no caso específico do tratamento de documentos históricos, este composto pertence ao grupo de compostos que inibem ou retardam a formação dos radicais livres (Botti *et al.*, 2005). De acordo com Sala *et al.* (2006), o ácido fítico teoricamente duplica o tempo de vida do papel que contém ferro, embora o seu modo de ação ainda não esteja completamente claro. O fitato (hexafosfato de mio-inositol) é o ácido fítico

sob a forma de sal, sendo o fitato de cálcio e de magnésio os mais utilizados. A alta solubilidade do fitato de sódio permite sua migração para as bordas do papel durante a secagem, provocando manchas e justificando a sua escassa utilização. Como o fitato é um potente agente quelante, ele possui a capacidade de complexar ou precipitar com alguns cátions polivalentes, como íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , sendo que dependendo da razão fitato/ferro presente em solução, pode-se encontrar fitato mono, di, tri ou tetra de ferro. O ânion (fitato), aparentemente ocupa todos os sítios de coordenação disponíveis dos íons de Fe^{2+} , evitando assim a reação dos íons ferrosos com hidroperóxidos. Uma vez que representa apenas um perigo moderado para a saúde, foi recentemente proposto como um antioxidante preventivo para celulose contendo tinta ferrogálica (Sala *et al.*, 2006). Por ocupar todos os sítios de coordenação do ferro, o fitato impede que este íon permaneça livre para participar das reações de Fenton (Rouchon *et al.*, 2011b).

O método para o tratamento consiste na imersão do documento em solução de fitato de cálcio por um tempo determinado. Logo após, o documento precisa passar por um processo de deacidificação, para que o seu pH final não favoreça a hidrólise ácida da celulose. Normalmente, o deacidificante mais utilizado é carbonato de cálcio. Por mais que seja o método mais empregado, o tratamento com fitato de cálcio possui alguns efeitos colaterais como migração da tinta, mudança na cor da tinta e a acidificação do suporte celulósico (Malešič *et al.*, 2014).

Infelizmente, devido à fraca solubilidade do fitato em meios não-aquosos, ele não pode ser usado para itens sensíveis à água, tais como livros encadernados (Sala *et al.*, 2006).

A maioria dos antioxidantes tem sido utilizada em tentativas para estabilizar tinta ferrogálica contida em documentos, em que há reações de oxidação catalisada por íons de Fe^{2+} . Além do fitato de cálcio, o iodeto de potássio e outros haletos, bem como fitato de magnésio têm sido estudados para esta finalidade. Embora o fitato de cálcio tenha sido descrito como antioxidante preventivo, na literatura verifica-se que a sua função principal é como agente quelante para os íons de ferro, a fim de suprimir a reação de Fenton (Jeong *et al.*, 2014). No entanto, apesar do seu uso generalizado em conservação, a falta de um método de análise apropriado limita os estudos da eficácia do tratamento de alguns modelos de papéis, no qual a tinta ferrogálica fabricada em laboratório foi aplicada (Kolar *et al.*, 2012).

3.1.3 Cinética de dessorção

A dessorção representa um processo de emissão de espécies químicas sobre uma superfície sólida. Antigos manuscritos escritos com tinta ferrogálica podem ser tratados por imersão em soluções aquosas para remover os compostos de ferro em excesso que são responsáveis pela sua degradação. Os tratamentos de imersão têm duração que varia de alguns minutos até mais de meia hora. A taxa de dessorção depende da densidade das espécies químicas, da força de ligação à superfície e da temperatura da superfície (Matsushima, 2013).

Segundo Smith *et al.* (2007), informações experimentais sobre a cinética de dessorção seria um auxílio útil para o desenvolvimento de diversas pesquisas, mas geralmente estas não são bem desenvolvidas. Embora haja considerável literatura sobre a cinética de adsorção de metais dissolvidos, muito menos se sabe sobre os mecanismos e cinética de dessorção (Millward e Liu, 2003).

A preservação e conservação, bem como investigações arqueométricas de manuscritos históricos é uma tarefa cultural importante. O fato de que, até agora, poucos esforços foram dedicados à análise sistemática dos artefatos históricos em processo de deterioração é em grande parte devido ao seu valor inerente. Eles não podem ser facilmente transportados para os laboratórios, enquanto que os métodos analíticos estão limitados aos não-destrutivos ou micro-destrutivos.

Nos últimos anos, uma série de técnicas de análise instrumental, como a espectroscopia de absorção atômica, espectrometria de fluorescência de raios-X, espectrometria de raios-X de reflexão total, microscopia eletrônica de varredura/energia dispersiva, ablação a laser em espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, espectrometria de raios-X induzida por prótons, espectroscopia de absorção de raios-x próximo a borda e espectroscopia Mossbauer têm sido usada para descrever o tipo, a quantidade ou o estado de oxidação dos metais de transição no papel contendo tinta ferrogálica (Kolar *et al.*, 2006).

Nesta pesquisa, um estudo cinético foi realizado para a remoção de ferro das tiras de papel impregnadas com tintas ferrogálicas. O objetivo dessa modelagem foi verificar a remoção do ferro em excesso quando este alcança o equilíbrio com a fase líquida constituída por uma solução de fitato. Dois diferentes modelos cinéticos foram utilizados para ajustar os dados experimentais. O modelo de Lagergren ou de pseudo-primeira ordem (Eq. 1) foi o primeiro a ser considerado:

$$\frac{dC}{dt} = k_1(C_e - C) \quad (1)$$

No qual C_e (mg.L^{-1}) e C (mg.L^{-1}) são as concentrações de ferro desorvido das tiras de papel no equilíbrio e no tempo t , respectivamente, enquanto que k_1 é a constante de velocidade de Lagergren. Ao integrar a Eq.1 entre os limites, $t = 0$ a $t = t$ e $C = 0$ a $C = C_e$, obtem-se a Eq. 2:

$$\log(C_e - C) = \log C_e - \left(\frac{k_1}{2.303}\right)t \quad (2)$$

O traços lineares de $\log(C_e - C)$ contra t indicam a aplicabilidade deste modelo cinético. O valor de C_e deve ser pré-estimado extrapolando os dados experimentais para $t \rightarrow \infty$.

O modelo de segunda ordem é baseado na suposição de que a taxa de liberação de ferro para a solução é proporcional ao quadrado do número de sítios não ocupados (Eq. 3):

$$\frac{dC}{dt} = k_2(C_e - C)^2 \quad (3)$$

No qual k_2 é a constante de velocidade de uma reação de segunda ordem.

Ao integrar a Eq. 3 para as condições de contorno $t = 0$ a $t = t$ e $C = 0$ a $C = C_e$, e em seguida linearizar (Eq. 4):

$$\frac{t}{C} = \left(\frac{1}{k_2}\right)(C_e)^2 + \left(\frac{1}{C_e}\right)t \quad (4)$$

C_e e k_2 podem ser calculados a partir da inclinação e da intercessão da reta t/C contra t . É importante notar que, apesar de uma estimativa do valor experimental para C_e possa ser obtida, não é necessário ser aplicado para este modelo. Ao traçar t/C contra t , uma linha reta pode ser obtida para todas as concentrações em estudo, na qual a constante de velocidade de segunda ordem (k_2) e valores C_e podem ser determinados.

3.2 Metodologia

3.2.1 Confecção das tintas ferrogálicas

Para o preparo das tintas ferrogálicas foram utilizados $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido tânico ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), goma arábica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e etanol 95% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). A Tabela 6 apresenta a composição das tintas usadas neste estudo.

Tabela 6 - Composição química das tintas ferrogálicas confeccionadas.

Tinta	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	Ácido tânico (g)	Goma arábica (g)	Etanol (mL)
A	0,5	5,5	2,0	5,0
B	1,0	5,5	2,0	5,0
C	2,0	5,5	2,0	5,0
D	10,0	5,5	2,0	5,0

Nota: Quantidades totais para 50 mL.

Fonte: O autor, 2014.

A tinta A, a única com menor quantidade de ferro (metade) em relação aos valores recomendados para o preparo de tintas quimicamente estáveis foi formulada com o objetivo de verificar o comportamento quanto à reatividade do Fe^{2+} em presença de excesso de ácido tânico.

A tinta B foi formulada com as quantidades estequiométricas de ferro e ácido tânico, sendo considerada a tinta de referência.

As tintas C e D foram preparadas para simular as tintas com excesso de ferro na sua composição e que são as principais responsáveis pela degradação de suportes celulósicos pela ação do ferro livre oxidado, não reativo com o ácido tânico.

As tintas ferrogálicas foram preparadas a pressão e temperatura ambientes e expostas ao ar atmosférico por 24 horas, para promover o fortalecimento da cor após a formação do complexo galotânico, proveniente da reação entre o ácido tânico e o sulfato ferroso. Após esta etapa, as tintas foram mantidas em frascos âmbar selados protegidos da luz, a temperatura ambiente.

3.2.2 Impregnação das tintas em tiras de papel

Inicialmente, foram adicionados 20,0 mL de tinta num bécher de 50 mL e em seguida foram imersas, por um período de 5 minutos, as tiras de papel Whatman nº1, com dimensão 6,0 x 1,0 cm. Esse processo de imersão foi realizado até que a altura da tinta no papel fosse de 2,0 cm, resultando numa área total de impregnação de 2,0 cm² para todas as amostras. Após este procedimento, as tiras foram secas ao ambiente por 24 horas, a fim de ajudar na fixação dos componentes nas tiras de papel, e depois submetidas a uma temperatura de 100°C durante 2 dias, em tubos de vidro, a fim de promover o envelhecimento artificial e acelerar a oxidação das amostras (da Costa *et al.*, 2013).

Após esse procedimento seguiu-se ao tratamento com fitato de cálcio, para a remoção do ferro não reativo, procedendo-se, posteriormente, a uma nova etapa de envelhecimento acelerado e um novo tratamento, nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.2.3 Solução de fitato de cálcio para remoção de Fe²⁺ não reativo

Duas soluções de fitato de cálcio foram preparadas utilizando solução aquosa de ácido fítico (Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e CaCO₃ (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). As quantidades utilizadas para o preparo dessas soluções estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição química das soluções de fitato para a extração de ferro.

Solução	Ácido fítico (mL)	CaCO ₃ (g)	Água (L)
1	0,875	0,22	1,0
2*	1,75	0,44	1,0

Nota: *Solução de referência

Fonte: Neevel, 1995.

A solução 2 foi preparada de acordo com metodologia descrita por Neevel (1995), sendo utilizada como solução referência, e a solução 1 foi preparada com metade da concentração recomendada para a solução de fitato, a fim de avaliar a eficiência da remoção de Fe²⁺ por soluções mais diluídas, uma vez que a solução de referência (2) é recomendada para emprego em tintas com excesso reconhecido de Fe²⁺. Primeiramente, o carbonato de cálcio foi adicionado vagarosamente e em pequenas quantidades ao ácido fítico num becher e agitou-se esta mistura com bastão de vidro até a formação de uma

pasta marrom homogênea, livre de grânulos. Esta pasta foi dissolvida em 100 mL de água destilada e o volume final foi ajustado em balões volumétricos de 1,0 L. Sob agitação constante, o pH foi ajustado entre 5,5 e 6,0 pela adição de gotas de NH_4OH (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

3.2.4 Cinética da remoção de ferro pelas soluções de fitato

Após o envelhecimento acelerado, todas as tiras de papel impregnadas com as tintas foram submetidas a duas etapas consecutivas de lavagem com cada uma das soluções de fitato. Foram adicionados 5,0 mL das soluções de fitato em tubos de vidro e as tiras de papel foram inseridas de maneira que a área preenchida pela tinta ficasse completamente imersa no líquido. A avaliação cinética da remoção do ferro pelas soluções de fitato deu-se pelo contato (sem agitação) das soluções com as tiras de papel nos tempos de 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. Após esta primeira etapa, as tiras foram secas ao ambiente por 24 horas e retornaram à estufa para novo envelhecimento artificial, nas condições previamente citadas. Com isso, as amostras passaram por uma segunda etapa de lavagem com as soluções de fitato, em triplicata, exercendo-se o mesmo procedimento e tempos descritos anteriormente, após a segunda etapa de envelhecimento acelerado. Todas as amostras líquidas de fitato foram enviadas para as determinações das concentrações de ferro removido por espectrometria de absorção atômica.

3.2.5 Determinação analítica do ferro

A quantificação da concentração de ferro em excesso removido na solução de fitato de cálcio foi realizada através de um espectrômetro de absorção atômica de fonte contínua de alta resolução, ContrAA 300 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha), equipado com chama ar/acetileno, responsável pela atomização do metal de interesse. Como combustível para a chama, utilizou-se acetileno de elevada pureza (Linde Gases, Rio de Janeiro, Brasil) e a taxa de fluxo da mistura de gases foi de 85 L.h^{-1} .

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. O preparo de todas as soluções padrão foi realizado a partir de uma solução estoque de ferro de $1,000 \text{ mg.L}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha), e as mesmas foram avolumadas em água ultrapura com

resistividade não inferior a 18.2 M Ω cm obtida a partir de um sistema de purificação de água Master System All (Gehaka, São Paulo, Brasil).

Para a leitura, a taxa de aspiração foi fixada em 10 mL.min⁻¹, e todas as medições foram realizadas em triplicata. A principal linha de Fe (248.327 nm) foi a selecionada para o experimento. De modo a obter sinais analíticos adequados, o tempo de medição foi fixado em 3 s. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para o analito foi calculado como 3 e 10 vezes, respectivamente, o desvio padrão de 10 medições de solução de branco dividido pela inclinação da curva de calibração de concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg.L⁻¹. Todas as amostras foram previamente testadas e seus sinais de absorbâncias contrastados com o sinal referente ao padrão de 4,0 mg.L⁻¹. Caso o sinal oriundo da amostra fosse maior que o do último padrão da curva, a mesma era diluída para que pudesse se adequar à curva de calibração.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Cinética da remoção de ferro pelas soluções de fitato

As Figuras 12 e 13 mostram as concentrações de ferro obtidas por espectroscopia de absorção atômica nas soluções de fitato utilizadas para lavagem das fitas impregnadas com as tintas ferrogálicas, tanto na primeira quanto na segunda lavagem.

Pode-se observar, tanto na primeira como na segunda lavagem, para as duas soluções de fitato utilizadas, que a concentração de ferro nestas soluções aumentou de acordo com o aumento da concentração deste metal presente inicialmente na confecção das tintas. Essa observação confirma o resultado esperado ao preparar tintas mais concentradas em ferro, mantendo-se constante a quantidade de ácido tânico adicionado. Desta maneira, tem-se cada vez mais ferro livre para oxidação pelo ar atmosférico, e conseqüentemente, mais ferro livre para ser removido pelas soluções de fitato.

Para todas as tintas e tempos estudados, as soluções removeram mais ferro na primeira lavagem, indicando uma provável estabilização do processo de remoção de ferro da estrutura do papel já na primeira fase de tratamento. A primeira lavagem, em ambos os casos (soluções de fitato 1 e 2) demonstra um perfil crescente para a concentração de ferro com tendência clara à estabilização. Isso é indicativo de uma possível saturação da solução de dessorção de ferro, estabelecido entre 15 e 30 minutos para as primeiras lavagens de todas as tintas,

independentemente da concentração de ferro empregada na receita. Em concordância com o que foi observado até aqui pelas análises cinéticas realizadas, Rouchon *et al.* (2011a) afirmaram que os processos de solubilização e equilíbrio na remoção do ferro ocorrem até o tempo de 30 minutos. No entanto, esse tempo pode ser variável de tinta para tinta, e dependente da metodologia adotada. Isto mostra que a lavagem posterior à primeira é de suma importância a fim de se tentar remover a maior quantidade possível de ferro da tinta presente no suporte. Lavagens subsequentes têm que ser pesquisadas visando avaliar sua eficácia. Ao mesmo tempo, deve-se limitar o tempo e a quantidade de vezes da exposição do papel a banhos aquosos, devido à sensibilidade à água que a tinta e o papel possuem (Rouchon *et al.*, 2009).

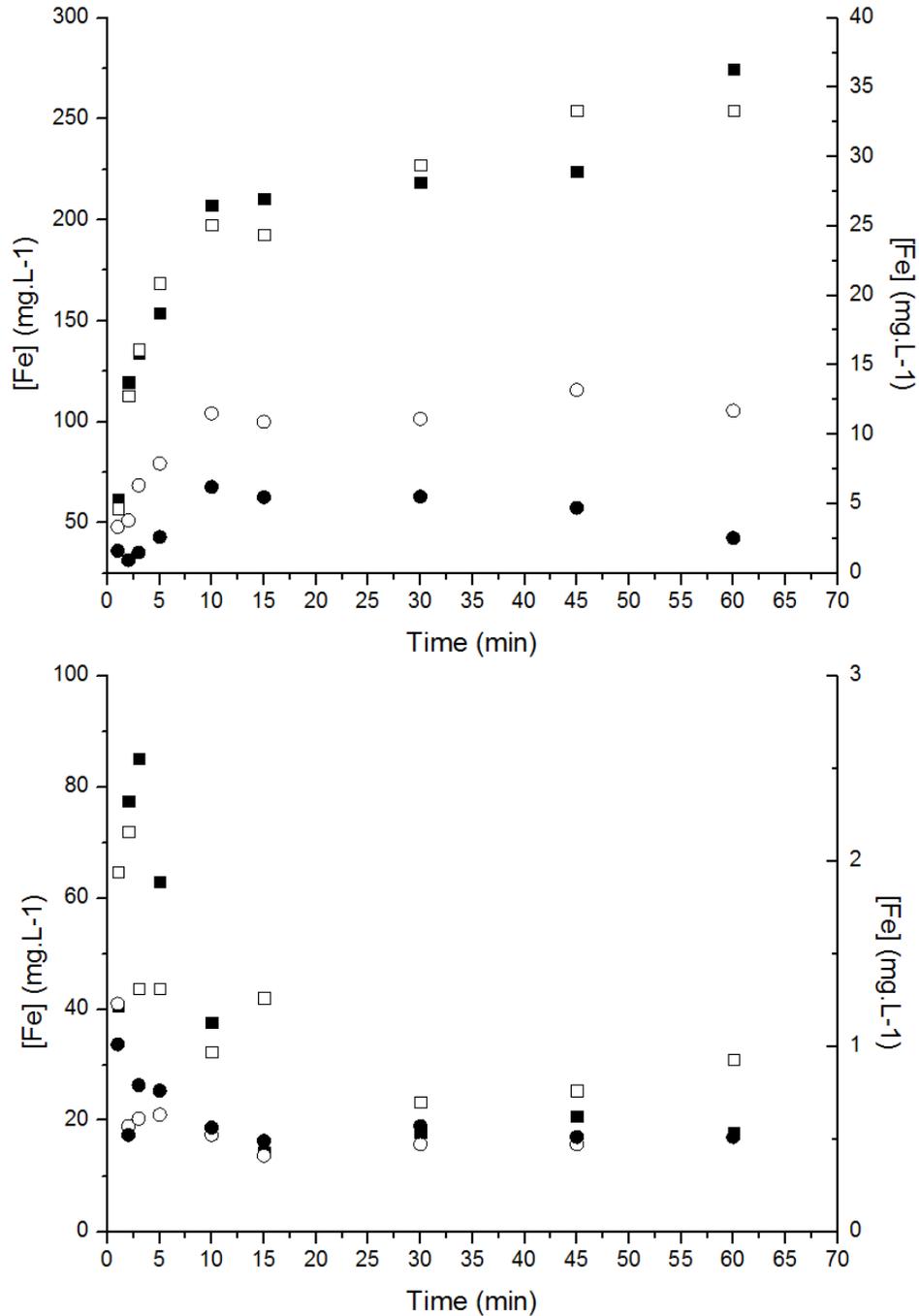
Ao observar as Figuras 12 e 13, especificamente na primeira lavagem nota-se para todas as tintas um pequeno aumento nas concentrações de ferro nos primeiros minutos do processo de remoção. Com exceção da tinta D, as demais tintas, que possuem menor concentração de ferro, dão a impressão de tenderem ao equilíbrio já nos instantes iniciais. De maneira contrária, e valendo-se da condição de possuir uma concentração de ferro no mínimo cinco vezes maior, mesmo após esse período, as concentrações de ferro removido da tinta D continuaram a aumentar. Talvez, para tempos maiores que 60 minutos, essa remoção possa ser ainda maior, necessitando-se de uma avaliação cinética para concluir sobre a estabilização da tinta. Na segunda lavagem, todas as tintas apresentaram o mesmo perfil, nas devidas proporções, com a diminuição da quantidade de ferro removida a partir dos 5 minutos iniciais. Isto indica que os banhos posteriores em que o papel poderá ser submetido não necessitam de tempos maiores do que cinco minutos para a remoção máxima possível de ferro.

Os resultados obtidos mostram que as soluções de fitato (em ambas as concentrações) podem ser muito eficientes no tratamento de uma enorme gama de documentos com diferentes tipos de tintas ferrogálicas.

Devido à maior quantidade de ferro presente na tinta D, a segunda lavagem com as soluções de fitato apresentou um perfil diferente das que já tinham sido observadas anteriormente: até praticamente os primeiros três minutos, a segunda lavagem removeu quantidades de ferro que não podem ser desprezadas em relação à primeira lavagem, diferentemente deste mesmo tipo de análise para as tintas anteriores, onde a diferença entre os valores removidos da primeira e segunda lavagem praticamente levaram a um descarte desta segunda etapa. Pode-se observar também que este bom desempenho da segunda lavagem nos primeiros minutos diminui entre os tempos de 5 e 10 minutos, indicando que para este tipo de

tinta a segunda lavagem é importante mas não é necessário que ultrapasse tempos maiores que estes, uma vez que o equilíbrio se estabelece rapidamente.

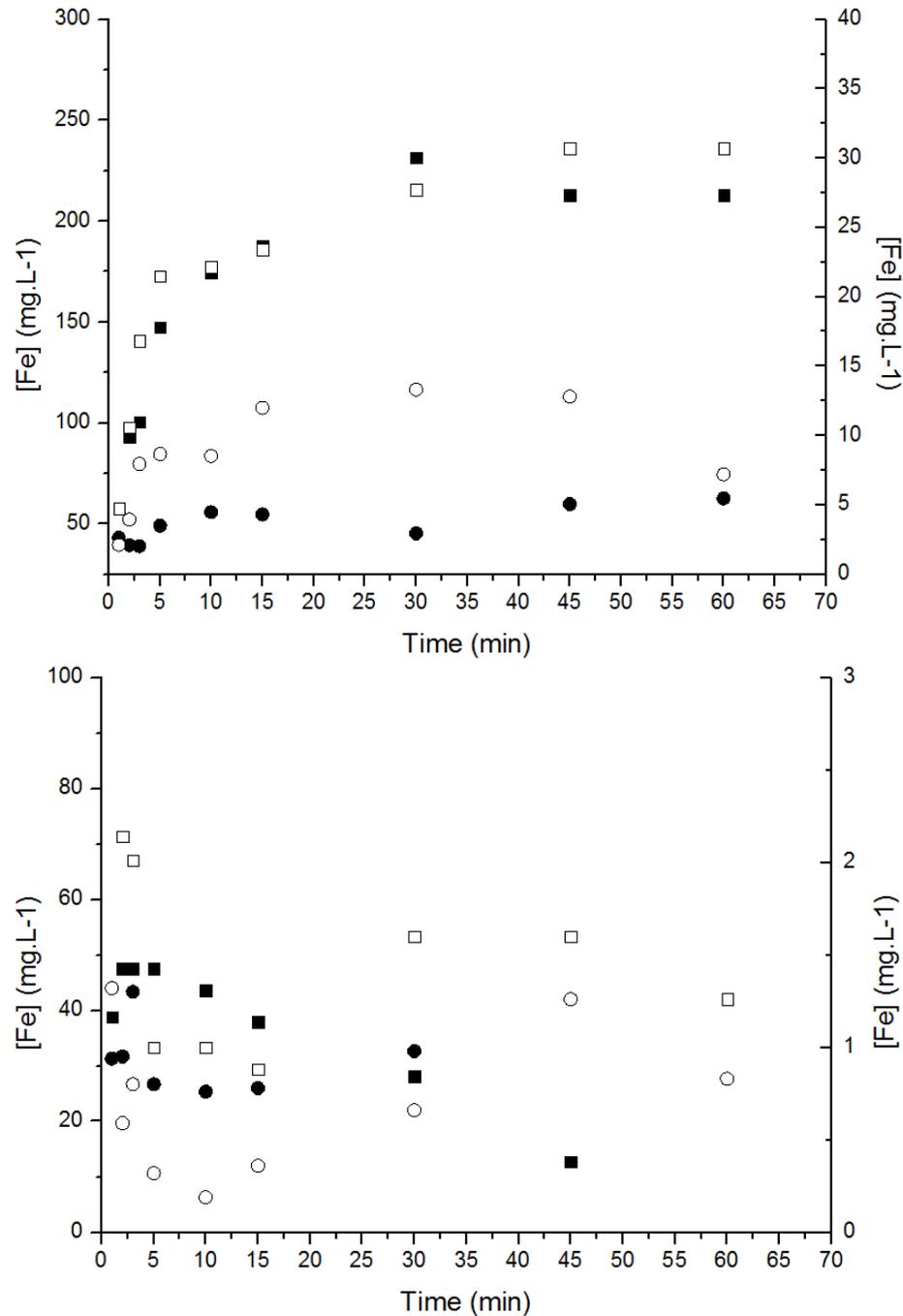
Figura 12 - Cinética de remoção do ferro em solução de fitato 1, 1ª e 2ª lavagem, respectivamente.



Legenda: ● Tinta A (1/2 da estequiometria); ○ Tinta B (estequiométrica); □ Tinta C (2 x estequiometria); ■ Tinta D (10 x estequiometria). Tinta D – eixo Y principal; Tintas A, B, C – eixo Y secundário.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 13 - Cinética de remoção do ferro na solução de fitato 2, 1ª e 2ª lavagem, respectivamente.



Legenda: ● Tinta A (1/2 da estequiometria); ○ Tinta B (estequiométrica); □ Tinta C (2 x estequiometria); ■ Tinta D (10 x estequiometria). Tinta D – eixo Y principal; Tintas A, B, C – eixo Y secundário.

Fonte: O autor, 2015.

Kolar *et al.* (2007) estudaram a estabilização de tintas ferrogálicas utilizando fitato de magnésio. Os pesquisadores utilizaram uma tinta preparada com o dobro da razão tanino/ferro da tinta D usada no presente trabalho, ou seja, com metade da concentração de ferro utilizada nesta tinta. As tiras de papel Whatman impregnadas com as tintas foram envelhecidas a 70°C

e 65% de umidade por 11 dias. Após este processo, as tiras foram submersas numa solução de fitato de cálcio (com a mesma concentração utilizada neste trabalho na solução 2) por um período entre 15 - 20 minutos e na solução de fitato de magnésio (2,88g de ácido fítico 40% m/m e 0,2g de $MgCO_3$ em 1,0 L de água) por 15 minutos. De acordo com os resultados apresentados, a solução de fitato de cálcio removeu 44,0% do ferro presente no papel e a solução de fitato de magnésio 42,0%, evidenciando que para as condições do experimento não houve diferenças significativas entre a atuação dessas duas soluções.

No trabalho de Rouchon *et al.* (2011b), a combinação de técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado e espectroscopia de alta resolução da borda de absorção foi utilizada para estudar a atuação da solução de fitato em manuscritos danificados por tintas ferrogálicas. Os pesquisadores utilizaram uma tinta preparada com metade da razão tanino/ferro da tinta D, ou seja, uma tinta com o dobro da concentração de ferro para esta tinta. As tiras de papel Whatman impregnadas com as tintas foram envelhecidas a 70°C e 65% de umidade por seis dias. Após este processo, as tiras foram submersas em uma solução de fitato (com a mesma concentração utilizada neste trabalho para a solução 2), com quatro valores diferentes de pH (4,8 a 6,0) por um período de 15 minutos. As soluções com fitato de cálcio removeram em média 30% do ferro inicial, sendo que as soluções com pH 6,0 removeram de 40 a 45% do ferro, apresentando o melhor resultado para as soluções de fitato testadas.

Devido à presença de substâncias redutoras no papel, nem todo íon Fe^{2+} é oxidado a íon Fe^{3+} ; por isso, mesmo séculos depois de serem aplicadas ao papel, as antigas tintas ferrogálicas ainda podem conter quantidades substanciais de íons Fe^{2+} . Este, por sua vez, pode acelerar a degradação da celulose por oxidação mediante dois processos: produção direta de radicais orgânicos e a sua subsequente oxidação; e produção de peróxido de hidrogênio que é decomposto por íons Fe^{2+} em um radical hidroxila e um íon hidróxido (Neevel, 1995). Devido à sua reatividade, os radicais hidroxila são geralmente considerados como sendo os principais reagentes responsáveis pela degradação de celulose por oxidação (Robert *et al.* 2002).

Dzinavatonga *et al.* (2015) estudaram o risco de degradação por oxidação de quatro documentos históricos através da determinação dos estados de valência do ferro utilizando Espectroscopia Mössbauer; esta técnica é capaz de estabelecer a contribuição relativa de íons Fe^{2+} para a quantidade total de ferro em uma tinta ferrogálica de um manuscrito. Eles verificaram que somente uma das amostras continha tanto íons Fe^{2+} (21%) quanto íons Fe^{3+} (79%); todas as outras amostras tinham apenas íons Fe^{3+} .

Neevel (1995) usou esta técnica e obteve uma concentração de íons Fe^{2+} em torno de 20% para uma tinta de um manuscrito do século XVIII. Este manuscrito mostrou graves danos pela corrosão da tinta.

Wagner *et al.* (2004) constataram que a distribuição dos íons Fe^{2+} é homogênea em toda a região da tinta, sendo mais rico na interface papel-tinta, enquanto que os íons Fe^{3+} residem predominantemente na superfície. Ainda, Yue *et al.* (2014) relataram que a maior parte dos íons Fe^{3+} é distribuído como complexos ou precipitados e os íons Fe^{3+} livres são responsáveis apenas por um pequeno percentual, enquanto que os íons Fe^{2+} existem em uma grande quantidade na forma livre, com o restante dissolvido na forma de complexos.

Batterham e Rai (2008) realizaram um projeto envolvendo os testes de propriedades físicas e químicas de seis papéis antes e após o envelhecimento artificial, a fim de fornecer alguns dados úteis sobre uma previa estimativa da equivalência entre o envelhecimento artificial e natural. Eles verificaram que as amostras de papel envelhecidas naturalmente por 27 anos foi equivalente aos resultados dos testes com amostras de papel após o envelhecimento artificial durante 3 dias a $105 \pm 2^\circ\text{C}$. Fazendo uma relação matemática com os resultados desse estudo é razoável considerar que a idade das tiras de papel após o envelhecimento artificial utilizadas no presente trabalho é de 18 anos. Considerando a quantidade de sulfato ferroso diferentemente adicionado em cada tinta é aceitável que a oxidação dos íons Fe^{2+} a Fe^{3+} não tenha ocorrido inteiramente no suporte, devido ao curto período de tempo, restando, desta forma, uma quantidade expressiva de íons Fe^{2+} .

O ácido fítico forma complexos ao longo de uma ampla gama de valores de pH (1-12) com uma variedade de cátions polivalentes na seguinte ordem decrescente de estabilidade, a saber: $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ (Maenz *et al.*, 1999). Mediante o aumento da concentração de fitato, mais fitato de ferro (III) é formado e mais Fe^{3+} é dissolvido.

Baseado nesse levantamento bibliográfico é admissível pensar que na primeira lavagem a formação de uma espessa camada de tinta na superfície do papel viabilizou uma remoção física, seguida pela complexação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} ainda contidos na tinta, pelas duas soluções de fitato de cálcio em diferentes concentrações de ácido fítico; considerando sua maior afinidade pelo íon Fe^{2+} . Já na segunda lavagem, pode-se considerar que só existiam traços de íons Fe^{2+} e que o que foi oxidado a íons Fe^{3+} (como consequência do novo envelhecimento artificial) foi removido como complexo de fitato de ferro (III) quanto maior foi a concentração de fitato de cálcio utilizada.

Uma comparação da remoção média de Fe em função da quantidade de sulfato ferroso adicionado inicialmente está apresentada na Tabela 8. É possível observar que as tintas A, B e C apresentaram uma relação coerente. Por outro lado, para a tinta D não há uma correlação direta entre a quantidade de ferro adicionado e removido na primeira lavagem. Essa falta de proporcionalidade, quando comparada às outras tintas, pode ser explicada pela cobertura densa de ferro oxidado que fica depositado na superfície da tira de papel, formando um tipo de blindagem ou levando à formação de cristais, que impedem a remoção mais eficiente dos íons Fe^{2+} das camadas mais internas.

Tabela 8 - Quantidade média de ferro removido na 1ª lavagem em função da concentração de ferro na tinta.

Tinta	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	Fe ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Qtd. média Fe removido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
A	0,5	20,0	5,3
B	1,0	40,0	11,8
C	2,0	80,0	24,3
D	10,0	400,0	199,2

Fonte: O autor, 2015.

Neste caso, um único tratamento de deacidificação com soluções de fitato de cálcio não é suficiente para evitar que a tinta sofra nova oxidação, porque a corrosão causada pela oxidação catalisada pelo íon Fe^{2+} está bloqueada apenas temporariamente (Orlandini, 2009), visto que os íons Fe^{2+} serão mais uma vez oxidados a Fe^{3+} após nova passagem de tempo (segundo envelhecimento artificial) (Burgaud *et al.*, 2010). Isso explicaria a concentração significativa de íons de ferro ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) mesmo na segunda lavagem para a tinta D. Desta forma é possível afirmar que a cinética de remoção se comporta de forma coerente, independentemente da quantidade de ferro adicionado, até uma determinada concentração; não obedecendo a essa tendência para a tinta D, que está muito longe da composição estequiométrica.

Camera (2007) examinou os cristais formados nas tintas ferrogálicas em desenhos da coleção do Departamento de Gravuras e Fotografias do Museu de Belas Artes de Boston. Os cristais de tinta puderam ser observados mais frequentemente em desenhos em que uma quantidade substancial de tinta permanece na superfície do papel. Análises instrumentais identificaram a composição química do material cristalino como sulfatos, principalmente de ferro. A composição da tinta e o local de formação desses cristais foram examinados por meio

de envelhecimento acelerado de doze conjuntos de amostras. Cada conjunto considerou vinte misturas de tinta com distintas razões de sulfato ferroso/tanino/goma arábica. O experimento revelou um aumento na frequência de cristalização sobre o envelhecimento com amostras contendo altas concentrações de sulfato ferroso e mínima concentração de goma ligante.

A corrosão das tintas ferrogálicas é fortemente influenciada pelo envelhecimento, armazenamento, temperatura e umidade relativa, entretanto, Reissland (2000a) notou que mais dois fatores que geralmente são negligenciados também têm um impacto na quantidade de danos causados pela corrosão da tinta: a quantidade de tinta aplicada e o dimensionamento do papel. Uma camada grossa de tinta é propensa a causar mais danos do que uma fina, uma vez que deixa uma maior área superficial do suporte vulnerável à corrosão (Kolar & Strlic, 2006). Do mesmo modo, um papel com pouca ou nenhuma encolagem absorverá mais facilmente a tinta em suas fibras do que um papel de porte duro, onde a tinta tenderá a depositar-se sobre a superfície.

3.3.2 Modelagem cinética da remoção de ferro

Os resultados da modelagem cinética encontram-se apresentados na Tabela 9. A partir dos resultados pode-se verificar que tanto a solução de fitato 1 quanto a solução de fitato 2 removeram o ferro não reativo das fitas impregnadas com tinta ferrogálica, seguindo um modelo reacional de pseudo-primeira ordem.

Tabela 9 - Remoção de ferro em função da tinta.

Fitato/ Tinta	Modelo Cinético					
	Pseudo-primeira ordem			Segunda ordem		
	R ²	C _e teórica (mg.L ⁻¹)	C _e experimental (mg.L ⁻¹)	R ²	C _e teórica (mg.L ⁻¹)	C _e experimental (mg.L ⁻¹)
1/A	0,6241	5,50	6,20	0,3389	4,1	6,20
1/B	0,9573	10,50	11,50	0,7762	14,1	11,50
1/C	0,9918	28,30	25,10	0,2800	83,3	25,10
1/D	0,8962	160,4	210,50	0,9096	238,1	210,50
2/A	0,4859	2,80	4,40	0,7026	3,9	4,40
2/B	0,8774	12,60	12,00	0,1558	51,5	12,00
2/C	0,9908	37,40	23,40	0,2286	144,9	23,40
2/D	0,9594	174,3	187,90	0,7143	344,8	187,90

Fonte: O autor, 2015.

Esses resultados podem ser confirmados pelos valores dos coeficientes de correlação das retas de ajuste antes do equilíbrio, observado a partir dos dados experimentais (Figuras 12 e 13). Tais valores ajustaram os dados experimentais com maior precisão que o modelo de segunda ordem para todas as composições de tinta estudadas.

Uma abordagem distinta da mesma questão seria em função da similaridade entre os valores teóricos e os valores observados experimentalmente para as concentrações de equilíbrio de remoção de ferro não reativo. As menores diferenças percentuais entre os valores preditos foram, na sua grande maioria, obtidas quando do emprego do modelo de pseudo-primeira ordem, indicando assim, a adequada representação do processo por esse modelo.

Esses resultados complementaram estudos anteriores, onde a cinética de remoção de ferro não reativo, bem como considerações acerca da estequiometria da reação não foram consideradas, trazendo valiosas informações acerca da estabilização do processo de deterioração do papel em função da ação química da tinta ferrogálica, contribuindo para a estabilidade da tinta e conseqüente conservação de grande parte do patrimônio cultural de papel (da Costa *et al.*, 2013; da Costa *et al.*, 2014).

Conclusões

Banhos sucessivos com solução de fitato para a remoção de ferro não reativo, em um mesmo documento, não são necessários, uma vez que os resultados demonstraram a eficácia do primeiro tratamento (primeira lavagem com fitato de cálcio), confirmada pela pequena remoção de ferro obtida após envelhecimento acelerado seguido de um segundo tratamento.

Soluções diluídas de fitato de cálcio são tão eficientes na remoção do ferro quanto soluções mais concentradas, o que contribui para um tratamento mais brando de documentos contendo tintas ferrogálicas com menores danos estruturais a papéis e documentos.

A espectroscopia de absorção atômica mostrou ser uma ferramenta útil para a investigação da dessorção do ferro não reativo, de diferentes tintas ferrogálicas, preparadas com distintos taninos.

A cinética de remoção do ferro de fitas impregnadas com tintas ferrogálicas foi rápida, em torno de 15 minutos, para ambas as soluções de fitato e para distintas combinações de ferro e ácido tânico.

O modelo cinético de pseudo-primeira ordem ajustou os dados experimentais com maior precisão que o modelo de segunda ordem, confirmando uma cinética rápida, o que permite a introdução de banhos simultâneos numa ampla gama de documentos.

Os ensaios trazem um novo conhecimento para a área de conservação preventiva do patrimônio cultural, agregando aspectos da modelagem cinética, que permitem fazer estimativas de tempo para estabilização da remoção de ferro em documentos em processo de deterioração química.

4 PAPÉIS ÁCIDOS E ALCALINOS IMPREGNADOS COM TINTAS FERROGÁLICAS – ESTUDOS DE ESTEQUIOMETRIA, ESTABILIZAÇÃO DA OXIDAÇÃO DO FERRO, MICROSCOPIA E SUSCEPTIBILIDADE FÚNGICA

4.1 Revisão bibliográfica

4.1.1 Degradação do papel

Desde o século XV até as primeiras décadas do século XIX, as tintas ferrogálicas foram utilizadas em larga escala pela civilização ocidental, sendo considerada uma das tintas mais importantes da história. (Reháková *et al.*, 2015; Arcon *et al.*, 2007). Apesar de a tinta ferrogálica ser formada basicamente por quatro ingredientes, ela possui uma enorme variedade de formulações ao longo da história. Além disso, como pode ser formada por diversos constituintes naturais, há uma grande quantidade de impurezas nas tintas ferrogálicas históricas. Esse cenário pode dar origem a distintos mecanismos de degradação que levam a corrosão, escurecimento e perda de propriedades mecânicas do papel em um processo conhecido como corrosão por tinta ferrogálica (Hahn *et al.*, 2004). Segundo Gambaro *et al.* (2009) o processo de envelhecimento das tintas é uma das mais importantes causas de corrosão em suportes de papel, sendo que esse mecanismo depende dos componentes da tinta e da interação com o papel. Infelizmente, a perda de propriedades mecânicas de manuscritos degradados, que é um processo irreversível, torna a manipulação do papel cada vez mais difícil (Poggi *et al.*, 2016).

Existem diversos fatores internos e externos que podem contribuir para a degradação do papel. Em relação aos fatores internos, o que mais pode impactar na durabilidade e no tempo de vida do manuscrito são a pureza dos componentes e a qualidade do tipo de celulose utilizada na manufatura do papel. Com a utilização cada vez mais frequente da polpa de madeira no século XIX em substituição às outras fontes de fibras de celulose, houve a redução da qualidade do papel devido aos processos físicos e químicos sofridos durante o processamento. Os processos de oxidação podem ser acelerados por conta do meio ácido utilizado e a presença de metais de transição (principalmente ferro, cobre e manganês) durante o processamento. Essa conjuntura leva ao comprometimento da durabilidade do papel, porque esses metais reagem com os grupos químicos da celulose.

Os fatores externos são derivados da poluição do ar, condições climáticas desfavoráveis, agentes biológicos e/ou condições de iluminação e estocagem (Ion *et al.*, 2008; Hajji *et al.*, 2015). Considerando que os dois principais caminhos para a degradação da celulose são a hidrólise ácida e a oxidação através das reações de Fenton, um tratamento para estabilizar o processo corrosivo da tinta ferrogálica requer a adição de álcalis para combater a hidrólise ácida do papel e antioxidantes para inibir a oxidação (Malesic *et al.*, 2005). Com relação aos antioxidantes, muitas possibilidades têm sido investigadas, mas o tratamento com fitato de cálcio permanece sendo o mais utilizado (Rouchon *et al.*, 2011b).

Pesquisadores e instituições estão denotando grande atenção à análise de manuscritos a fim de fomentar ações nos campos da recuperação de textos perdidos, análise de imagens das características visuais dos manuscritos, análise dos materiais de escrita, etc. Particularmente, métodos não-invasivos, não-destrutivos ou micro-destrutivos de análise de superfície foram especialmente desenvolvidos para alcançar informações em papéis antigos de importância histórica e arqueológica. (Adami *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2001; Faubel *et al.*, 2007; Alfeld & Broekaert, 2013).

A caracterização dos componentes do papel é de grande relevância para a identificação de documentos históricos, e as técnicas analíticas podem ser utilizadas para identificar aditivos, enchimentos e tintas presentes. Desta forma, as observações feitas por MEV evidenciam a morfologia típica do papel, destacando os efeitos da matriz de celulose e o perfil de impregnação da tinta entre as fibras (Castro *et al.* 2008a; Castro *et al.* 2008b; Princi *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2001). Dependendo da forma como a tinta interage com as fibras de celulose, a distribuição espacial desempenha um papel adicional na preservação/degradação de documentos antigos.

Remazeilles *et al.* (2005) analisaram um grupo de manuscritos originais e observaram uma importante correlação entre as condições do papel e a topografia da tinta: papéis em melhor estado de conservação apresentaram uma espessa camada de tinta na sua superfície, enquanto que os manuscritos mais danificados não a exibiram; mas alguns elementos típicos das tintas (ferro, enxofre, potássio e cálcio) estavam presentes no interior das folhas de papel. Sabe-se pouco sobre a causa dessa diferença na distribuição da tinta sobre as fibras do papel, que pode ocorrer tanto no momento da escrita quanto depois, dependendo da viscosidade da tinta, da permeabilidade do papel e das condições de estocagem durante o armazenamento (Rouchon *et al.*, 2009; Rouchon *et al.*, 2013).

Antigamente, o principal meio de conferir impermeabilidade aos papéis produzidos em massa envolvia resina e alúmen, o último do qual é altamente ácido. A partir dos anos

1980 houve uma mudança dramática a respeito dos novos produtos químicos de encolagem, que empregam um sistema de tamponamento alcalino. Como benefício colateral dessa mudança, a maioria dos papéis para impressão, escrita e desenho tende a ser mais brilhante e mais resistente à fragilização durante o armazenamento (Hubbe, 2005).

4.1.2 Encolagem

O papel foi a mais importante base de armazenamento de informações históricas e culturais da humanidade durante séculos. No início, as fibras de celulose que compunham o papel eram oriundas do cânhamo e trapos de linho. O processo de encolagem era realizado com cola de origem animal. Durante a manufatura do papel, estas fibras de celulose utilizadas acumulavam com facilidade os metais presentes na água de processamento originária das máquinas, gerando um papel com maior dificuldade de fixação pela tinta. Para obter um papel mais adequado para a escrita, a partir do século XIX começaram a ser incluídos aditivos como gelatina e alúmen ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), não somente para aumentar a resistência e qualidade do papel, mas também para protegê-lo de ataques de micro-organismos (Kolar & Strlic, 2006; Manso *et al.*, 2011). No final do século XIX, com o aumento da demanda por papel e a escassez das fibras de celulose derivadas de linho e algodão, a madeira tornou-se a principal fonte desse composto. Consequentemente, a celulose, hemicelulose e lignina (originárias da polpa da madeira) tornaram-se os principais constituintes do papel. Aos poucos, a gelatina começou a ser substituída por outros tipos de resina, sempre aplicada na companhia do alúmen. Mais recentemente, esse aditivo também foi adicionado com outros produtos sintéticos, como a carboximetilcelulose (CMC) (Manso *et al.*, 2011; Kolar & Strlic, 2006). Assim, fica evidente que a evolução na manufatura do papel através dos séculos levou a modificação da sua estrutura, tanto com relação à origem das fibras de celulose como dos aditivos adicionados.

Os papéis necessitam ser resistentes à penetração de líquidos, particularmente água, favorecendo assim a distribuição da tinta na superfície do papel. Nesse contexto, o processo de encolagem tem papel chave, pois afetará diretamente o mecanismo de absorção de água e tintas pelas fibras do papel. A encolagem do papel pode ser interna ou externa. No primeiro caso o encolante é incorporado na pasta de fabricação do papel. No segundo, encolagem superficial, a encolagem é efetuada após a folha de papel ser preparada. Em papéis mais antigos era comum o uso de gelatina ou amido proveniente de trigo, arroz ou milho, ou então goma arábica, de origem vegetal. Atualmente, pratica-se a encolagem interna, a qual pode ser

ácida (alúmen-breu) ou alcalina (cola sintética), sendo neste último caso aplicada quando há carga de carbonato de cálcio (Spinelli Jr., 1997).

Neste trabalho serão utilizados oito diferentes tipos de papéis, dos quais, além de verificar seus tipos de encolagem, também será analisado o perfil de impregnação da tinta ferrogálica nas fibras dos papéis através da quantificação da concentração de ferro em excesso, por espectroscopia de absorção atômica, e da distribuição da tinta na superfície do papel, empregando também a técnica não destrutiva de microscopia eletrônica de varredura.

4.2 Metodologia

4.2.1 Confecção das tintas ferrogálicas

Para o preparo das tintas ferrogálicas foram utilizados sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Brasil), ácido tânico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$) (Vetec, Brasil), goma arábica (Vetec, Brasil) e etanol (Vetec, Brasil). As quantidades utilizadas destes reagentes estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Composição química das tintas ferrogálicas confeccionadas.

Tinta	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	Ácido tânico (g)	Goma arábica (g)	Etanol (mL)
1	1,0	5,5	2,0	5,0
2	10,0	5,5	4,0	5,0

Nota: Quantidades totais para 50 mL.

Fonte: O autor, 2015.

A tinta 1 foi formulada com as quantidades estequiométricas de ferro e ácido tânico, sendo considerada a tinta de referência. A tinta 2 possui dez vezes a quantidade estequiométrica de ferro e foi preparada para simular as tintas com excesso de ferro na sua composição e que são as principais responsáveis pela degradação de suportes celulósicos pela ação do ferro livre oxidado. As tintas ferrogálicas foram preparadas a pressão e temperatura ambientes e expostas ao ar atmosférico por 24 horas, a fim de ajudar no fortalecimento da cor após a formação do complexo galotânico e na fixação dos componentes nas tiras de papel. Após esta etapa, as tintas foram mantidas em frascos âmbar selados protegidos da luz, a temperatura ambiente.

4.2.2 Papéis

Amostras de oito diferentes papéis foram codificadas com as letras A, B, C, D, E, F, G e H e uma breve descrição das suas características, com suas respectivas imagens, estão representadas na Tabela 11.

Esses papéis foram fornecidos pelo Museu de Astronomia e Ciências Afins, Rio de Janeiro, Brasil, e utilizados para a avaliação de algumas características, tal como presença de lignina e tipo de encolagem através de *spot tests* e, principalmente, para avaliar os perfis de impregnação das tintas¹ e ² e a eficiência do tratamento com a solução de fitato de cálcio. Também foram utilizados para a investigação de um possível crescimento microbiano relacionado ao tipo de encolagem e/ou corrosão química da tinta ferrogálica impregnada.

4.2.2.1 *Spot tests* nos papéis

Para a realização dos *spot tests*, as amostras de papel foram cortadas em um tamanho padrão de 2x7 cm, sendo que uma das extremidades desta tira de papel foi imersa em solução de floroglucinol, para o teste de detecção de lignina, e o outro imerso em solução de lugol (iodo + iodeto de potássio), para o teste de detecção de amido.

Detecção de lignina

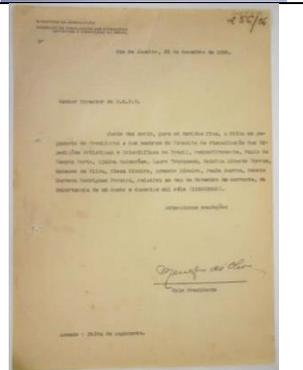
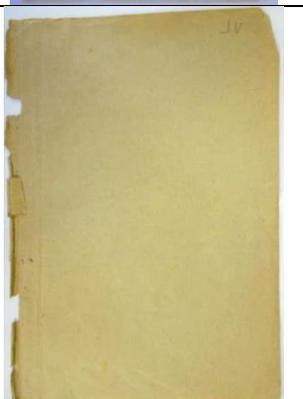
Para os testes de detecção da lignina nas amostras foi utilizada a metodologia de Johansen (1940) onde 0,1 g de floroglucinol foi dissolvido em 5mL de metanol, 5 mL de ácido clorídrico concentrado e 5 mL de água destilada. Essa solução ficou protegida da luz e armazenada em geladeira até o momento da aplicação nos papéis. O resultado positivo para a lignina é confirmado pela coloração avermelhada na amostra.

Detecção de amido

Os testes para a detecção do amido nas amostras foram realizados segundo a metodologia proposta por Schramm & Hering (1988). Desta forma, foi preparada uma solução com 0,17 g de iodeto de potássio e 0,25 g de iodo em 10 mL de água destilada.

O resultado positivo para o amido ocorre se a amostra de papel apresentar coloração azul escuro após a imersão nesta solução.

Tabela 11 - Especificações dos papéis e sua respectiva imagem (continua).

PAPEL	ESPECIFICAÇÕES	IMAGEM
A	<p>Pouco espesso, com menos carga e mais transparente.</p> <p>Aparentemente tem fibras de madeira.</p> <p>Documento datado de 1940 que pertencia ao Ministério da Fazenda do Brasil.</p> <p>Possui marca d'água.</p> <p>Contém grafia com tinta ferrogálica.</p>	
B	<p>Papel Bond.</p> <p>Aparentemente tem fibras de madeira.</p> <p>Com resina, óleo ou cera e sem carga.</p> <p>Documento datado de 1936 pertencia ao Ministério da Agricultura do Brasil.</p> <p>Possui marca d'água (America Bond).</p> <p>Contém grafia com tinta ferrogálica.</p>	
C	<p>Papel Bond para escrita e impressão.</p> <p>Aparentemente tem fibras de madeira com remoção parcial da lignina.</p> <p>Documento datado de 1949 pertencia ao Ministério da Agricultura do Brasil.</p>	
D	<p>Papel cartão (ácido), sem tratamento.</p> <p>Parece ter fibras de madeira e encolagem mais espessa.</p> <p>É uma capa de documento pertencente ao Ministério do Trabalho, Indústria e Comércio do Brasil.</p> <p>Sem datação.</p> <p>Aspecto amarelado.</p>	

Especificações dos papéis e sua respectiva imagem (conclusão).

PAPEL	ESPECIFICAÇÕES	IMAGEM
E	<p>Papel jornal (ácido), mais bruto, sem tratamento com fibras de madeira. Sem datação e aspecto amarelado.</p>	
F	<p>Papel tratado, com remoção de lignina, carga alcalina e fibras de madeira. Resina sintética. Sem datação.</p>	
G	<p>Papel Arches France (chanfrado). Parece ser composto por fibras de algodão com encolagem de gelatina. Sem datação.</p>	
H	<p>Papel Montval (chanfrado), neutro. Parece ter fibras de madeira com encolagem de gelatina. Sem datação.</p>	

Fonte: O autor, 2016.

4.2.2.2 Impregnação das tintas nas tiras de papel

Inicialmente, foram adicionados 20,0 mL de tinta num bécher de 50 mL e em seguida foram imersas, durante 5 minutos, as tiras dos oito diferentes tipos de papel, com dimensão de 6,0 x 0,5 cm, presas em um suporte. Esse processo de imersão foi realizado verticalmente até que a tinta impregnada no papel atingisse a altura de 2,0 cm, resultando numa área total de impregnação de 1,0 cm² em cada face para todas as amostras. Após este procedimento, as tiras foram secas à temperatura e ventilação ambientes por 24 horas e depois submetidas a diferentes processos:

- Digestão química, a fim de quantificar a concentração total de ferro nas amostras, utilizando espectroscopia de absorção atômica;
- Lavagem com fitato de cálcio, a fim de remover o excesso de ferro da superfície do suporte, seguido por digestão química;
- Lavagem com fitato de cálcio, envelhecimento artificial acelerado e segunda lavagem com fitato de cálcio, a fim de verificar a necessidade da aplicação de um segundo tratamento após um longo período de tempo, seguido de digestão química;
- Análise da estrutura superficial por MEV;
- Plaqueamento, a fim de avaliar a realação do tipo de papel com um possível crescimento microbiano na superfície do mesmo.

Todos esses procedimentos foram aplicados nas tiras de papel contendo tanto a tinta 1 quanto a tinta 2.

4.2.2.3 Tratamento com fitato de cálcio e digestão química

Uma forma de evitar a acidificação e/ou oxidação do papel pela tinta ferrogálica, pode ser realizada com um tratamento específico no suporte (Poggiet *al.*, 2016) ou removendo o excesso de tinta, por exemplo, fazendo a lavagem do documento com solução de fitato de cálcio - uma alternativa para evitar a oxidação da tinta ferrogálica nos papéis.

Para a remoção do ferro em excesso das tiras de papel impregnadas com as tintas 1 e 2, foi realizado um tratamento com solução de fitato de cálcio utilizando 0,8 mL de uma solução aquosa de ácido fítico 50% m/m (Aldrich) e 0,22 g de carbonato de cálcio P.A. (VETEC), de acordo com a metodologia proposta por da Costa *et al.* (2016).

Dessa forma, foi realizada a digestão química das tiras de papel a fim de quantificar o ferro total em cada tira empregada, nas seguintes condições:

- a) Tiras de papel impregnadas com tinta 1 e 2, separadamente, sem lavagem com fitato de cálcio.
- b) Tiras de papel impregnadas com tinta 1 e 2, separadamente, com lavagem com fitato de cálcio.
- c) Tiras de papel impregnadas com tinta 1 e 2, separadamente, com lavagem com fitato de cálcio, envelhecimento artificial acelerado e segunda lavagem com fitato de cálcio.

Primeiramente, o carbonato de cálcio foi adicionado vagarosamente e em pequenas quantidades ao ácido fítico num bécher e agitou-se esta mistura com bastão de vidro até a formação de uma pasta marrom homogênea, livre de partículas sólidas. Esta pasta foi dissolvida em aproximadamente 100 mL de água destilada e o volume final foi ajustado em balão volumétrico de 1,0 L. Sob agitação constante, o pH foi ajustado para valores entre 5,5-6,0 pela adição de gotas de hidróxido de amônio.

Para ambos os grupos de amostras submetidas à lavagem com a solução de fitato de cálcio (b e c), foram adicionados 5,0 mL da solução de fitato em tubos de vidro e as tiras de papel foram inseridas de maneira que a área preenchida pela tinta ficasse completamente imersa no líquido, por um período de 30 minutos; este é o tempo de imersão máximo geralmente aplicado neste tipo de tratamento (da Costa *et al.*, 2016; Sequeira *et al.*, 2006).

No primeiro grupo (b), as tiras de papel impregnadas com as tintas foram lavadas com a solução de fitato, secas por 24h a temperatura ambiente e submetidas ao processo de digestão ácida. No segundo grupo (c), as tiras de papel impregnadas com as tintas foram lavadas com a solução de fitato, envelhecidas artificialmente a uma temperatura de 100°C durante cinco dias, em tubos de vidro, de acordo com o procedimento adotado pela ASTM (Da Costa *et al.*, 2013) e, após esse processo, foram novamente lavadas com a solução de fitato durante 15 minutos e submetidas ao processo de digestão química. A digestão das tiras de papel foi realizada por uma solução ácida a partir da mistura de 6mL de ácido nítrico P.A. com 2 mL de peróxido de hidrogênio P.A., seguido pela adição de 4 mL de ácido sulfúrico P.A. em banho-maria até a digestão completa das tiras.

4.2.3 Espectroscopia de absorção atômica

Todas as medições foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica de fonte contínua de alta resolução, ContrAA 300 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha), equipado com chama ar/acetileno, responsável pela atomização do metal de interesse. Como combustível para a chama, utilizou-se acetileno de elevada pureza (Linde Gases, Rio de Janeiro, Brasil) e a taxa de fluxo da mistura de gases foi de 85 L/h.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O preparo de todas as soluções padrão foi realizado a partir de uma solução estoque de ferro de 1,0 mg/L (Merck, Darmstadt, Alemanha), e as mesmas foram avolumadas em água ultrapura com resistividade não inferior a 18,2 M Ω .cm obtida a partir de um sistema de purificação de água Master System All (Gehaka, São Paulo, Brasil).

Para a leitura, a taxa de aspiração foi fixada em 10 mL/min, e todas as medições foram realizadas em triplicata. De modo a obter sinais analíticos adequados, o tempo de medição foi fixado em 3 s. A curva de calibração foi feita na mesma matriz ácida para minimizar interferências. Todas as amostras foram previamente testadas e seus sinais de absorbâncias contrastados com o sinal referente ao padrão de 4,0 mg/L. Caso o sinal oriundo da amostra fosse maior que o do último padrão da curva, a mesma era diluída para que pudesse se adequar à curva de calibração.

4.2.4 Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura

As amostras impregnadas com as tintas 1 e 2, separadamente, sem quaisquer tratamentos prévios, foram utilizadas para a análise da morfologia da tinta agregada sobre a superfície das tiras de papel observada por MEV (FEI-Inspect S50, Republica Tcheca).

Várias imagens foram obtidas para cada amostra em áreas distribuídas. Zonas representativas para cada amostra morfologicamente homogêneas. As amostras foram preparadas por revestimento com ouro em equipamento de pulverização catódica (Emitech K550X) durante 3 min a 20 mA. As imagens foram observadas sob o modo de alto vácuo com uma tensão de 15kV e aumento de 400x para a caracterização completa.

4.2.5 Investigação microbiológica

A fim de avaliar a relação do tipo de papel com o crescimento de micro-organismos no mesmo, foi preparado um meio de cultura cuja única fonte de carbono é a amostra de papel. A composição do meio de cultura é apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 - Solução para o preparo do meio de cultura sem fonte de carbono.

Nutrientes	Quantidade* (g)
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
NaNO ₃	3,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
K ₂ HPO ₄	1,0
Agar	15,0

Nota: Quantidade total para 1000 mL.

Fonte: O autor, 2016.

Foram preparados, à temperatura ambiente, 500 mL de meio de cultura; e o pH foi medido com o auxílio de um medidor de pH digital (Phtek, PHS-3B, Japão), ajustando-o para 5,0, empregando-se solução de HCl 1 mol/L. Após esta etapa, transferiu-se a solução para um frasco Erlenmeyer de 1000 mL, o qual foi vedado com rolha de algodão e esterilizado em autoclave vertical (Phoenix, AV 75, Brasil) nas condições de 1 atm de pressão e 120°C de temperatura durante 20 minutos. Após a completa esterilização do meio, este foi adicionado ainda quente (em câmara de fluxo laminar) em placas de Petri devidamente rotuladas. Antes da gelificação completa do meio de cultura, uma tira de papel foi inserida em cada placa, de acordo com as respectivas rotulagens (sem tinta, com tinta 1, com tinta 2/ papéis A, B, C, D, E, F, G, H). As placas foram então expostas ao ar atmosférico durante um período de duas horas e, em seguida, foram mantidas em câmara climatizada para germinação (Fanem, 347-CDG, Brasil); com temperatura ajustada para 26°C durante doze dias.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Tintas ferrogálicas

Após o preparo das tintas 1 e 2, a tinta 1 apresentou uma consistência mais fluida que a tinta 2. Isso é explicado pela maior quantidade de goma arábica, um ligante utilizado na produção da tinta (Bicchieri & Pinzari, 2016), tornando-a mais consistente. A goma arábica era utilizada no preparo da tinta ferrogálica para torná-la mais densa com o intuito de evitar borrões de tinta nas folhas do papel. O excesso de sulfato ferroso na tinta 2 também contribuiu para o aumento da viscosidade.

Após o período de exposição ao ar ambiente, ambas as tintas apresentaram coloração mais escura que a inicial, com uma tonalidade marrom escura.

4.3.2 Papéis

Grande parte das oito amostras de papel utilizadas neste trabalho é constituída de fibras de madeira, exceto a amostra G, de fibra de algodão. Algumas delas contêm lignina, que diminui a qualidade do papel, causando amarelecimento e acelerando a degradação das fibras (Zhang *et al.*, 2016). O papel C, por exemplo, parece ter sido fabricado com remoção parcial da lignina apenas. As amostras F, G e H contêm reserva alcalina e os demais papéis são ácidos. Os papéis também se diferenciaram pela sua espessura. Embora ela não tenha sido medida, foi possível perceber pelo tato. Este fator também interfere nos perfis de impregnação da tinta. De acordo com Kolar *et al.* (2006), é esperado que a gramatura do papel, expressa em g/m^2 , influencie na taxa de corrosão de tinta em documentos históricos, uma vez que o tempo para os componentes corrosivos da tinta migrarem através de papéis mais espessos é maior do que em papéis mais finos.

4.3.2.1 *Spot tests* nos papéis

Os resultados dos *spot tests* estão representados na Figura 14, onde é possível observar que o teste positivo para a lignina foi confirmado apenas para as amostras D e E. A presença da lignina é um fator que pode causar amarelecimento do papel e acelerar a degradação da celulose. As imagens dos papéis D e E na Tabela 11 reafirmam o amarelecimento causado

pela presença da lignina. Esses papéis, por conterem lignina e não terem sofrido tratamento, em geral conseguem absorver melhor a tinta, pois suas superfícies encontram-se mais desprotegidas e permeáveis, permitindo assim uma penetração mais profunda da tinta no interior das fibras. Essa característica, no entanto, não pode ser considerada positiva quando se deseja uma boa qualidade da escrita, pois, segundo Guo *et al.*(2014), uma vez que a tinta pode facilmente penetrar as fibras de papel, este, depois de seco, pode ficar borrado. Assim, é importante que o papel seja semipermeável, para evitar que a tinta o manche. Desta forma, a máxima remoção da lignina e o tratamento de encolagem do papel devem ser realizados durante o processo de fabricação do papel, com a finalidade de permitir que as tintas e pinturas permaneçam precisamente sobre a superfície das folhas de papel, em vez de ser absorvido para dentro dele.

Figura 14 - Spot test das amostras de papéis.



Legenda: À esquerda de cada amostra, teste de detecção da lignina. À direita de cada amostra, teste de detecção do amido.

Fonte: O autor, 2016.

Com relação à detecção de amido utilizado como encolagem, os resultados foram evidentes em todos os papéis, com exceção da amostra E. A tonalidade azul, diferenciada para as amostras mencionadas, indica a presença de amido como agente de encolagem em distintas proporções. A Figura 14 indica que os papéis A e C parecem ter uma pequena quantidade de amido em comparação com os demais, onde a coloração azul foi bem mais intensa. Cabe ressaltar que os testes para detecção de gelatina não foram conclusivos, uma vez que a presença de amido marcadamente interfere na detecção deste composto. Ersoy *et al.* (2014) afirmaram em seu trabalho que documentos históricos e obras de arte feitos de papel podem ter vários tipos de contaminantes de superfície, incluindo colas degradadas, manchas de tinta, partículas em suspensão e agentes biológicos. Por estas razões, as chances de interferências no teste de encolagem de superfície em documentos antigos não devem ser descartadas.

4.3.2.2 Impregnação das tintas nas tiras de papel

Todos os papéis tiveram boa impregnação, tanto da tinta 1 quanto da tinta 2. Entretanto foi observado que a tinta 1, por ser mais fluida, expandiu-se por capilaridade das fibras de celulose para além dos limites da aplicação da tinta, em intensidades diferentes, dependendo da amostra, podendo afirmar assim que o tipo de tratamento e encolagem do papel interferem diretamente nessa capilaridade. Além disso, foi possível observar que o filme de tinta formado sobre os suportes foi mais fino utilizando a tinta 1 e mais espesso ao utilizar a tinta 2, justamente pelo emprego de uma maior quantidade de reagentes sólidos para a mesma quantidade do reagente líquido utilizado para a produção da tinta 1.

4.3.2.3 Tratamento com fitato de cálcio e digestão química

Como resultado da lavagem das tiras de papel impregnadas com as tintas 1 e 2, para ambos os grupos de amostras, após o período de 30 minutos de imersão das tiras de papel foi possível observar no interior dos tubos uma diferença de tonalidade da solução de fitato de cálcio. Isso se deve ao fato de que, mesmo sem agitação, ocorreu, além de uma reação química entre o fitato e o ferro em excesso contido na amostra, também uma interação física entre a solução aquosa e o excesso de tinta na superfície dos papéis.

O grupo que foi submetido a um posterior envelhecimento artificial e uma segunda lavagem com fitato de cálcio provocou uma mudança de cor mais suave da solução, pois grande parte da remoção física ocorreu na primeira lavagem.

As soluções de fitato de cálcio utilizadas não foram quantificadas, sendo descartadas imediatamente ao término desta etapa.

Sequeira *et al.* (2006) obtiveram resultados quanto à inibição da despolimerização da celulose utilizando tratamento aquoso e não aquoso e observaram que o tratamento aquoso conduz à formação irreversível de vários produtos diferentes, derivados da degradação da tinta ferrogálica que, através do consumo de íons H^+ e Fe^{2+} , evitam a acumulação dos catalisadores de hidrólise e de oxidação, reduzindo assim a despolimerização. Com isso eles concluíram que em longo prazo o tratamento aquoso, devido a uma maior mobilidade iônica, será aquele que evita melhor a degradação da celulose, mesmo causando a mudança da sua cor original dramaticamente.

Após o processo de lavagem alcalina, as tiras de papel impregnadas com as tintas ferrogálicas 1 e 2 sem tratamento com fitato de cálcio e sem envelhecimento acelerado, e dos dois grupos (com uma única lavagem e com duas lavagens), foram degradadas pela solução ácida. Nesta etapa foi possível observar uma coloração límpida e transparente, indicando não haver quaisquer partículas no interior da solução digestora. Desta forma, as amostras líquidas puderam ser quantificadas por espectroscopia de absorção atômica.

4.3.3 Espectroscopia de absorção atômica

Os resultados da digestão química das tiras de papel, para quantificação do ferro contido em cada condição experimental estão apresentados na Tabela 13. As tiras de papel impregnadas com tinta que não tiveram tratamento com fitato de cálcio apresentaram maior concentração de ferro na solução digestora, quando comparado aos outros dois grupos que receberam tratamento, principalmente aqueles que continham a tinta 2. Esses grupos apresentaram valores similares entre si, e inferiores ao primeiro. Isto é um indicativo de que uma única lavagem com fitato de cálcio seria suficiente para evitar o comprometimento do documento pela oxidação do ferro em excesso. Isso está de acordo com o estudo realizado por da Costa *et al.* (2016) em que foi concluído não haver necessidade de uma segunda lavagem após o envelhecimento de um documento com tinta ferrogálica que tenha sido inicialmente

tratado com fitato de cálcio. Desta forma, um tratamento com fitato estabiliza a tinta quanto a quantidade de ferro extraída.

Tabela 13 - Resultado da concentração de ferro na solução digestora por espectrometria de absorção atômica, de acordo com as condições a, b e c descritas acima.

	TINTA 1(mg de Fe /L)			TINTA 2(mg de Fe/L)		
	a (MEV)	b	c	a (MEV)	b	c
A	3,0	1,6	1,3	35,4	2,9	3,1
B	2,5	1,2	1,2	40,8	3,8	2,5
C	1,7	1,2	1,3	40,3	3,1	2,2
D	4,1	4,0	3,3	41,1	4,7	6,8
E	4,3	0,7	1,5	38,1	4,1	3,5
F	3,3	2,8	2,9	38,2	8,6	7,1
G	2,5	1,9	2,9	82,1	3,9	4,5
H	3,0	1,1	3,3	87,1	4,6	3,5

Fonte: O autor, 2016.

Dos resultados da Tabela 13obtem-se informações interessantes sobre a incorporação das tintas nos papéis em função da concentração da tinta, bem como devido ao tipo de encolagem, confirmado nos *spot tests*.

Pode-se observar que as maiores concentrações de ferro nas fitas impregnadas com a tinta 1 (coluna a) foram equivalentes (papéis D e E; 4,1 e 4,3 mg/L respectivamente), justamente aqueles onde não houve tratamento prévio para remoção da lignina, confirmado pelo *spot test* da Figura 14. Os demais papéis (A, B, C, F, G, H) apresentaram teores inferiores de ferro após digestão química devido à presença de amido que permite a deposição da tinta, porém, sem absorção pelas fibras internas devido ao processo de encolagem.

Em continuidade (tinta 1, coluna b), após uma lavagem das fitas com solução de fitato, pode-se observar o decréscimo na concentração de ferro presente nas fitas devido à remoção parcial do ferro não-reativo. Com exceção do papel D, os demais papéis mostraram uma concentração inferior de ferro, corroborando que mesmo tintas estequiométricas não são homogeneamente absorvidas pelos papéis.

Após absorção, lavagem, envelhecimento e nova lavagem com fitato (tinta 1, coluna c), os teores de ferro não se alteraram significativamente, mostrando a dispensabilidade de dois procedimentos de lavagem após remoção de ferro não-reativo. Resultados análogos

foram encontrados para a tinta 2, considerando, no entanto, que o padrão de distribuição da tinta na superfície do papel não pode ser interpretado com a mesma explicação da tinta 1. Sendo a tinta 2 dez vezes mais concentrada em ferro e com o dobro de goma arábica que a tinta 1, o padrão de distribuição dessa tinta sobre o papel se baseia em uma absorção e espalhamento na área de contato com o papel e a formação de uma espessa camada superior devido às suas características de viscosidade e densidade. Esse padrão de distribuição forma uma espécie de casca sobre o papel. Dessa forma, o tratamento com o fitato removerá muito ferro não reativo excedente, além de remover gradativamente essa casca superior que não estará intimamente ligada à estrutura dos papéis.

Essas observações são confirmadas pelos resultados da Tabela 13 (tinta 2, coluna a) onde as concentrações de ferro são substancialmente superiores à tinta 1. No entanto, após a primeira lavagem com fitato, há uma redução de mais de 90% na concentração de ferro presente nas fitas de papel, confirmando a eficiência do tratamento com fitato na remoção do ferro não-reativo (tinta 2, coluna b). Em contrapartida, uma segunda lavagem com fitato, seguida de envelhecimento e nova lavagem, não indicou concentrações de ferro significativamente distintas daquelas da coluna 2/b, confirmando assim, que uma única etapa de lavagem é satisfatória.

Conclusões acerca do tipo de carga ou encolagem (gelatina, amido, lignina sem tratamento, etc.) não podem ser tiradas para a tinta 2, uma vez que o padrão de absorção das tintas pelos papéis foi muito comprometido devido às características viscosimétricas desses concentrados ferrogálicos.

Em papéis com presença da encolagem de gelatina, que possui muitos locais de coordenação de metal devido à presença de grupos ativos em sua estrutura, incluindo grupos amino ($-NH_2$) e grupos tiometil ($-SCH_3$); os íons Fe^{3+} são coordenados com macromoléculas de gelatina para formar complexos metal-polímero (Cheng *et al.*, 2014; Yonezawa *et al.*, 2008). Pelo fato desse complexo (ferro-gelatina) ficar na camada mais externa do papel, a lavagem com fitato de cálcio consegue remover facilmente esse metal.

O papel E teve uma redução expressiva na concentração de ferro, reafirmando o que foi observado nas imagens de MEV (Figura 16): um encharcamento dessa tinta sobre a superfície. É importante ressaltar que, independentemente da concentração de ferro na tinta, apenas a parte solúvel será capaz de migrar através do papel, bem como participar das reações de Fenton (Kolar *et al.*, 2006).

Kolar *et al.* (2012) ressaltaram em seu trabalho que a natureza não homogênea de documentos originais e tintas aplicadas podem levar a resultados de estabilização por fitato de

cálcio bastante diferentes para cada papel, embora com alta eficiência. Seus resultados demonstraram a estabilização bem-sucedida de dois documentos históricos com tinta ferrogálica usando este tratamento. Porém, enquanto a degradação de uma das amostras tratadas foi 10 vezes mais lenta do que no caso da amostra não estabilizada, o fator de estabilização (k , 'dia⁻¹') foi de quase 20 vezes no caso da segunda amostra.

O excesso de tinta depositada sobre o suporte leva a consequências mais graves com relação à oxidação do papel por conta da maior quantidade de ferro livre. Esse excesso, porém, pode ser fisicamente eliminado com o tempo de contato com a solução aquosa de fitato de cálcio, sendo uma camada espessa removida com mais facilidade por não precisar que essa remoção ocorra prioritariamente de forma química. O que claramente ocorre com a tinta 2. Por isso, a lavagem com fitato de cálcio tem bastante eficiência para diversos tipos de papéis impregnados com tinta ferrogálica com maiores concentrações de ferro.

4.3.4 Morfologia das tintas ferrogálicas agregadas em papéis por microscopia eletrônica de varredura

As observações por MEV permitiram estudar em grandes ampliações a morfologia e a adesão do filme formado pela tinta ferrogálica sobre cada amostra de papel. Pela Figura 16 é possível notar que os papéis A, B, C, F, G e H mesmo utilizando a tinta ferrogálica em proporções estequiométricas (tinta 1), apresentaram uma camada espessa de tinta por toda a área superficial do papel onde a mesma fora impregnada, indicando que, apesar das fibras terem absorvido parte desta tinta, as características intrínsecas e particulares de cada papel, por exemplo o tipo de encolagem, podem levar à formação de um filme na superfície, favorecendo os processos acelerados de degradação desses suportes caso não haja uma conservação preventiva. Com relação à tinta 2 a quantidade de sulfato ferroso adicionado na produção da tinta é dez vezes maior que a estequiométrica, além de ter o dobro da concentração de goma arábica, tornando-a mais viscosa que a tinta 1 e dificultando a penetração através das fibras. Desta forma, foi possível observar que o excesso de tinta na superfície do papel quando aplicada a tinta 2, fez com que houvesse a formação de subcamadas da mesma na superfície.

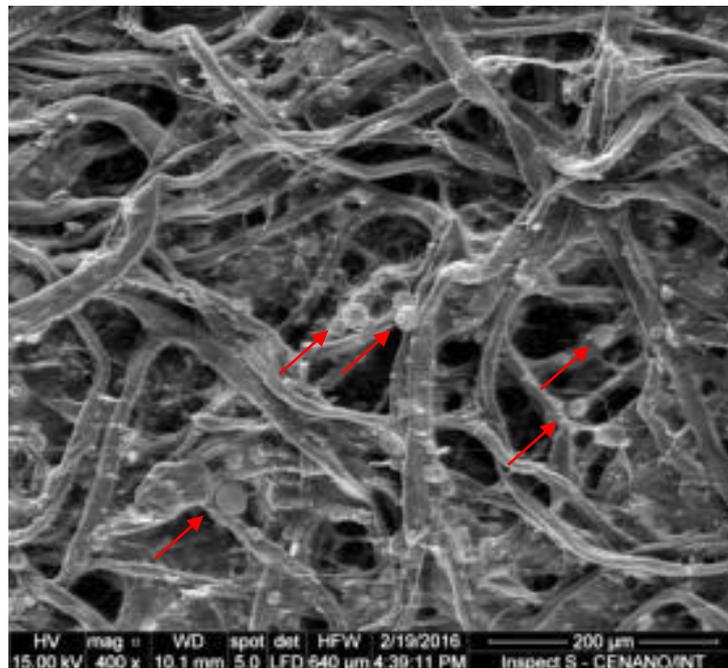
As imagens do papel D revelaram que ocorreu uma boa impregnação da tinta 1 nas fibras do papel, ou seja, a tinta estequiométrica. No entanto o mesmo não foi observado para a tinta 2, o que é compreensível tendo em vista o que já foi discutido anteriormente sobre as

concentrações dos ingredientes desta tinta. Desta forma é esperado que o papel D contendo tinta com esta composição sofra um processo de oxidação mais acelerado, caso não seja realizado um tratamento de conservação preventiva no documento.

Para o papel E foi possível observar uma boa impregnação da tinta 1 nas fibras do papel, embora ainda seja possível observar um encharcamento dessa tinta sobre a superfície. A tinta 2, no entanto, não foi bem absorvida pelas fibras e formou uma crosta na superfície da tira de papel.

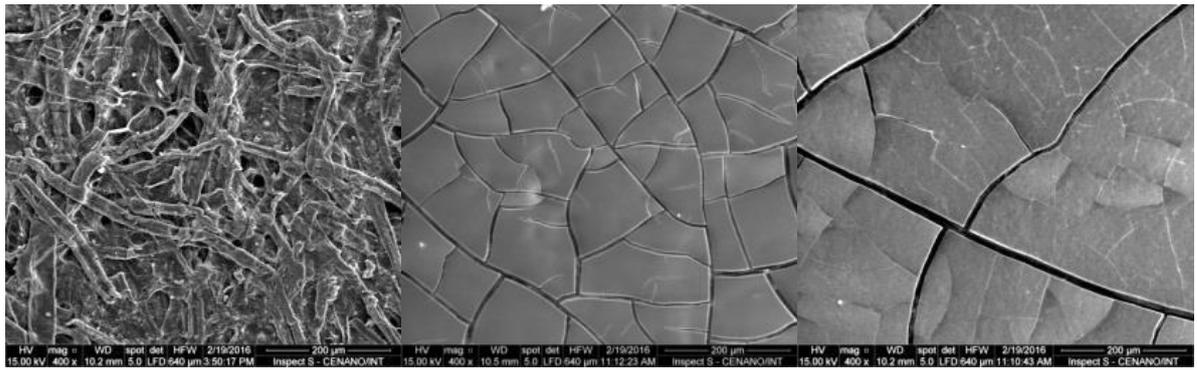
Com relação aos papéis G e H, o excesso de tinta na superfície do papel quando aplicada a tinta 1 foi menor comparado às amostras A, B, C e F. Este fato pode estar relacionado, novamente, ao tipo de encolagem desses dois papéis: a gelatina. A gelatina contribui para a proteção das fibras com relação à tinta, no entanto a tinta pode ter lavado essa camada superficial de gelatina, aumentando a permeabilidade. Além disso, segundo Callol (2013), apesar da gelatina ser um bom adesivo, ela favorece o ataque microbiano e o amarelecimento do papel. Corroborando com esta afirmação, particularmente no papel G, foi verificado nas imagens por MEV (amostra sem impregnação de tinta) micro-organismos que podem ter se manifestado devido à matéria-prima da encolagem (Figura 15).

Figura 15 - Amostra G sem impregnação de tinta: presença de micro-organismos.

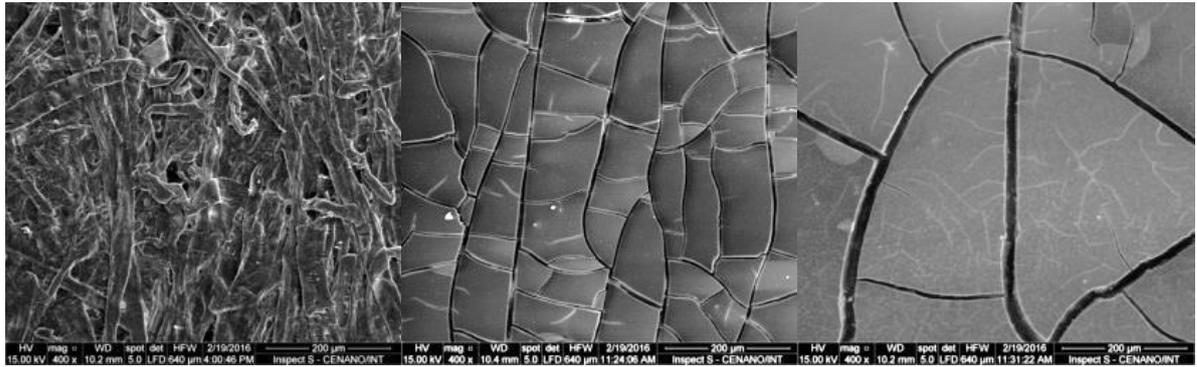


Fonte: O autor, 2016.

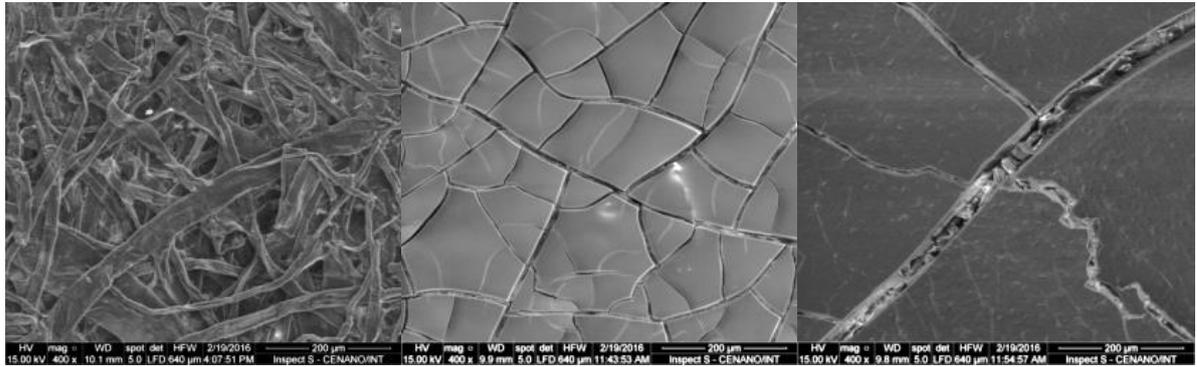
Figura 16 - Imagens das amostras de papéis em branco e impregnadas (continua).



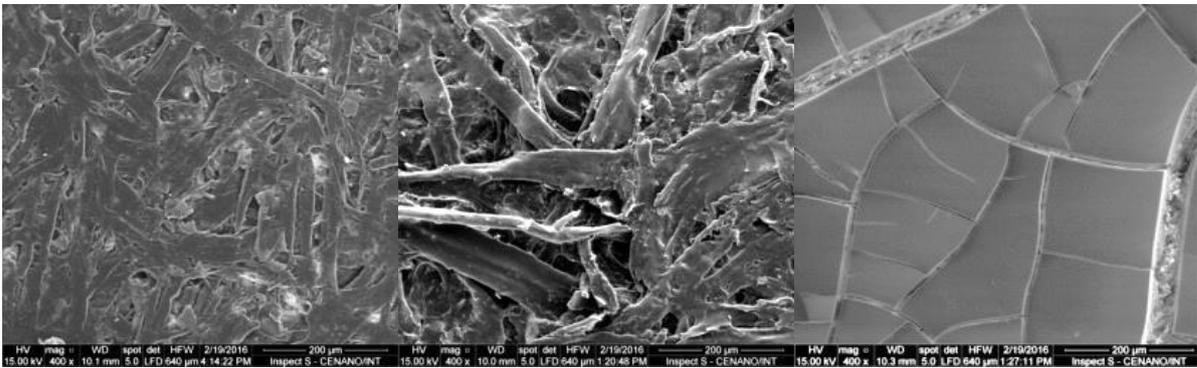
(A)



(B)

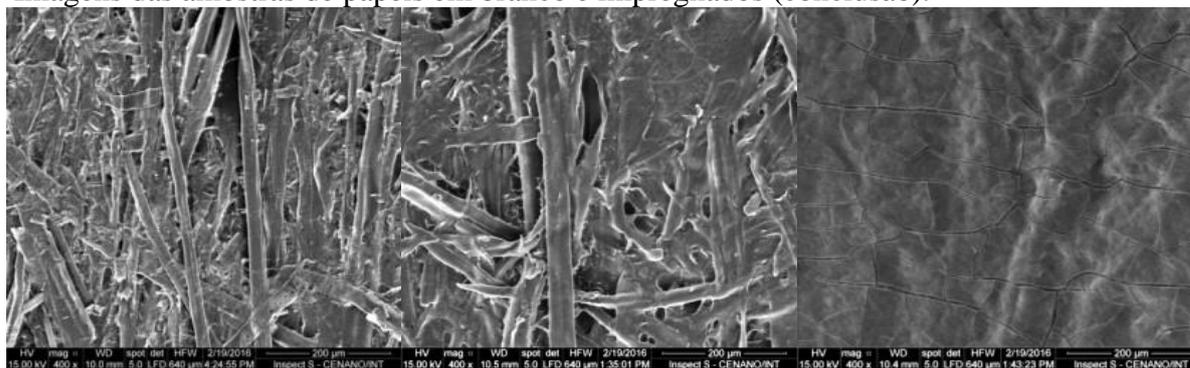


(C)

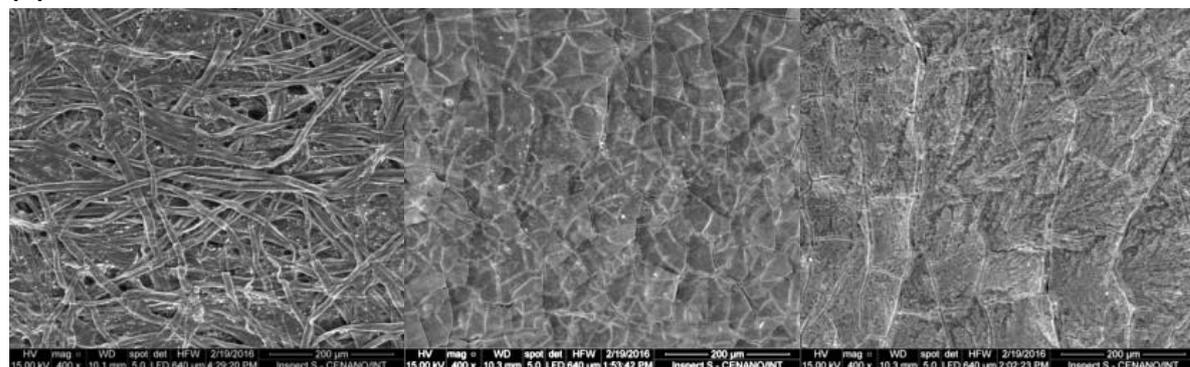


(D)

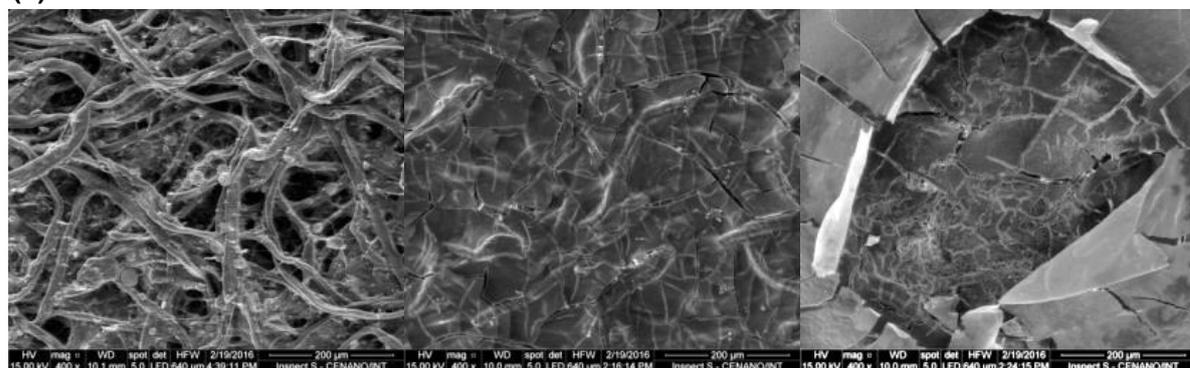
Imagens das amostras de papéis em branco e impregnados (conclusão).



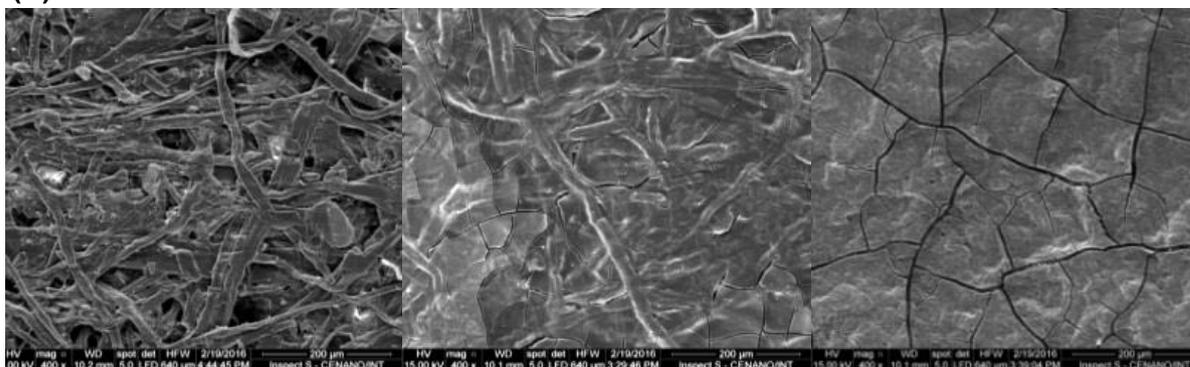
(E)



(F)



(G)



(H)

Legenda: De cima para baixo: amostras A, B, C, D, E, F, G, H. Da esquerda para a direita: sem tinta/com tinta 1/com tinta 2.

Fonte: O autor, 2016.

As observações das imagens por MEV dos oito diferentes tipos de papel impregnados com a tinta 1 mostraram que os papéis D e E foram os mais apropriados para a escrita com a tinta ferrogálica, uma vez que os outros, em graus diferentes, apresentaram uma quantidade maior de tinta depositada na superfície. Todos os oito tipos distintos de papel impregnados com a tinta 2 apresentaram excesso de tinta na superfície dos mesmos.

Essas observações corroboram com os resultados vistos nos *spot tests* e nos resultados de absorção atômica para as amostras D e E, confirmando que estes papéis são os mais adequados, dentre as demais amostras, para a utilização da tinta ferrogálica, devido a sua alta permeabilidade e a necessidade da tinta ferrogálica de se fixar nas fibras internas do papel para evitar, ou ao menos retardar, o processo de degradação da celulose de documentos importantes por oxidação ou por hidrólise ácida.

Os resultados desta pesquisa comprovam que muitos documentos originais antigos, escritos com tinta ferrogálica, sofrem com a degradação até os dias atuais tanto devido à concentração inadequada da tinta, quanto ao tipo de papel utilizado, que, em sua maioria, não eram apropriados para a utilização desta tinta. Com relação ao papel, as suas características e qualidade dependem da fonte de matéria-prima utilizada e do procedimento aplicado para a obtenção da fibra. Além disso, de acordo com Kolar *et al.* (2006), os fatores mais importantes que influenciam a degradação de documentos históricos são a largura da linha de tinta, a qual está correlacionada com a quantidade de tinta aplicada ao papel, o pH da área que contém a tinta e a gramatura do papel.

Gambaro *et al.* (2009), ao estudarem algumas tintas de documentos escritos originais datados do século XIX utilizando técnicas arqueométricas como Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectrômetro de Energia Dispersiva Acoplado e Pirólise Acoplada à Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa, observaram, em uma das suas amostras, que a tinta foi totalmente absorvida pelas fibras do papel. Eles atribuíram esse fato ao uso de solventes aquosos para fabricação da tinta. Em contrapartida, no mesmo estudo foi observado, em outra amostra, a distribuição de um filme descontínuo, craquelado e com partes descamando. Com base nessas observações os pesquisadores supuseram que, neste caso, a tinta foi apenas distribuída sobre o papel, sem penetrar nas suas fibras. Além disso, eles ressaltaram a importância desse fato na aceleração dos processos de envelhecimento do papel. Foi verificado após um conjunto de análises que a tinta contida nesta última amostra tratava-se da tinta ferrogálica.

Wagner *et al.* (2001) inspecionaram pequenas amostras (1 cm²) de páginas de um manuscrito fortemente corroído utilizando MEV. Entre as amostras coletadas, foi possível encontrar algumas parcialmente cobertas pela tinta. Eles verificaram que a morfologia craquelada dessas partes do manuscrito foram, em sua grande maioria, expostas ao processo de corrosão. Ou seja, apesar de ambas as micro amostras investigadas terem sido retiradas do mesmo manuscrito, um estado diferente de ataque corrosivo foi claramente visto entre a parte escrita e a parte em branco. Com isso, eles concluíram que a influência da tinta ferrogálica na estrutura macroscópica da fibra é limitada apenas à superfície coberta por ela.

No trabalho desenvolvido por Princi *et al.* (2008) discutiu-se as consequências do envelhecimento do papel, natural, e principalmente artificialmente, na decomposição da celulose. Segundo eles, devido ao oxigênio não penetrar na matriz da celulose, o envelhecimento do papel em ambientes fechados e escuros só pode conduzir à oxidação superficial da celulose. Entretanto, em contraste com o oxigênio, os raios UV podem penetrar em profundidade nas fibras celulósicas. Sendo assim, se o papel puder ser mantido na escuridão durante um tempo infinito, a matriz celulósica ficará inalterável.

Ersoy *et al.* (2014) constataram em seu trabalho que mesmo com a encolagem, documentos históricos e obras de arte feitos de papel podem ter vários tipos de contaminantes de superfície, incluindo colas degradadas, manchas de tinta, partículas em suspensão e agentes biológicos. O tratamento de encolagem nos papéis mais antigos era realizado, em sua grande maioria, a partir de moléculas grandes, capazes de formar uma película somente sobre a superfície da teia de fibra, contribuindo assim para a resistência do papel. Atualmente esse tratamento é realizado especialmente com moléculas menores, que penetram no interior das fibras, aumentando assim a força interna do papel (Brenner *et al.*, 2016). De uma forma ou de outra, a tinta ferrogálica necessita de uma forte interação com as fibras internas do suporte, onde o ar ambiente não é capaz de oxidar o ferro livre presente na composição desta tinta. Portanto, ela só é favorável para papéis sem tratamento, pois a encolagem age como “inimiga” da tinta ferrogálica, protegendo o papel contra borrões de tinta, fazendo com que a tinta não permeie tão profundamente nas fibras do papel (Zhang *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2014). Logo, é natural que se forme um filme de tinta na superfície do mesmo. Sendo assim, é de se esperar que a grande maioria do patrimônio de papel de diversas regiões do mundo ocidental que utilizaram a tinta ferrogálica durante algum período da história esteja ameaçada, necessitando, categoricamente, de conservação preventiva ou, em casos mais extremos, de uma restauração corretiva.

4.3.5 Investigação microbiológica

Os resultados do teste microbiológico estão representados nas Figuras 17-19. Nestas figuras é possível observar que, mesmo na ausência de fonte de carbono, além da tira de papel (celulose), houve crescimento de micro-organismos em todos os casos, particularmente na região onde as tiras de papel foram colocadas na placa, bem como em seu entorno. Isso mostra que o meio de cultura selecionado supriu os nutrientes necessários aos fungos do ambiente, suplementado com a fonte de carbono de natureza celulósica.

Na Figura 17 pode-se observar que os micro-organismos cresceram de forma mais abundante nos papéis que contêm amido, uma vez que este polissacarídeo possui valor energético necessário para o seu desenvolvimento, confirmando a natureza celulolítica das espécies contaminantes. Por isso, o crescimento de fungos na amostra E, foi pouco substancial, provavelmente devido à ausência desse polissacarídeo, corroborando os resultados dos *spot tests*.

Nas demais placas (Figuras 18, 19), independente da tinta (1 ou 2) impregnada nas tiras de papel e inoculadas no meio de cultura, foi verificado que os fungos cresceram tanto na área do papel sem a tinta, bem como na área com tinta, indicando que a presença da tinta, embora seja um facilitador da degradação química do papel, não impede a proliferação fúngica. Também foi observado que quanto maior a quantidade de amido (determinado pela coloração mais pronunciada nos *spot tests*) na superfície das amostras, maior foi o crescimento dos fungos (amostras F e H). Além disso, nota-se que a presença de carga alcalina nos papéis F, G e H não impediu que essas amostras fossem contaminadas pelos fungos.

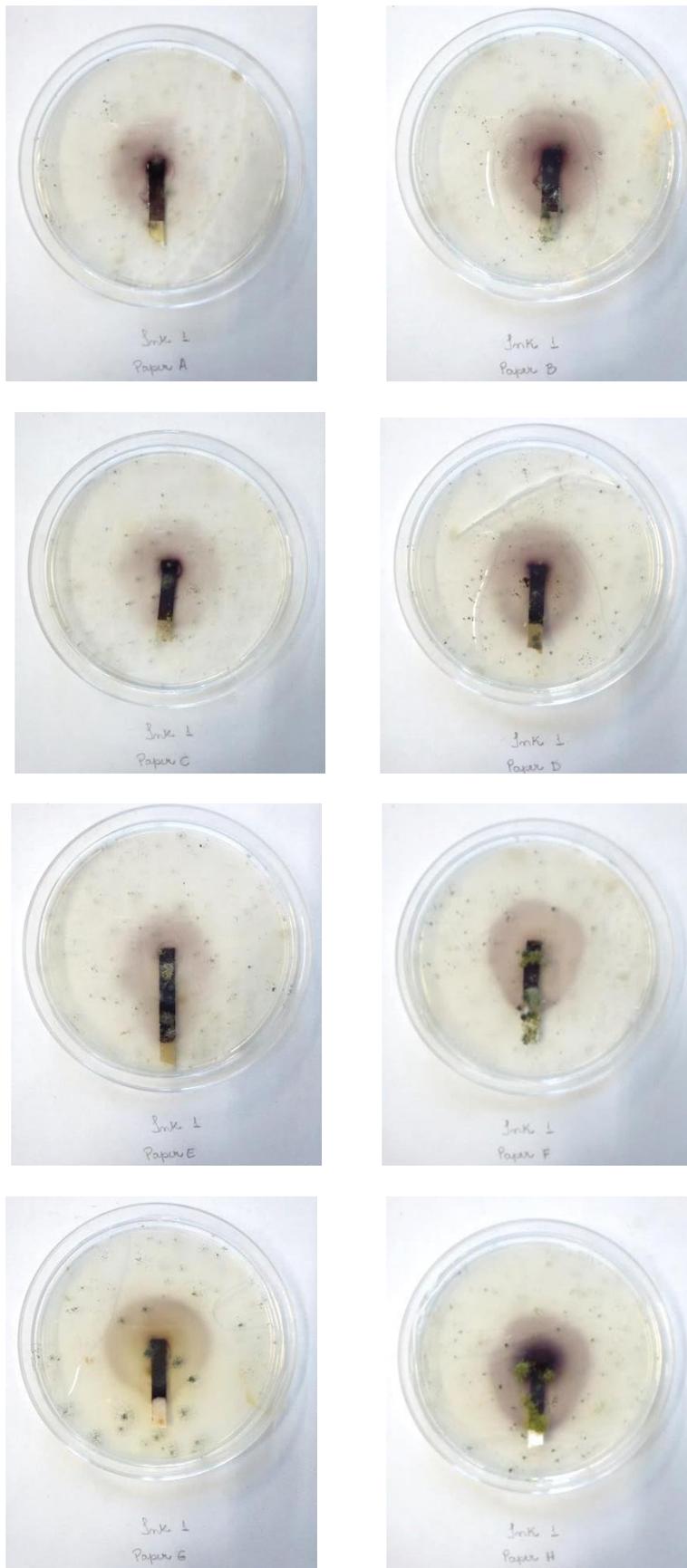
Certos fungos conseguem produzir ácidos orgânicos, acelerando a corrosão do componente metálico da tinta ferrogálica e posteriormente causando a biodeterioração do papel. Desta forma, a presença de micro-organismos nas tiras de papel comprova que tais papéis, devido primeiramente ao tipo de encolagem, são bastante vulneráveis ao ataque biológico, principalmente por fungos. No entanto a tinta ferrogálica, ao corroer quimicamente o papel, torna-se a principal responsável por abrir caminho para a deterioração microbiana. Esta afirmação pode ser comprovada pelos resultados observados nas amostras do papel E impregnadas com as tintas 1 e 2 (Figuras 18 e 19), onde acontece o aparecimento de fungos exatamente na parte tingida, permanecendo estes, ausentes na área não impregnada do papel.

Figura 17 - Resultados do crescimento fúngico nas amostras de papéis sem tinta ferrogálica.



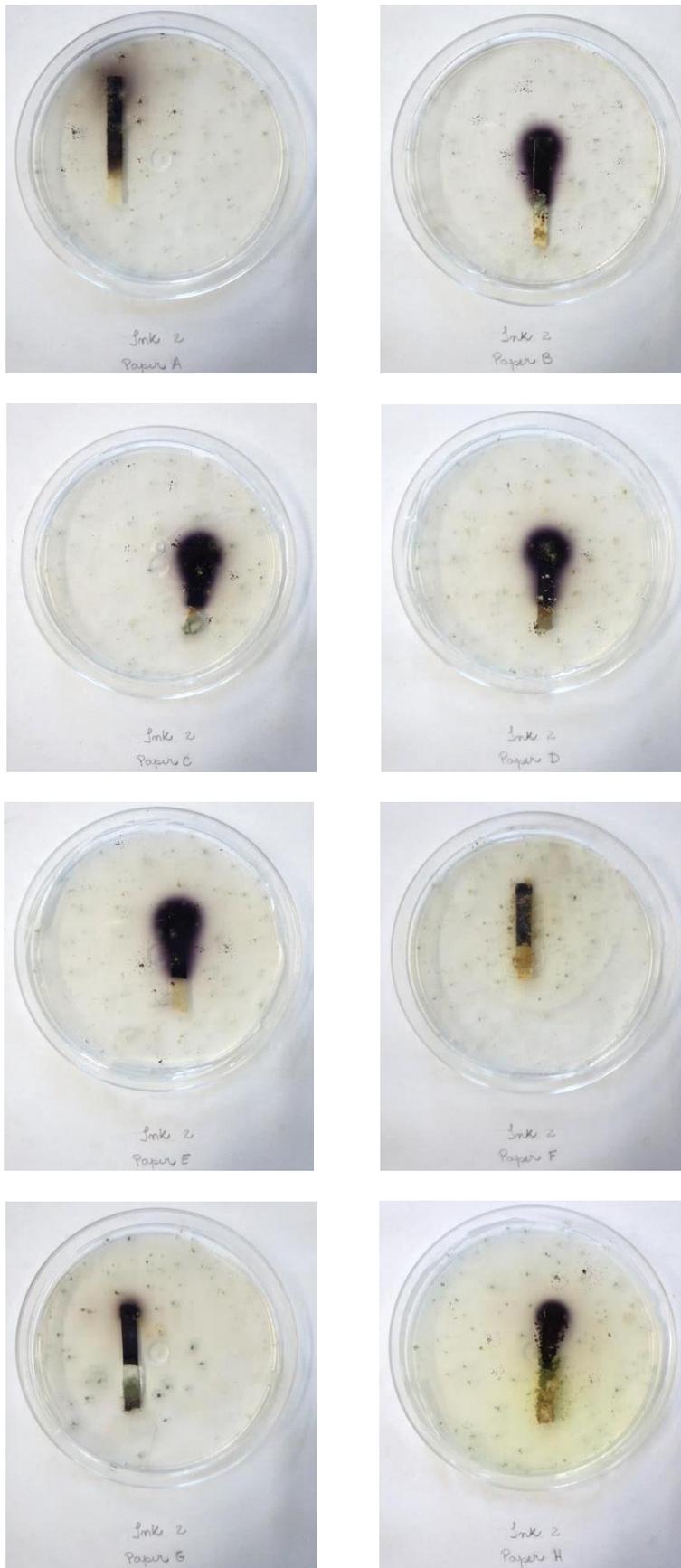
Fonte: O autor, 2016.

Figura 18 - Resultados do crescimento fúngico nas amostras de papéis com a tinta 1.



Fonte: O autor, 2016.

Figura 19 - Resultados do crescimento fúngico nas amostras de papéis com a tinta 2.



Fonte: O autor, 2016.

Conclusões

As tiras de papel impregnadas com tinta que não tiveram tratamento com fitato de cálcio apresentaram maior concentração de ferro na solução digestora, quando comparado às que receberam tratamento.

Um segundo tratamento com fitato de cálcio nas amostras para a remoção de ferro em excesso não apresentou resultados relevantes, indicando pouca representatividade.

As características particulares dos papéis, tais como, tipo de fibra, teor de lignina, tipo de encolagem, de carga, etc.; interferiram diretamente na forma como as tintas ferrogálica 1 e 2 interagiram com esses suportes.

A presença da lignina nos papéis D e E permitiram uma maior absorção da tinta ferrogálica estequiométrica (tinta 1) em suas fibras, comparado às demais amostras.

Todas as aplicações da tinta 2 formaram uma camada espessa na superfície do suporte.

A técnica não destrutiva de microscopia eletrônica de varredura foi adequada e eficiente para colaborar com as conclusões feitas a partir dos resultados obtidos pela espectroscopia de absorção atômica.

Todos os papéis contendo encolagem foram susceptíveis ao crescimento de espécies fúngicas.

A corrosão química do suporte, provocada pelo uso da tinta ferrogálica, favoreceu a proliferação dos fungos em todos os tipos de papel.

REFERÊNCIAS

ABDEL-KAREEM, O. Fungal deterioration of historical textiles and approaches for their control in Egypt. **J. e-Preservation-Science**, v. 7, p. 40-47, 2010.

ABE, K; MURATA, T. A prevention strategy against fungal attack for the conservation of cultural assets using a fungal index. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 91-96, 2014.

ACETO, M.; AGOSTINO, A.; BOCCALERI, E.; CRIVELLO, F.; GARLANDA, A. C. Evidence for the degradation of an alloy pigment on an ancient Italian manuscript. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 37, n. 10, p. 1160-1170, 2006.

ADAMI, G.; GORASSINI, A.; PRENESTI, E.; CROSERÀ, M.; BARACCHINI, E.; GIACOMELLO, A. Micro-XRF and FT-IR/ATR analyses of an optically degraded ancient document of the Trieste (Italy) cadastral system (1893): A novel and surprising iron gall ink protective action. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 96-103, 2016.

ADAMO, A. M.; GIOVANNOTTI, M.; MAGAUDDA, G.; ZAPPALÀ, M. P.; ROCCHETTI, F.; ROSSI, G. Effect of gamma rays on pure cellulose paper: as a model for the study of a treatment of biological recovery of biodeteriorated books. **Restaurator**, v. 19, n. 1, p. 41-59, 1998.

ADAMO, A. M.; MAGAUDDA, G.; NISINI, P. T.; TRONELLI, G. Susceptibility of cellulose to attack by cellulolytic microfungi after gamma irradiation and ageing. **Restaurator**, v. 24, n. 3, p. 145-151, 2003.

AGANGA, A. A.; TSOPITO, C. M.; MORAKE, K. M. Tannin content of some indigenous browse plants of Botswana, Session 8 - Tannins: plant breeding and animal effects. **XVIII International Grassland Congress**, Winnipeg, Manitoba, 1997.

ALBRO, S.; BIGGS, J. Solutions for Treating Iron-Gall Ink Artifacts. In: **Library of Congress Information Bulletin**. 2008.p. 115.

ALFELD, M.; BROEKAERT, J. A. C. Mobile depth profiling and sub-surface imaging techniques for historical paintings—A review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 88, n. 1, p. 211-230, 2013.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.

ANGUERA, M. C. S. Structure of paper fibres in ancient manuscripts: Acidic decomposition and deacidification. **Restaurator**, v. 17, n. 2, p. 117-129, 1996.

ARCON, I.; KOLAR, J.; KODRE, A.; HANZ, D.; STRLIC, M. XANES analysis of Fe valence in iron gall inks. **X-Ray Spectrometry**, v. 36, n. 3, p. 199-205, 2007.

AZEVEDO, R. L.; ASFORA, V. K.; RIBEIRO, G. B.; FERREIRA, J. V. C.; KHOURY, H. J.; SULLASI, H. S.; REGO, N. J. S.; DE MELLO, J. A. C. Archeometric studies in the Franciscan Convent of "Santo Antônio"(Recife, PE). **Applied Radiation and Isotopes**, Recife, Brasil, v. 70, n. 10, p. 2460-2465, 2012.

BALTSAVIAS, E. P. Airborne laser scanning: basic relations and formulas. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 54, n. 2, p. 199-214, 1999.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. In: **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. 1972. p. 4-49.

BASTOS, M. Q. R.; SANTOS, R. V.; TYKOT, R. H.; DE SOUZA, S. M. F. M.; CARVALHO, C. R.; LESSA, A. Isotopic evidences regarding migration at the archeological site of Praia da Tapera: New data to an old matter. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 4, p. 588-595, 2015.

BATTERHAM, I; RAI, R.A comparison of artificial ageing with 27 years of natural ageing. In: **AICCM Book, Paper and Photographic Materials Symposium**. 2008. p. 81-89.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BENNETT, J. W.; FAISON, B. D. Use of Fungi in Biodegradation. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. (Org.). **Manual of Environmental Microbiology**. Washington, D. C.: The American Society for Microbiology, 1997. p. 758-765.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; DIJKSTERHUIS, J.; STARINK-WILLEMSE, M.; ANDERSEN, B.; SUMMERELL, B. A.; SHIN, H. -D.; DUGAN, F. M.; SCHROERS, H. -J.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). **Studies in Mycology**, v. 67, p. 1-94, 2010.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology advances**, v. 15, n. 3, p. 583-620, 1997.

BICCHIERI, M.; MONTI, M.; PIANTANIDA, G.; PINZARI, F.; SODO, A. Non-destructive spectroscopic characterization of parchment documents. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, n. 2, p. 267-272, 2011.

BŁYSKAL, B. Fungi utilizing keratinous substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 631-653, 2009.

BORREGO, S.; GUIAMET, P.; DE SARAVIA, S. G.; BATISTINI, P.; GARCIA, M.; LAVIN, P.; PERDOMO, I. The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 2, p. 139-145, 2010.

BRENNER, T.; KIESSLER, B.; RADOSTA, S.; ARNDT, T. Processing surface sizing starch using oxidation, enzymatic hydrolysis and ultrasonic treatment methods—Preparation and application. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 273-279, 2016.

Broad Institute; 2014. Disponível em:

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html.

BUDNAR, M.; URŠIČ, M.; SIMČIČ, J.; PELICON, P.; KOLAR, J.; ŠELIH, V. S.; STRLIČ, M. Analysis of iron gall inks by PIXE. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 243, n. 2, p. 407-416, 2006.

BURGAUD, C., ROUCHON, V., WATTIAUX, A., BLETON, J., SABOT, R., REFAIT, P. Determination of the Fe (II)/Fe (III) ratio in iron gall inks by potentiometry: A preliminary study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 650, n. 1, p. 16-23, 2010.

BUTTERFIELD, F. J. The potential long-term effects of gamma irradiation on paper. **Studies in Conservation**, v. 32, n. 4, p. 181-191, 1987.

CALLOL, M. V. **Biodeterioração do patrimônio histórico documental: alternativas para eliminação e controle**. Rio de Janeiro: Museu de Astronomia e Ciências Afins; Fundação Casa de Rui Barbosa, 2013. 139 p.

CALZA, C.; DOS ANJOS, M. J.; BRANCAGLION JR, A.; DE SOUZA, S. M.; LIMA, T. A.; LOPES, R. T. Fluorescência de Raios X aplicada à Arqueometria. **Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação**, v. 1, n. 6, p. 338-342, 2007.

CAMERA, D. L. An investigation into the prevalence and chemistry of crystal formations on the surface of iron-gall ink: the preliminary results. In: **The Book and Paper Group Annual** (2004). American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, 2005. p. 75-85.

CAMERA, D. L. Crystal formations within iron gall ink: Observations and analysis. **Journal of The American Institute for Conservation**, v. 46, n. 2, p. 153-174, 2007.

CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 9, p. 961-970, 2005.

CASTRO, K.; PESSANHA, S.; PROIETTI, N.; PRINCI, E.; CAPITANI, D.; CARVALHO, M. L.; MADARIAGA, J. M. Noninvasive and nondestructive NMR, Raman and XRF analysis of a Blaeu-coloured map from the seventeenth century. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 1, p. 433-441, 2008a.

CASTRO, K.; PROIETTI, N.; PRINCI, E.; PESSANHA, S.; CARVALHO, M. L.; VICINI, S. CAPITANI, D.; MADARIAGA, J. M. Analysis of a coloured Dutch map from the eighteenth century: the need for a multi-analytical spectroscopic approach using portable instrumentation. **Analytica chimica acta**, v. 623, n. 2, p. 187-194, 2008b.

CHENG, Z.; DAI, Y.; KANG, X.; LI, C.; HUANG, S.; LIAN, H.; HOU, Z.; MA, P.; LIN, J. Gelatin-encapsulated iron oxide nanoparticles for platinum (IV) prodrug delivery, enzyme-stimulated release and MRI. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6359-6368, 2014.

CLEVELAND, R. Selected 18th, 19th and 20th century iron gall ink formulations developed in England, France Germany and the United States, for use with the copy press process. In: **The iron gall ink meeting, Newcastle upon Tyne, 4th & 5th September 2000: postprints**. University of Northumbria, 2000. p. 23-30.

CONCEIÇÃO, M. N.; FERREIRA, G. E.; RIBEIRO, R. C. C. Papel polimérico produzido com polietileno e resíduo de rocha ornamental. In: **XX Jornada de Iniciação Científica, CETEM**, 2012.

COSTA, J. A.; DA COSTA, M. L.; KERN, D. C. Analysis of the spatial distribution of geochemical signatures for the identification of prehistoric settlement patterns in ADE and TMA sites in the lower Amazon Basin. **Journal of Archaeological Science**, v. 40, n. 6, p. 2771-2782, 2013.

DA COSTA, A. C. A.; DA FONSECA, N. F.; DE CARVALHO, S. S.; DOS SANTOS, F. C. S. C.; BARKI, L.; DE FREITAS, D. S.; HERBST, M. H.; LUTTERBACH, M. T. S. Archaeometric investigations on naturally and thermally-aged iron-gall inks using different tannin sources. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1729-1739, 2013.

DA COSTA, A. C. A.; LINO, L. A. S.; HANNESCH, O. Total microbial populations in air-conditioned spaces of a scientific museum: Precautions related to biodeterioration of scientific collections. **Journal of Bioprocessing & Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 1-6, 2011.

DA COSTA, A.; CORRÊA, F.; SANT'ANNA, G.; DE CARVALHO, S.; DOS SANTOS, F.; LUTTERBACH, M. Scanning electron microscopic characterization of iron-gall inks from different tannin sources – Applications for cultural heritage. **Chemistry & Chemical Technology**, v. 8, n. 4, p. 423-430, 2014.

DA COSTA, A. C. A.; CORRÊA, F. N.; SANT'ANNA, G. S.; TONIETTO, G. B.; GODOY, J. M. O.; GONÇALVES, R. A.; LUTTERBACH, M. T. S. Kinetic study of non-reactive iron removal from iron-gall inks. **Chemical Papers**, v. 70, n. 5, p. 602-609, 2016.

DANIELS, V. In: BROWN, A.; JEAN, E. (Org.). **The Iron Gall Ink Meeting Postprints**. Newcastle upon Tyne: Ed. Postprints. University of Northumbria, 2001. p. 31.

DELLA GATTA, G.; BADEA, E.; CECCARELLI, R.; USACHEVA, T.; MAŠIĆ, A.; COLUCCIA, S. Assessment of damage in old parchments by DSC and SEM. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 82, n. 3, p. 637-649, 2005.

DRUZHININA, I.; KUBICEK, C. P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 6, n. 2, p. 100-112, 2005.

DZINAVATONGA, K.; BHARUTH-RAM, K.; MEDUPE, T. R. Mossbauer spectroscopy analysis of valence state of iron in historical documents obtained from the National Library of South Africa. **Journal of Cultural Heritage**, v. 16, n. 3, p. 377-380, 2015.

EGAN, A.; MARDIAN, J.; FOOT, M.; KING, E.; MILINGTON, A.; NEVIN, M.; BUTLER, C.; BARKER, J.; FLETCHER, D. The strengthening of embrittled books using gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1303-1307, 1995.

EL BAKKALI, A.; LAMHASNI, T.; LYAZIDI, S. A.; HADDAD, M.; ROSI, F.; MILIANI, C.; SÁNCHEZ-CORTÉS, S.; EL RHAITI, M. Assessment of a multi-technical non-invasive approach for the typology of inks, dyes and pigments in two 19th century's ancient manuscripts of Morocco. **Vibrational Spectroscopy**, v. 74, p. 47-56, 2014.

ELLIS, M. B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. **Dematiaceous hyphomycetes**, CABI Publishing, 2001.p.13-23.

EMBRAPA CENARGEN, 2010. Disponível em:
<http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbd01.asp>

ERSOY, T.; TUNAY, T.; UĞURYOL, M.; MAVILI, G.; AKTURK, S. Femtosecond laser cleaning of historical paper with sizing. **Journal of Cultural Heritage**, v. 15, n. 3, p. 258-265, 2014.

FAUBEL, W.; STAUB, S.; SIMON, R.; HEISSLER, S.; PATAKI, A.; BANIK, G. Non-destructive analysis for the investigation of decomposition phenomena of historical manuscripts and prints. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, n. 6, p. 669-676, 2007.

FAZIO, A. T.; CAVICCHIOLI, A.; PENNA, D. S.; CHAMBERGO, F. S.; DE FARIA, D. L. Towards a better comprehension of biodeterioration in earthen architecture: Study of fungi colonisation on historic wall surfaces in Brazil. **Journal of Cultural Heritage**, v. 16, n. 6, p. 934-938, 2015.

FENTON, H. J. H. On a new reaction of tartaric acid. **Chem News**, v. 33, n. 190, p. b16, 1876.

FERRER, N.; SISTACH, M. C. Analysis of Sediments on Iron Gall Inks in Manuscripts. **Restaurator. International Journal for the Preservation of Library and Archival Material**, v. 34, n. 3, p. 175-193, 2013.

FERRER, N.; SISTACH, M. C. Characterisation by FTIR spectroscopy of ink components in ancient manuscripts. **Restaurator**, v. 26, n. 2, p. 105-117, 2005.

FLORIAN, M., KOESTLER, R., NICHOLSON, K., PARKER, T., STANLLEY, T., SZCZEPANOWSKA, H., WAGNER, S.: Mold/fungi. In: BERTALAN, S. (Org.). **Paper Conservation Catalog**. Washington, D. C.: American Institute for Conservation/Book and Paper Group, 1994. p. 1-39.

FOLADI, S.; HEDAYATI, M. T.; SHOKOHI, T.; MAYAHI, S. Study on fungi in archives of offices, with a particular focus on *Stachybotrys chartarum*. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 23, n. 4, p. 242-246, 2013.

GALLO, F.; PASQUARIELLO, G.; ROCCHETTI, F. Biological investigation on sizings for permanent papers. **Restaurator**, v. 19, n. 2, p. 61-84, 1998.

GALVÃO, M.; LUTTERBACH, M. T. S. Application of the qPCR technique for SRB quantification in samples from the oil and gas industries. In: SKOVHUS, T. S.; CAFFREY, S. M. e HUBERT, C. R. J. (Org.). **Applications of molecular microbiological methods**. Caister Academic Press, 2014. p. 69-77.

GAMBARO, A.; GANZERLA, R.; FANTIN, M.; CAPPELLETTO, E.; PIAZZA, R.; CAIRNS, W. R. L. Study of 19th century inks from archives in the Palazzo Ducale (Venice, Italy) using various analytical techniques. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 2, p. 202-208, 2009.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370-1373, 2005.

GONZALEZ, M. E.; CALVO, A. M.; KAIRIYAMA, E. Gamma radiation for preservation of biologically damaged paper. **Radiation physics and chemistry**, v. 63, n. 3, p. 263-265, 2002.

GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; WAGHORN, G. C.; ECKARD, R. J. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 89, n. 2, p. 241-251, 2009.

GUBA, E. F. Monograph of Pestalotia and Monochaetia. Harvard University, 1961 apud MAHARACHIKUMBURAS, S. S. N.; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.; CROUS, P. W. Pestalotiopsis revisited. **Studies in mycology**, v. 79, p. 121-186, 2014.

GUIAMET, P.; BORREGO, S.; LAVIN, P.; PERDOMO, I.; DE SARAVIA, S. G. Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentina and at the National Archive of the Republic of Cuba. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 229-234, 2011.

GUO, L. D.; 2011. Disponível em:

<http://www.dnabarcodes2011.org/documents/presentations/122/taxsessionsa/fufun1/940-Guo.pdf>.

GUO, Y. H.; GUO, J. J.; MIAO, H.; TENG, L. J.; HUANG, Z. Properties and paper sizing application of waterborne polyurethane emulsions synthesized with isophoronedisocyanate. **Progress in Organic Coatings**, v. 77, n. 5, p. 988-996, 2014.

GUTAROWSKA, B.; SKORA, J.; ZDUNIAK, K.; REMBISZ, D. Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 68, p. 7-17, 2012.

GÜTHS, S. Aspectos técnicos e econômicos no condicionamento térmico para preservação de acervos. In: **Resumos do III Simpósio de Técnicas Avançadas em Conservação de Bens Culturais**. Revista Brasileira de Arqueometria Restauração Conservação, Olinda, 2006.

HAHN, O. Analyses of iron gall and carbon inks by means of X-ray fluorescence analysis: a non-destructive approach in the field of archaeometry and conservation science. **Restaurator**, v. 31, n. 1, p. 41-64, 2010.

HAHN, O.; MALZER, W.; KANNGIESSER, B.; BECKHOFF, B. Characterization of iron-gall inks in historical manuscripts and music compositions using x-ray fluorescence spectrometry. **X-Ray Spectrometry**, v. 33, n. 4, p. 234-239, 2004.

HAHN, O.; WOLF, T. Appendix: Analysis of iron gall inks by means of X-ray fluorescence analysis. In: **The Equilibrium Controversy**. Sources 2, Edition Open Access. 2012.

HAJI, L.; BOUKIR, A.; ASSOUIK, J.; LAKHIARI, H.; KERBAL, A.; DOUMENQ, P.; B, MILLE, G.; CARVALHO, M. L. Conservation of Moroccan manuscript papers aged 150, 200 and 800 years. Analysis by infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy energy dispersive spectrometry (SEM-EDS). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1038-1046, 2015.

HAROUN, M.; KHIRSTOVA, P.; COVINGTON, T. Analysis of Commercial Vegetable Tannin materials and Related Polyphenols of Selected Acacia Species in Sudan. **Journal of Forest Products & Industries**, v. 2, n. 1, p. 21-28, 2013.

HASLAM, E. **Plant polyphenols: vegetable tannins revisited**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

HERGERT, H. L. Condensed tannins in adhesives: introduction and historical perspectives. In: **ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)**. 1989.

HEY, M. The use of the scanning electron microscope in document restoration problems. **Restaurator**, v. 1, n. 4, p. 233-244, 1971.

HORNER, W. E.; BARNES, C.; CODINA, R.; LEVETIN, E. Guide for interpreting reports from inspections/investigations of indoor mold. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 3, p. 592-597, 2008.

HUBBE, M. A. Acidic and alkaline sizings for printing, writing, and drawing papers. **The Book and Paper Group Annual**, v. 23, p. 139-151, 2005.

Infectopedia; 2014. Disponível em: <http://infectopedia.com/fungos/aspergillus>.

ION, R. M.; ION, M. L.; NICULESCU, V. I. R.; DUMITRIU, I.; FIERASCU, R. C.; FLOREA, G.; BERCU, C.; SERBAN, S. Spectral analysis of original and restaured ancient paper from Romanian Gospel. **Romanian Journal of Physics**, v. 53, n. 5-6, p. 781-791, 2008.

ITO, S. KOBAYASHI, T.; ARA, K.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; HATADA, Y. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 185-190, 1998.

JAMES, C. The evolution of iron gall ink and its aesthetical consequences. In: **The iron gall ink meeting, Newcastle upon Tyne, 4th & 5th September 2000:postprints**. University of Northumbria, 2000. p. 13-22.

JEONG, M. J.; DUPONT, A. L.; DE LA RIE, E. R. Degradation of cellulose at the wet-dry interface. II. Study of oxidation reactions and effect of antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 671-683, 2014.

JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. **Plant microtechnique**, p. 523, 1940.

KALYANARAMAN, C.; KAMESWARI, K. S. B.; RAO, J. R. Studies on enhancing the biodegradation of tannins by ozonation and Fenton's oxidation process. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 25, p. 329-337, 2014.

KARDEL, M.; TAUBE, F.; SCHULZ, H.; SCHUTZE, W.; GIERUS, M. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plant extracts - Review and new aspects. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 86, n. 1, p. 154-166, 2013.

KAUTEK, W.; PENTZIEN, S.; RÖLLIG, M.; RUDOLPH, P.; KRÜGER, J.; MAYWALD-PITELLOS, C.; BANSA, H.; GRÖSSWANG, H.; KÖNIG, E. Near-UV laser interaction with contaminants and pigments on parchment: laser cleaning diagnostics by SE-microscopy, VIS-, and IR-spectroscopy. **Journal of Cultural Heritage**, v. 1, p. S233-S240, 2000.

KHAN, A. A. H.; KARUPPAYIL, S. M. Fungal pollution of indoor environments and its management. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 4, p. 405-426, 2012.

KOČIĆ, K.; SPASIĆ, T.; UROŠEVIĆ, M. A.; TOMAŠEVIĆ, M. Trees as natural barriers against heavy metal pollution and their role in the protection of cultural heritage. **Journal of Cultural Heritage**, v. 15, n. 3, p. 227-233, 2014.

KOLAR, J.; MALEŠIČ, J.; KOČAR, D.; STRLIČ, M.; DE BRUIN, G.; KOLEŠA, D. Characterization of paper containing iron gall ink using size exclusion chromatography. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 11, p. 2212-2216, 2012.

KOLAR, J. Mechanism of autoxidative degradation of cellulose. **Restaurator**, v. 18, n. 4, p. 163-176, 1997.

KOLAR, J.; MOŽIR, A.; BALAŽIC, A.; STRLIČ, M.; CERES, G.; CONTE, V.; MIRRUZZO, V.; STEEMERS, T.; DE BRUIN, G. New antioxidants for treatment of transition metal containing inks and pigments. **Restaurator**, v. 29, n. 3, p. 184-198, 2008.

KOLAR, J., MOŽIR, A., STRLIČ, M., BRUIN, G., PIHLAR, B.; STEEMERS, T. Stabilization of iron gall ink: aqueous treatment with magnesium phytate. **e-Preservation Science**, v. 4, p. 19-24, 2007.

KOLAR, J.; ŠTOLFA, A.; STRLIČ, M.; POMPE, M.; PIHLAR, B.; BUDNAR, M.; SIMČIČ, J.; REISSLAND, B. Historical iron gall ink containing documents – properties affecting their condition. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 1, p. 167-174, 2006.

KOLAR, J.; STRLIČ, M.; BUDNAR, M.; MALEŠIČ, J.; ŠELIH, V. S.; SIMČIČ, J. Stabilisation of corrosive iron gall inks. **Acta Chimica Slovenica**, v. 50, n. 4, p. 763-770, 2003.

KOLAR, J.; STRLIČ, M. **Iron gall inks: on manufacture, characterisation, degradation and stabilisation**. Ljubljana: National and University Library of Slovenia, 2006.

KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A.; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 41-66, 2003.

KREKEL, C. The chemistry of historical iron gall inks: understanding the chemistry of writing inks used to prepare historical documents. **International journal of forensic document examiners**, v. 5, p. 54-58, 1999.

KRISPER, P.; TISLER, V.; SKUBIC, V.; RUPNIK, I.; KOBAL, S. Use of Tannin from Chestnut (*Castanea vesca*). In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. (Org.). **Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance**. Nova Iorque: Springer US, 1992. p. 1013-1019.

LEAL, J. E. F. Tintas para escrever. **Documento Monumento**, v. 2, n. 1, 2010.

LEE, A. S.; MAHON, P. J.; CREAGH, D. C. Raman analysis of iron gall inks on parchment. **Vibrational Spectroscopy**, v. 41, n. 2, p. 170-175, 2006.

MACHADO, M. M. **Perfil fitoquímico e avaliação dos principais efeitos biológicos e imunológicos *in vitro* da *Euphorbia tirucalli* L.** 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

MAENZ, D. D.; ENGELE-SCHAAN, C. M.; NEWKIRK, R. W.; CLASSEN, H. L. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 81, n. 3-4, p. 177-192, 1999.

MAITLAND, C. L. Where archival and fine art conservation meet: Applying iron gall ink antioxidants and deacidification treatments to corrosive copper watercolors. **The Book and Paper Group Annual**, v. 28, p. 37-45, 2009.

MALEŠIČ, J.; KOLAR, J.; STRLIC, M.; POLANC, S. The use of halides for stabilisation of iron gall ink containing paper: the pronounced effect of cation. **E Preserv Sci**, v. 2, p. 13-18, 2005.

MALEŠIČ, J.; ŠALA, M.; ŠELIH, V. S.; KOČAR, D. Evaluation of a method for treatment of iron gall ink corrosion on paper. **Cellulose**, v. 21, n. 4, p. 2925-2936, 2014.

MANHITA, A.; BALCAEN, L.; VANHAECKE, F.; FERREIRA, T.; CANDEIAS, A.; DIAS, C. B. Unveiling the colour palette of Arraiolos carpets: Material study of carpets from the 17th to 19th century period by HPLC-DAD-MS and ICP-MS. **Journal of Cultural Heritage**, v. 15, n. 3, p. 292-299, 2014.

MANSO, M.; CARVALHO, M. L.; QUERALT, I.; VICINI, S.; PRINCI, E. Investigation of the Composition of Historical and Modern Italian Papers by Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF), X-ray Diffraction (XRD), and Scanning Electron Microscopy Energy Dispersive Spectrometry (SEM-EDS). **Applied spectroscopy**, v. 65, n. 1, p. 52-59, 2011.

MARGUTTI, S.; CONIO, G.; CALVINI, P.; PEDEMONTE, E. Hydrolytic and oxidative degradation of paper. **Restaurator**, v. 22, n. 2, p. 67-83, 2001.

MASSART, S.; JIJAKLI, H. M. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: a review. **Journal of microbiological methods**, v. 69, n. 2, p. 229-241, 2007.

MATSUSHIMA, T. Desorption Kinetics. In: _____. (Org.). **Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering**. Ibaraki, Japão: Ed. Elsevier, 2013. p. 1-5.

MESQUITA, N.; PORTUGAL, A.; VIDEIRA, S.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; BANDEIRA, A. M. L.; SANTOS, M. J. A.; FREITAS, H. Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 5, p. 626-629, 2009.

MILLWARD, G. E.; LIU, Y. P. Modelling metal desorption kinetics in estuaries. **Science of the total Environment**, v. 314, p. 613-623, 2003.

MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; DE LARAUJO, E.; DE AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MURMANIS, L.; HIGHLEY, T. L.; RICARD, Jacques. **Hyphal interaction of Trichoderma harzianum and Trichoderma polysporum with wood decay fungi**. Forest Products Laboratory, Forest Service, US Department of Agriculture, 1989.

NCBI; 2014. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov.

NEEVEL, J. G. Phytate: a potential conservation agent for the treatment of ink corrosion caused by iron gall inks. **Restaurator**, v. 16, n.3, p. 143-160, 1995.

OLIVEIRA F. C. Aspectos gerais e morfológicos do fungo *Periconia* sp; 2014. Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/07/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo_9126.html.

ORLANDINI, V. Effect of aqueous treatments on nineteenth-century iron-gall-ink documents: calcium phytate treatment – optimization of existing protocols. **The Book and Paper Group Annual**, v. 28, p. 137-146, 2009.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

ORTEGA, Natividad et al. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 47, n. 1, p. 7-14, 2001.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PAULUS, W. **Directory of microbicides for the protection of materials: a handbook**. Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2004.

PESSANHA, S.; MANSO, M.; CARVALHO, M. L. Application of spectroscopic techniques to the study of illuminated manuscripts: A survey. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 71, p. 54-61, 2012.

PETERSON, S. W.; JURJEVIC, Z.; BILLS, G. F.; STCHIGEL, A. M.; GUARRO, J.; VEGA, F. E. *Genus Hamigera*, six new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 847-864, 2010.

PINHEIRO, C.: Urban Settings: Fungi in Archives: A Double Concern. In: VIEGAS, C.; PINHEIRO, C.; SABINO, R.; VIEGAS, S.; BRANDÃO, J.; VERÍSSIMO, C. (Org.). **Environmental Mycology in Public Health: Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management**. Portugal: Pharmacy Department, Centro Hospitalar do Algarve, 2016. p. 157-166.

POGGI, G.; SISTACH, M. C.; MARIN, E.; GARCIA, J. F.; GIORGI, R.; BAGLIONI, P. Calcium hydroxide nanoparticles in hydroalcoholic gelatin solutions (GeolNan) for the deacidification and strengthening of papers containing iron gall ink. **Journal of Cultural Heritage**, v. 18, p. 250-257, 2016.

PRINCI, E.; VICINI, S.; MARSANO, E.; TREFILETTI, V. Influence of the artificial weathering on thermal stability of paper-based materials. **Thermochemica Acta**, v. 468, n. 1, p. 27-34, 2008.

RAKOTONIRAINY, M. S.; FOHRER, F.; FLIEDER, F. Research on fungicides for aerial disinfection by thermal fogging in libraries and archives. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, n. 2, p. 133-139, 1999.

RAKOTONIRAINY, M. S.; LAVÉDRINE, B. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2005.

RANA, K. K.; WADHWA, M.; BAKSHI, M. P. S. Seasonal variations in tannin profile of tree leaves. **The Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 8, p. 1134-1138, 2006.

REHÁKOVÁ, M.; ČEPPAN, M.; VIZÁROVÁ, K.; PELLER, A.; STOJKOVIČOVÁ, D.; HRICKOVÁ, M. Study of stability of brown-gray inks on paper support. **Heritage Science**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2015.

REISSLAND, B. Ink corrosion: Side-effects caused by aqueous treatments for paper objects. In: **The iron gall ink meeting, Newcastle upon Tyne, 4th & 5th September 2000: postprints**. Universidade de Nortúmbria, 2000b. p. 109-114.

REISSLAND, B. Visible progress of paper degradation caused by iron gall inks. In: **The iron gall ink meeting, Newcastle upon Tyne, 4th & 5th September 2000**: postprints. University of Northumbria, 2000a. p. 67-72.

REMAZEILLES, C., ROUCHON-QUILLET, V., BERNARD, J., CALLIGARO, T., DRAN, J. C., PICHON, L., SALOMON, J.; EVENO, M. Influence of gum arabic on iron-gall ink corrosion. Part II: Observation and elemental analysis of originals. **Restaurator**, v. 26, n. 2, p. 118-133, 2005.

REMAZEILLES, C.; QUILLET, V.; CALLIGARO, T.; DRAN, J. C.; PICHON, L.; SALOMON, J. PIXE elemental mapping on original manuscripts with an external microbeam. Application to manuscripts damaged by iron-gall ink corrosion. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: beam interactions with materials and atoms**, v. 181, n. 1, p. 681-687, 2001.

RISBØL, O.; BRIESE, C.; DONEUS, M.; NESBAKKEN, A. Monitoring cultural heritage by comparing DEMs derived from historical aerial photographs and airborne laser scanning. **Journal of Cultural Heritage**, v. 16, n. 2, p. 202-209, 2015.

ROBERT, R.; BARBATI, S.; RICQ, N.; AMBROSIO, M. Intermediates in wet oxidation of cellulose: identification of hydroxyl radical and characterization of hydrogen peroxide. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4821-4829, 2002.

RODRÍGUEZ, R.; FRUTOS, P.; FONDEVILA, M. A new index to estimate reactivity and biological effect of tannins, using tropical browse legumes as a model. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p. 42-48, 2015.

ROUCHON, V.; DURANTON, M.; BELHADJ, O.; DESROCHES, M. B.; DUPLAT, V.; WALBERT, C.; HANSEN, B. V. The use of halide charged interleaves for treatment of iron gall ink damaged papers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 98, n. 7, p. 1339-1347, 2013.

ROUCHON, V., DUROCHER, B., PELLIZZI, E.; STORDIAU-PALLOT, J. The water sensitivity of iron gall ink and its risk assessment. **Studies in Conservation**, v. 54, n. 4, p. 236-254, 2009.

ROUCHON, V., PELLIZZI, E., DURANTON, M., VANMEERT, F., JANSSENS, K., BURGAUD, C., LAVEDRINE, B., NOLF, W., NUYTS, G.; HELLEMANS, K. Room-temperature study of iron gall ink impregnated paper degradation under various oxygen and humidity conditions: time-dependent monitoring by viscosity and X-ray absorption near-edge spectrometry measurements. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 7, p. 2589-2597, 2011a.

ROUCHON, V., PELLIZZI, E., DURANTON, M., VANMEERT, F.; JANSSENS, K. Combining XANES, ICP-AES, and SEM/EDS for the study of phytate chelating treatments used on iron gall ink damaged manuscripts. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 12, p. 2434-2441, 2011b.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 750-763, 2003.

ŠALA, M.; KOLAR, J.; STRLIČ, M.; KOČEVAR, M. Synthesis of myo-inositol 1, 2, 3-tris- and 1, 2, 3, 5-tetrakis (dihydrogen phosphate) s as a tool for the inhibition of iron-gall-ink corrosion. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 7, p. 897-902, 2006.

SANZ, J. L.; KÖCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 119-133, 2007.

SATO, Y.; AOKI, M.; KIGAWA, R. Microbial deterioration of tsunami-affected paper-based objects: A case study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 142-149, 2014.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.

SCHOLTEN, S. WINDT, H. V. D. (Org.). **Proceedings of the European workshop on iron-gall ink corrosion**. Holanda, Amsterdam: Instituut Collectie, 1997. p. 9-12.

SCHRAMM, H. P.; HERING, B. Historische Malmaterialien und Möglichkeiten ihrer Identifizierung: Akademische Verlagsgesellschaft, Graz, 1988: p. 205.

SCHWARTZ, M. W.; PORTER, D. J.; HERMANN, S. M.; STROBEL, G. Occurrence of *Pestalotiopsis microspora* on *Torreya taxifolia* in Florida. **Plant Disease**, v. 80, n. 5, p. 600, 1996.

ŠELIH, V. S., STRLIČ, M., KOLAR, J., & PIHLAR, B. The role of transition metals in oxidative degradation of cellulose. **Polymer degradation and stability**, v. 92, n. 8, p. 1476-1481, 2007.

SEQUEIRA, S.; CABRITA, E. J.; MACEDO, M. F. Antifungals on paper conservation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 74, p. 67-86, 2012.

SERGEEVA, V.; PRIEST, M.; NAIR, N. G. Species of *Pestalotiopsis* and related genera occurring on grapevines in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, n. 2, p. 255-258, 2005.

SILVA, M.; MORAES, A. M. L.; NISHIKAWA, M. M.; GATTI, M. J. A.; ALENCAR, M. A. V.; BRANDÃO, L. E.; NÓBREGA, A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 57, n. 3, p. 163-167, 2006.

SILVA, R. C. S.; AKISUE, G.; COELHO, M. D. G.; DE ALMEIDA, J. C. R.; ALMEIDA, A. A. S. Potencial do Araribá no desenvolvimento de fitoterápico: extração de fenóis e taninos totais. In: INTERNATIONAL CONGRESS UNIVERSITY INDUSTRY COOPERATION, 4th, 2012, Taubaté, **Innovation and Sustainability in Latin America...** Taubaté: UNINDU, 2012. p. 1-4.

SILVA, R. N. **Estudos de sinalização celular em *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) durante a expressão dos genes de celulase (*cbh1* e *cbh2*) em presença de celulose e soforose e durante o antagonismo contra *Pythium ultimum***. 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SIQUEIRA, C. F. Q.; CABRAL, D. L. V.; SOBRINHO, T. J. S. P.; DE AMORIM, E. L. C.; DE MELO, J. G.; ARAÚJO, T. A. S.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: Evaluating bioprospecting strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2011.

SMITH, M.; CULP, J. T.; BITTNER, E.; PARKER, B.; LI, J.; BOCKRATH, B. Kinetics of desorption of hexane from the microporous metal organic framework RPM-1. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 106, n. 1, p. 115-121, 2007.

SPINELLI JR., JAYME. A conservação de acervos bibliográficos & documentais, Biblioteca Nacional, 92 p., 1997.

SPIZZICHINO, V.; FANTONI, R. Laser Induced Breakdown Spectroscopy in archeometry: A review of its application and future perspectives. **Spectrochimica Acta Part B: atomic spectroscopy**, v. 99, p. 201-209, 2014.

STEEMERS, T. Damage survey of archives containing iron gall inks. In: KOLAR, J.; STRLIČ, M. (Org.). **Iron gall inks: on manufacture, characterization, degradation and stabilization**. Ljubljana: National and University Library, 2006. p. 20-24.

STEPALSKA, D.; HARMATA, K.; KASPRZYK, I.; MYSZKOWSKA, D.; STACH, A. Occurrence of airborne *Cladosporium* and *Alternaria* spores in Southern and Central Poland in 1995–1996. **Aerobiologia**, v. 15, n. 1, p. 39-47, 1999.

STERFLINGER, K.; PINZARI, F. The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 3, p. 559-566, 2012.

STIJNMAN, A. Art of the Past, Sources and Reconstructions. In: CLARKE, M.; TOWNSEND, J. H.; STIJNMAN, A. (Org.). **Proceedings of the first symposium of the Art Technological Source Study group**. Londres: Ed. Archetype, 2005. p. 125.

STRASSBERG, R. The use of fumigants in archival repositories. **The American Archivist**, v. 41, n. 1, p. 25-36, 1978.

STRLIČ, M.; MENART, E.; CIGIĆ, I. K.; KOLAR, J.; DE BRUIN, G.; CASSAR, M. Emission of reactive oxygen species during degradation of iron gall ink. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 1, p. 66-71, 2010.

STRLIČ, M.; KOLAR, J. Paper and durability. In:_____. (Org.). **Ageing and stabilisation of paper**. Ljubljana: Ed. National and University Library, 2005. p. 1-23.

STRLIČ, M.; KOLAR, J.; ŠELIH, V. S.; KOČAR, D.; PIHLAR, B. A comparative study of several transition metals in Fenton-like reaction systems at circum-neutral pH. **Acta Chimica Slovenica**, v. 50, n. 4, p. 619-632, 2003.

SYTA, O.; ROZUM, K.; CHOIŃSKA, M.; ZIELIŃSKA, D.; ŻUKOWSKA, G. Z.; KIJOWSKA, A.; WAGNER, B. Analytical procedure for characterization of medieval wall-paintings by X-ray fluorescence spectrometry, laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 101, p. 140-148, 2014.

TAFTI, A. P.; KIRKPATRICK, A. B.; ALAVI, Z.; OWEN, H. A.; YU, Z. Recent advances in 3D SEM surface reconstruction. **Micron**, v. 78, p. 54-66, 2015.

THEBAULT, M.; PIZZI, A.; DUMARCAY, S.; GERARDIN, P.; FREDON, E.; DELMOTTE, L. Polyurethanes from hydrolysable tannins obtained without using isocyanates. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 329-336, 2014.

TradeIndia Corp; 2014. Disponível em: <http://www.tradeindia.com/fp31012/Biofungicide-Trichoderma-viride-harzianum.html>.

TROVÃO, J.; MESQUITA, N.; PAIVA, D. S.; DE CARVALHO, P. H.; AVELAR, L.; PORTUGAL, A. Can arthropods act as vectors of fungal dispersion in heritage collections? A case study on the archive of the University of Coimbra, Portugal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 49-55, 2013.

TRUGILHO, P. F.; CAIXETA, R. P.; LIMA, J. T.; MENDES, L. M. Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro. **Cerne, Lavras**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 1997.

USDA; 2014. Disponível em:

http://www.ncaur.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=245044.

VALENTÍN, N.; GARCÍA, R. El biodeterioro en el museo. **Arbor**, v. 645, p. 85-107, 1999.

VALENTÍN, N. **Microbial contamination in archives and museums: health hazards and preventive Strategies using air ventilation Systems**. 2007. 26 f. Contribution to the Experts' Roundtable on Sustainable Climate Management Strategies – The Getty Conservation Institute, Tenerife, Espanha, abr. 2007.

VÁZQUEZ, C.; ALBORNOZ, A.; HAJDUK, A.; ELKIN, D.; CUSTO, G.; OBRUSTKY, A. Total reflection x-ray fluorescence and archaeometry: Application in the Argentinean cultural heritage. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 63, n. 12, p. 1415-1419, 2008.

WAGNER, B.; BULSKA, E.; HULANICKI, A.; HECK, M.; ORTNER, H. M. Topochemical investigation of ancient manuscripts. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, n. 7-8, p. 674-679, 2001.

WAGNER, B.; BULSKA, E.; STAHL, B.; HECK, M.; ORTNER, H. M. Analysis of Fe valence states in iron-gall inks from XVIth century manuscripts by ⁵⁷Fe Mössbauer spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 527, n. 2, p. 195-201, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Org.). **PCR protocols: A guide to methods and applications**. Academic Press, Inc., New York. 1990. p. 315-322.

XU, J.; EBADA, S. S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 15-31, 2010.

XU, J.; YANG, X.; LIN, Q. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. **Fungal Diversity**, v. 66, n. 1, p. 37-68, 2014.

YONEZAWA, T.; KAMOSHITA, K.; TANAKA, M.; KINOSHITA, T. Easy preparation of stable iron oxide nanoparticles using gelatin as stabilizing molecules. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 47, n. 2, p. 1389-1392, 2008.

YUE, G.; ZHAO, L.; OLVERA, O. G.; ASSELIN, E. Speciation of the $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-Fe}_2(\text{SO}_4)_3\text{-FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}$ system and development of an expression to predict the redox potential of the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ couple up to 150°C . **Hydrometallurgy**, v. 147-148, p. 196-209, 2014.

ZAPPALÀ, M. P. Gli inchiostri da manoscritto: composizione, alterazioni, conservazione. **La Conservazione del Materiale Librario, Bsi, Gorizia**, p. 34-52, 2004.

ZHANG, G.; ZHENG, H.; GUO, M.; DU, L.; LIU, G.; WANG, P. Synthesis of polymeric fluorescent brightener based on coumarin and its performances on paper as light stabilizer, fluorescent brightener and surface sizing agent. **Applied Surface Science**, v. 367, p. 167-173, 2016.

ZHAO, S.; LIU, J. Y.; CHEN, S. Y.; SHI, L. L.; LIU, Y. J.; MAO, C. Antioxidant potential of polyphenols and tannins from burs of *Castanea mollissima* Blume. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8590-8600, 2011.

ZERDOUN BAT-YAHOUDA, M. **Les Encres Noires au Moyen Âge (Jusqu'à 1600)**. Paris: CNRS, 1983.

ZIVKOVIC, J.; MUJIC, I.; ZEKOVIC, Z.; VIDOVIC, S.; MUJIC, A.; JOKIC, S. Radical scavenging, antimicrobial activity and phenolic content of *Castanea sativa* extracts. **Journal of Central European Agriculture**, v. 10, n. 2, p. 175-182, 2009.

ZOTTI, M.; FERRONI, A.; CALVINI, P. Microfungal biodeterioration of historic paper: preliminary FTIR and microbiological analyses. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 186-194, 2008.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **American Naturalist**, v. 121, n. 3, p. 335-365, 1983.

APÊNDICE – Trabalhos publicado e submetido em artigos científicos

da COSTA, A. C. A. ; **CORRÊA, F. N.** ; LINO, L. A. S. ; ALMEIDA, E. H. P.; Oliveira, A. L. C.; LUTTERBACH, M. T. S. Microbiological characterization of contaminating cells on scientific collections in a specialized library. **Annual Research & Review in Biology**, v. 4, p. 3915-3931, 2014.

da COSTA, A. C. A. ; **CORRÊA, F. N.** ; SANT'ANNA, G. S. ; CARVALHO, S. S.; SANTOS, F. C. S. C.; LUTTERBACH, M. T. S. Scanning electron microscopic characterization of iron-gall inks from different tannin sources - Applications for cultural heritage. **Chemistry & Chemical Technology**, v. 8, p. 423-430, 2014.

da COSTA, A. C. A. ; CORRÊA, F. N. ; SANT'ANNA, G. S. ; TONIETTO, G. B.; GODOY, J. M.; GONCALVES, R.; LUTTERBACH, M. T. S. Kinetic study of non-reactive iron removal from iron-gall inks. **Chemical Papers**, v. 70, n. 5, p. 602-609, 2016.

da COSTA, A. C. A.; CORRÊA, F. N.; SANT'ANNA, G. S. ; HANNESCH, O.; TONIETTO, G. B.; GODOY, J. M.; GONÇALVES, R. A.; LUTTERBACH, M. T. S. Alkaline and acid papers impregnated with iron-gall inks – Stoichiometric studies, iron oxidation stabilization and scanning electron microscopy studies. **New Journal of Chemistry**, submetido em setembro de 2016.