



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Renata Nascimento Cardoso

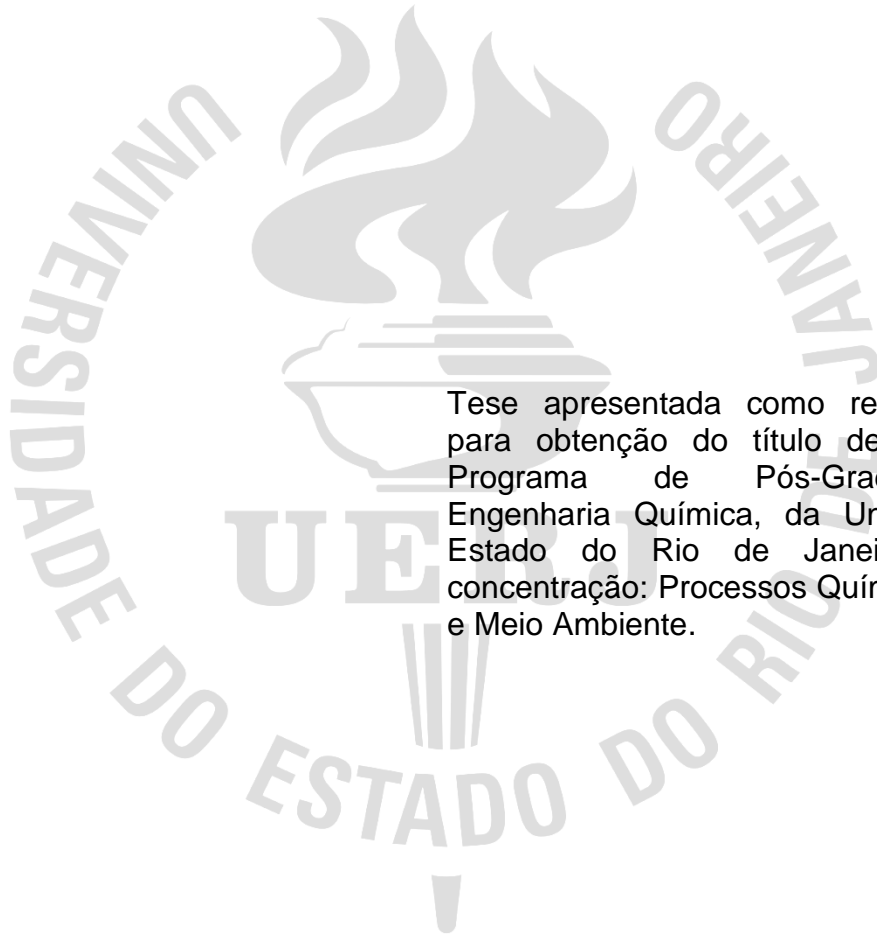
Biodeterioração do patrimônio cultural e aplicação de técnicas não destrutivas de monitoramento e controle de populações microbianas

Rio de Janeiro

2022

Renata Nascimento Cardoso

Biodeterioração do patrimônio cultural e aplicação de técnicas não destrutivas de monitoramento e controle de populações microbianas



Tese apresentada como requisito parcial para 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
2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

C268 Cardoso, Renata Nascimento.

Biodeterioração do patrimônio cultural e aplicação de técnicas não destrutivas de monitoramento e controle de populações microbianas. – 2022.

150 f.

Orientador (a): Antonio Carlos Augusto da Costa
Márcia Teresa Soares Lutterbach

Dissertação (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Química.

1. Fungos – Teses. 2. Biodeterioração – 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 66.0

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Renata Nascimento Cardoso

23/11/2022

Renata Nascimento Cardoso

Biodeterioração do patrimônio cultural e aplicação de técnicas não destrutivas de monitoramento e controle de populações microbianas

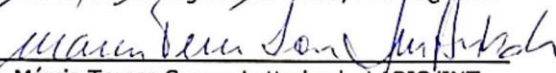
Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 10 de agosto de 2022.

Orientadores:

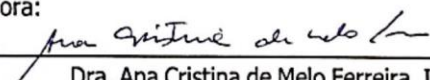


Prof. Antonio Carlos Augusto da Costa, PPG-EQ/UERJ

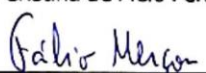


Dra. Márcia Teresa Soares Lutterbach, LABIO/INT

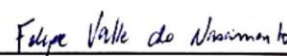
Banca Examinadora:



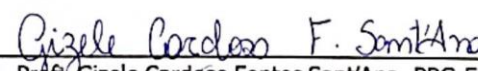
Dra. Ana Cristina de Melo Ferreira, IRD/CNEN



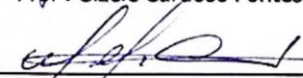
Prof. Fábio Merçon, DTPB/IQ-UERJ



Felipe Valle do Nascimento, DTPB/IQ-UERJ



Prof. Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana, PPG-EQ/IQ-UERJ



Dr. Walter Barreiro Cravo Junior, LABIO/INT

Rio de Janeiro
2022

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família - mãe, pai (*in memoriam*), companheiro e filhos - por estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus que está sempre me iluminando em todos os meus passos e abençoando minhas escolhas.

Ao meu orientador Antonio Carlos Augusto da Costa, que em todos os momentos esteve presente e disposto a me orientar com muito conhecimento e profissionalismo no desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora Márcia Teresa Soares Lutterbach, pela orientação e pronta colaboração.

À Ana Lúcia Chaves. (INT), pelo apoio nas práticas microbiológicas laboratoriais e pelo zelo em sempre atender prontamente às solicitações.

Ao apoio técnico obtido pelo IRD (Instituto de Radiometria e Dosimetria) que proporcionou a realização das irradiações com Césio-137.

Ao INT (Instituto Nacional de Tecnologia) que colaborou com as análises micro e macroscópicas realizadas na execução do trabalho.

Ao Museu Nacional por autorizar o acesso ao quadro e divulgação dos resultados obtidos neste trabalho.

À minha família, filhos e companheiro, que estão sempre ao meu lado com muito amor e carinho.

Aos meus amigos de jornada que me incentivam e ajudam nos momentos onde surge a dúvida e a insegurança.

À minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) que sempre me apoiaram e acreditaram que a Educação é o maior dos legados que se pode deixar para um filho.

RESUMO

CARDOSO, Renata Nascimento. *Biodeterioração do patrimônio cultural e aplicação de técnicas não destrutivas de monitoramento e controle de populações microbianas*. 2022. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Restauradores e conservadores enfrentam problemas para a preservação de obras e acervos documentais devido aos danos causados por microrganismos. Água, oxigênio, gases, ácidos, temperatura e luz são agentes agressivos que induzem modificações estruturais além dos próprios fatores físico-químicos que podem interferir na biodeterioração. A inspeção microbiológica em áreas selecionadas da obra a ser restaurada e do ambiente no qual ela está inserida é fundamental no estudo da biodeterioração, controle e detecção de microrganismos presentes. Foram utilizados, no presente estudo, o Trono Imperial de D. Pedro II e uma obra de Candido Portinari. Os fungos são os agentes biológicos mais atuantes por penetrar em fibras celulósicas e resultar em perda de material devido à corrosão ácida, degradação enzimática e ataque mecânico. Contra a biodeterioração, a radiação gama tem mostrado ser uma técnica segura e efetiva, largamente utilizada com elevada eficiência na redução da carga microbiana. O estudo da radiação gama para a descontaminação foi realizado nas colônias isoladas da obra de Portinari, a fim de se viabilizar um tratamento apropriado da mesma de forma a usar o conhecimento adquirido em obras de arte com características equivalentes. Um dos objetivos do trabalho foi, a partir da irradiação das colônias, avaliar a eficácia da técnica da radiação ionizante para seu tratamento não destrutivo. Para tanto foram realizados procedimentos de coleta das amostras, cultura e isolamento dos fungos, identificação clássica e por biologia molecular, irradiação das amostras com Césio 137 e repique dos fungos irradiados para análise de viabilidade. As doses de radiação utilizadas, 16, 19 e 22 kGy, foram estipuladas baseadas em estudos anteriores que mostraram resistência de algumas espécies de fungos à radiação gama. Dos vários fungos isolados, houve predominância de *Penicillium* e *Cladosporium*. Os fungos *Penicillium*, *Cladosporium*, *Nigrospora* e *Curvularia* apresentaram resistência à dose de 16 kGy sendo que o do gênero *Cladosporium* só apresentou letalidade na dose de 22 kGy. Documentos em papel contendo tintas ferrogálicas são também alvo de biodeterioração e degradação. A utilização de técnicas não destrutivas na análise dos documentos de forma a auxiliar a identificação da degradação e o desenvolvimento de técnicas de restauração mais apropriadas são relevantes já que incessante é a busca por procedimentos que respeitem os critérios éticos de mínima intervenção. O uso de fluorescência de raio-X (FRX) pode ser empregado na identificação e análise de espécies químicas presentes em tintas ferrogálicas responsáveis pela aceleração dos processos de degradação química da celulose e processos de biodeterioração. A tecnologia do envelhecimento acelerado auxilia na simulação das condições de envelhecimento do papel que sofre degradação por mecanismos de hidrólise e oxidação da celulose na presença e ausência das tintas ferrogálicas.

Palavras-chave: Fungos. Biodeterioração. Patrimônio Cultural. Radiação gama. Raio-X.

ABSTRACT

CARDOSO, Renata Nascimento. Biodeterioration of historical-cultural heritage documents and application of non-destructive techniques for monitoring and control of microbial populations. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Conservative restaurators face problems for the preservation of works and documentary collections due to damage caused by microorganisms. Water, oxygen, gases, acids, temperature and light are aggressive agents that induce structural changes in addition to the physicochemical factors themselves that can interfere with biodeterioration. Microbiological inspection in selected areas of the work to be restored and the environment in which it is inserted is fundamental in the study of biodeterioration, control and detection of microorganisms present. This study was carried out in the Imperial Throne of D. Pedro II and a work of Candido Portinari. Fungi are the biological agents most active because they penetrate cellulosic fibers and result in material loss due to acid corrosion, enzymatic degradation and mechanical attack. Against biodeterioration, gamma radiation has been shown to be a safe and effective technique, widely used with high efficiency in reducing microbial load. The study of gamma radiation for decontamination was carried out in isolated colonies from Portinari's work, in order to enable an appropriate treatment of the same in order to use the knowledge acquired in works of art with equivalent characteristics. One of the objectives of the work was, from the irradiation of the colonies, to evaluate the efficacy of the ionizing radiation technique for its non-destructive treatment. For this purpose, procedures were performed to collect the samples, culture and isolation of fungi, classical identification and molecular biology, irradiation of samples with Cesium 137 and peak of irradiated fungi for viability analysis. The radiation doses used, 16, 19 and 22 kGy, were stipulated based on previous studies that showed resistance of some fungal species to gamma radiation. Of the various fungi isolated, *Penicillium* and *Cladosporium* predominated. The fungi *Penicillium*, *Cladosporium*, *Nigrospora* and *Curvularia* showed resistance to the dose of 16 kGy and the genus *Cladosporium* only presented lethality at the dose of 22 kGy. Paper documents containing iron-gall inks are also the target of biodeterioration and degradation. The use of non-destructive techniques in the analysis of documents in order to help identify degradation and develop more appropriate restoration techniques are relevant because it is unceasing to search for procedures that respect the ethical criteria of minimal intervention. The use of X-ray fluorescence (XRF) can be used in the identification and analysis of chemical species present in iron-gall inks which are responsible for the acceleration of the processes of chemical degradation of cellulose and biodeterioration processes. The use of accelerated aging technology assists in the simulation of the aging conditions of paper that undergoes degradation by hydrolysis mechanisms and oxidation of cellulose in the presence and absence of iron-gall inks.

Keywords: Fungal. Biodeterioration. Cultural heritage. Gamma Radiation. X-rays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cartas do Século XVIII com sinais de deterioração ambiental e biológica	22
Figura 2 - Árvore filogenética das formas de vida	25
Figura 3 – Crescimento do fungo <i>Cladosporium</i> sp. (a e b) em uma pintura de parede moderna (Karl Weiser 1952, Weyregg, Austria)	29
Figura 4 - Diagrama de ciclo de vida de bolores.	31
Figura 5 - Porcentagem dos gêneros dos principais fungos reportados literatura como causadores de manchas no papel	34
Figura 6 - Porcentagem de manchas coloridas reportadas na literatura	34
Figura 7 - Métodos de identificação dos fungos	36
Figura 8 - Estrutura da eumelanina (A) e estrutura da feomelanina (B)	47
Figura 9 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos	49
Figura 10 - Composição química da parede celular de material de origem vegetal	50
Figura 11 - Fragmento da estrutura da celulose	51
Figura 12 - Estrutura da hemicelulose	52
Figura 13 - Esquema representando fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular de vegetais	54
Figura 14 - Estrutura química da lignina	55
Figura 15 - Reação de hidrólise do tanino	61
Figura 16 - Estrutura química do ácido gálico	61
Figura 17 - Reações de formação do galotanato ferroso (a) e do galotanato férrico solúvel em água (b)	62
Figura 18 – Mecanismo de hidrólise ácida da celulose	63
Figura 19 – Sistema de Fenton	63
Figura 20 - Fórmulas estruturais de taninos hidrolisáveis	65
Figura 21 – Modelo de estrutura dos taninos condensados	66
Figura 22 - Conformações do ácido fítico	68
Figura 23 - Complexo fitato-ferro	68
Figura 24 - Esquema da configuração básica do aparelho portátil de Fluorescência de Raio-X (FRX)	78
Figura 25 - Trono de D. Pedro II	80
Figura 26 - Intervenções de higienização e restauro do Trono Imperial (continua)	82
Figura 27 – Coletor de ar	84

Figura 28 – Pontos de coleta das amostras	86
Figura 29 - Obra "Índios" de Cândido Portinari	89
Figura 30 - Sala onde estava abrigada a obra, fora de exposição.	90
Figura 31 – Regiões selecionadas da obra onde foram realizadas as coletas de material biológico	91
Figura 32 – Procedimento de coleta das amostras com <i>swab</i>	91
Figura 33 – Vista frontal do irradiador gama do IDQBNR com as portas abertas	92
Figura 34 – Amostras sendo acomodadas no irradiador	93
Figura 35 – Amostras prontas e tempo determinado para iniciar a irradiação	94
Figura 36 – Espectrômetro portátil Genius 5000 XRF com tela de cristal líquido.....	97
Figura 37 – Bactérias sequenciadas coletadas, antes do processo de restauro, no ar e em partes selecionadas do Trono Imperial de D. Pedro II	104
Figura 38 – Bactérias sequenciadas, coletadas após o processo de restauro no ar e em partes selecionadas do Trono Imperial de D. Pedro II	105
Figura 39 – Fungos coletados (ar), antes do processo de restauro.	106
Figura 40 – Fungos coletados (ar), após o processo de restauro	107
Figura 41 – Imagens apresentando os aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos isolados e identificados que foram resistentes à irradiação de 16 KGy.....	114
Figura 42– Imagem da presença de viabilidade fúngica após a irradiação de 16 KGy	116
Figura 43 – Imagem da presença de viabilidade fúngica da espécie <i>Cladosporium</i> sp. após a irradiação de 16 KGy	116
Figura 44 – Imagem da viabilidade fúngica da espécie <i>Penicillium</i> sp. (à esquerda) e da espécie <i>Cladosporium</i> sp. (à direita) após a irradiação de 16 KGy e 19 KGy, respectivamente	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bactérias contaminantes encontradas em arquivos e bibliotecas	26
Tabela 2 – Alguns fungos contaminantes em arquivos e bibliotecas	33
Tabela 3 - Alguns produtos químicos usados em livrarias e arquivos em Portugal ao longo do século XX	37
Tabela 4 - Composição típica dos lignocelulósicos	49
Tabela 5 - Principais diferenças entre celulose e hemicelulose	53
Tabela 6 – Tempos de exposição das amostras no irradiador	94
Tabela 7 – Preparações das tintas.....	95
Tabela 8 - Composição química da solução de fitato.....	98
Tabela 9 - Fungos e bactérias encontrados no ambiente de exposição (ar) do Trono Imperial de d. Pedro II.	99
Tabela 10 – Bactérias encontradas no Trono Imperial de d. Pedro II e na cortina do entorno	101
Tabela 11 – Gêneros e espécies isoladas e identificadas.....	113
Tabela 12 – Viabilidade fúngica após irradiação	115
Tabela 13 - Composição metálica dos papéis (suportes).....	123
Tabela 14 - Detecção por FRX do metal (%Fe) <i>antes</i> do tratamento das amostras com Fitato de Cálcio.....	125
Tabela 15 - Detecção por FRX do metal (%Fe) <i>após</i> tratamento das amostras com Fitato de Cálcio	129
Tabela 16 - % de redução do metal <i>após</i> tratamento das amostras com Fitato de Cálcio	129

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 Biodeterioração do patrimônio histórico e cultural.....	20
1.2 Microrganismos envolvidos em processos de biodeterioração.....	24
1.3 Biodeterioração causada por Bactérias.....	26
1.4 Biodeterioração causada por Fungos.....	28
1.4.1 <u>Identificação dos gêneros e espécies fúngicas</u>	35
1.5 Tratamentos químicos e físicos de descontaminação.....	36
1.5.1 <u>Fumigação</u>	38
1.5.2 <u>Atmosfera Anóxica</u>	39
1.5.3 <u>Congelamento</u>	40
1.5.4 <u>Radiação gama</u>	40
1.6 Fungos tolerantes à radiação.....	44
1.7 Material lignocelulósico como substrato dos agentes biodeteriorantes...48	
1.7.1 <u>Celulose</u>	49
1.7.2. <u>Hemicelulose</u>	52
1.7.3 <u>Lignina</u>	53
1.8 O papel como suporte.....	57
1.9 Tintas ferrogálicas.....	60
1.10 Envelhecimento do papel.....	69
1.11 Fluorescência de Raio-X.....	72
1.11.1 <u>Técnica da Fluorescência de Raio-X (FRX)</u>	75
2 METODOLOGIA.....	79
2.1 Parte I: Biodeterioração de peças museológicas.....	79
2.1.1 <u>Peça Museológica I: Trono Imperial</u>	79
2.1.1.1 Características da peça museológica	79
2.1.1.2 Estado de conservação e procedimentos de higienização e restauro	81

2.1.1.3	Monitoramento e identificação microbiológica por biologia clássica.....	84
2.1.1.4	Identificação filogenética das bactérias por biologia molecular	86
2.1.1.5	Identificação filogenética dos fungos por biologia molecular	87
2.1.2	<u>Peça Museológica II: Obra de Portinari</u>	89
2.1.2.1	Características da obra de arte	89
2.1.2.2	Monitoramento e identificação microbiológica por biologia clássica e molecular.....	90
2.1.2.3	Irradiação das amostras com Césio 137	91
2.1.2.4	Repique dos fungos irradiados	94
2.2	Parte II - Emprego de técnica não destrutiva de análise em documentos contendo tintas ferrogálicas	95
2.2.1	<u>Utilização da fluorescência de Raio X (FRX) para semi-quantificação e qualificação da tinta ferrogálica</u>	95
2.2.1.1	Confecção das tintas ferrogálicas.....	95
2.2.1.2	Impregnação das amostras de papéis ácidos e alcalinos.....	96
2.2.1.3	Fluorescência de raio-X nas tiras de papel.....	96
2.2.1.4	Tratamento químico com fitato de cálcio para remoção de ferro em excesso.....	97
3	RESULTADOS	99
3.1	PARTE I - Biodeterioração de peças museológicas	99
3.1.1	<u>Peça museológica I: Trono Imperial (Museu Imperial)</u>	99
3.1.2	<u>Peça museológica II: Obra de Cândido Portinari (Museu Nacional)</u>	112
3.1.3	<u>Viabilidade dos fungos após a radiação gama</u>	113
3.2	PARTE II – Emprego da Fluorescência de Raio-X como técnica não destrutiva de análise	123
	CONCLUSÕES	135
	REFERÊNCIAS	138
	APÊNDICE – Produções científicas	150

INTRODUÇÃO

A conservação e a restauração de documentos de caráter histórico-científico é um problema que vem despertando a atenção de inúmeras instituições preocupadas com a manutenção e a disponibilização de fontes para pesquisa na área da História da Ciência no Brasil. Museus, livrarias e arquivos estão preservando documentos que são vagarosamente degradados devido ao envelhecimento inerente do substrato celulose ou dos erros das tecnologias do passado (papel ácido e tintas ferrogálicas). Além disso, grandes quantidades de papel são rapidamente prejudicadas por ataques biológicos seguidos de desastres naturais e condições inapropriadas de estocagem (MOISE *et al.*, 2012).

As bactérias e fungos, quando em ambientes favoráveis, são os principais responsáveis pela degradação de objetos do patrimônio cultural. A sobrevivência e o desenvolvimento de microrganismos no ar e nas superfícies dependem de características estruturais e metabólicas bem como da presença de condições favoráveis, como condições nutricionais e microclimáticas. Por essas razões torna-se importante a manutenção e o restauro de peças, documentos e obras do patrimônio cultural para maior estabilidade e conservação de sua estrutura, uma vez que, por se tratar de objetos antigos, já apresentam algumas fragilidades.

Os fungos são capazes de habitar, alterar e degradar todos os tipos de materiais orgânicos e inorgânicos e, historicamente, as peças de arte são feitas desses materiais que também são usados nas práticas de restauração e conservação. Livros, impressões, desenhos, aquarelas, gravuras bem como todas as obras de arte baseadas em papel são muito susceptíveis ao desenvolvimento dos fungos que desempenham uma ação considerável na deterioração do patrimônio cultural por conta da sua grande atividade enzimática e capacidade de crescer em baixos valores de atividade de água (a_w) (MELO *et al.* 2019; STERFLINGER, 2010). Além disso, a contaminação fúngica pode ocorrer por via aérea, contaminando todo o microambiente onde os fungos estejam instalados. Assim, torna-se relevante o monitoramento microbiológico de ambientes climatizados já que possuem relação com processos deteriorantes de substratos específicos.

Diversos estudos na área apontam para o desenvolvimento de alguns gêneros sempre muito frequentes em museus e salas de armazenamento de obras

de arte e de acervos documentais. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Trichoderma* são muito comuns porém vários outros gêneros são encontrados como *Eurotium*, *Chaetomium*, *Phoma*, etc, e todos causam manchas no papel de várias tonalidades, sendo a marrom a mais presente. (MELO *et al.*, 2019).

Diversas técnicas de descontaminação de acervos são estudadas e empregadas no combate à contaminação fúngica e à ação de insetos xilófagos. Dentre elas, a técnica de fumigação, o tratamento por anóxia ou por atmosfera modificada e o congelamento são técnicas bastante empregadas embora o uso de óxido de etileno esteja proibido nos dias atuais por conta da toxicidade e a logística dificulte o emprego de algumas outras. A técnica utilizando a radiação ionizante (radiação gama) vem sendo utilizada e estudada por diversos pesquisadores da área de conservação e restauração como uma alternativa efetiva e segura para a desinfecção de acervos uma vez que apresenta elevada eficiência na redução da carga microbiana sem deixar nenhum resíduo tóxico. Para a desinfestação de insetos em qualquer um dos seus estágios de desenvolvimento (ovo, larva, pupa ou adulto) a quantidade de radiação absorvida pelo produto inferior a 500 Gy é suficiente para causar letalidade. No caso da desinfecção de fungos e bactérias as doses envolvidas são mais elevadas e da ordem de 10kGy ou mais. (RELA *et al.*, 2007). Inúmeros trabalhos têm sido publicados na busca do estabelecimento de uma dose de irradiação para a descontaminação do papel que seja eficaz e não cause danos ao suporte. A radiação ionizante pode ser usada para descontaminação em massa dos itens do patrimônio cultural embora os conservadores e restauradores sejam ainda cautelosos quanto à utilização da técnica por conta da possibilidade de aceleração da degradação dos constituintes do papel induzida pela radiação (MOISE *et al.*, 2012; MARUŠIĆ *et al.*, 2019; BONIEK *et al.*, 2017). Sendo assim, torna-se relevante um estudo nessa área de forma a se estabelecer uma dose segura e eficaz para a descontaminação de uma determinada obra ou acervo que leve em conta os diversos aspectos e critérios que devem ser considerados como: a natureza da obra (suporte e materiais depositados); as espécies fúngicas que estão causando a biodeterioração; as técnicas de tratamento disponíveis e sua aplicabilidade diante da obra e recursos em questão; a mínima intervenção, respeitando os aspectos éticos de originalidade e autenticidade da obra; e a destinação do tratamento, ou seja, se é para fins de desinfecção ou de esterilização.

A radiação gama é um tipo de radiação ionizante que é absorvida pelo material biológico agindo diretamente na célula e atingindo as moléculas de ácido nucléico. Estas são ionizadas e excitadas podendo conduzir a mudanças biológicas e até a morte celular. No entanto, as doses de radiação baixas podem não ser eficientes para algumas espécies de fungos que se mostram resistentes à radiação gama, principalmente aos que possuem capacidade metabólica de produzir pigmento melanina que é um tipo de pigmento preto que acumula dentro dos micélios e os protegem contra os raios UV e contra a radiação ionizante. Além disso, pesquisas mostraram que algumas espécies de fungos radiotróficos usam a melanina para converterem a radiação gama em energia química para crescimento (DADACHOVA *et al.*, 2007; SALEH *et al.*, 1988; DADACHOCHA; CASADEVAL, 2008). Sendo assim, doses de radiação mais elevadas devem ser estudadas e empregadas no caso do isolamento de espécies mais resistentes das obras de arte, garantindo uma total desinfecção da obra, salvaguardando sua originalidade e aumentando o tempo de vida sob as condições de estocagem apropriadas.

O meio físico no qual se “imprime” uma informação no documento deve ser investigado pois o uso de tintas ferrogálicas causam a corrosão do suporte por meio de uma complexa superposição de diferentes processos. As tintas ferrogálicas, usadas em documentos históricos, eram produzidas de maneira artesanal e não estequiométrica o que resultava em um produto com baixo valor de pH e, muitas vezes com excesso de um dos ingredientes tais como ácidos e íons de metais de transição, especialmente de Fe e Cu. De acordo com a literatura, a corrosividade dessas tintas ocorre por meio de dois processos principais: a hidrólise acelerada da celulose (principal constituinte do papel), por conta da acidez da tinta; e a oxidação acelerada da celulose, por conta da presença de íons Fe^{2+} que agem como catalisadores. Sendo assim, o papel sofre danos acelerados de envelhecimento somados à própria corrosão intrínseca da tinta (oxidação dos íons Fe^{2+} em excesso) o que causam migração da tinta entre as folhas e no verso das mesmas, halos e buracos no papel com prejuízo irreversível ao documento (COSTA *et al.*, 2015). Diante disso, a busca por estratégias de intervenção nesses papeis contendo tintas ferrogálicas precisam ser investigadas e aplicadas. Tais estratégias incluem, nesta ordem: 1. Análise dos elementos presentes em excesso na tinta ferrogálica que possam estar acelerando os processos de degradação da celulose e para tal, a técnica da fluorescência de raio-X é muito utilizada como ferramenta útil na análise

desses elementos e, 2. Tratamento dos suportes com fitato de cálcio para remoção do excesso dos íons Fe^{2+} , interrompendo os processos oxidativos de degradação da celulose e a corrosão da tinta propriamente dita.

Essa análise diagnóstica das tintas usadas em documentos históricos com o intuito de identificar os agentes responsáveis pela biodegradação e deterioração tem sido objeto de estudo de muitos profissionais envolvidos com a conservação e restauração do patrimônio histórico cultural. Técnicas não destrutivas, que preservam a integridade da amostra, são empregadas em diversos trabalhos. Dentre elas, a técnica de fluorescência por raio-X (FRX) tem sido muito útil na detecção de elementos traços de metais presentes em um suporte. Estudos conduzidos por FAUBEL *et al.* (2007), na área de preservação do patrimônio cultural, determinou a partir da técnica de FRX, os metais presentes na tinta ferrogálica utilizada no documento histórico, concluindo que ela estava contaminada com magnésio, cobre e zinco. Do ponto de vista da conservação, sabe-se que o alto conteúdo de cobre na tinta aumenta a possibilidade da corrosão ocorrer o que prejudica ainda mais os processos de degradação e biodeterioração. Outro trabalho conduzido por URSIC *et al.* (2006) também utilizou a técnica não destrutiva de emissão de raio-X induzido por prótons (PIXE) para a pesquisa da composição elementar das tintas ferrogálicas em documentos históricos concluindo que esse método é adequado na determinação quantitativa da concentração dos elementos presentes na tinta.

Uma vez que a deterioração do papel é um processo inevitável, o estudo dos seus mecanismos de degradação se faz necessário visto que tais processos precisam ser interrompidos e/ou retardados por meio de ações de intervenção que garantam a longevidade do objeto de valor histórico cultural. No entanto, o processo de envelhecimento natural do papel é muito lento para permitir a observação das mudanças que causam em longo prazo. Por isso, métodos de envelhecimento artificial ou acelerado podem ser aplicados já que os resultados que são gerados permitem uma aproximação confiável do envelhecimento natural para a previsão da longevidade do papel e permite o estudo dos efeitos esperados dos tratamentos de conservação a serem realizados. Tal técnica já tem sido bastante empregada em diversos estudos, como visto no trabalho de COSTA *et al.* (2013), onde foram realizadas investigações arqueométricas no envelhecimento natural e artificial (térmico) de amostras contendo tintas ferrogálicas obtidas a partir de diferentes fontes de taninos.

Dentro de todo esse contexto, deve-se atentar para a manutenção a longo prazo de materiais à base de suportes ligno-celulósicos, com o desenvolvimento de estudos que relacionem parâmetros ambientais/climáticos com a permanência de materiais à base de celulose. A manipulação e armazenamento inadequados podem gerar ainda mais danos químicos que propiciam ataques bioquímicos por meio de intervenção direta nas fibras do papel (celulose, hemicelulose) ou nos seus suportes (amido, gelatina) visto que a umidade relativa (UR) e temperatura (T), também contribuem para a deterioração.

Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo estudar a biodeterioração, causada por bactérias e fungos, de obras do patrimônio cultural com base celulósica e o emprego de uma metodologia segura e eficaz que possa ser utilizada no monitoramento e combate aos fungos, que são os principais responsáveis pela biodeterioração. Além disso, empregar a técnica não destrutiva de FRX para caracterizar os documentos e monitorar os tratamentos de conservação empregados nesses documentos de acervos histórico-culturais contendo tintas ferrogálicas.

Objetivos Específicos

- Verificar a relação entre a presença de bactérias e fungos com os processos de biodeterioração em materiais celulósicos;
- Qualificar através de técnicas de microbiologia clássica os principais grupos microbianos encontrados em acervos e documentos relevantes do patrimônio histórico;
- Identificar, a partir das técnicas de biologia molecular, os principais gêneros destes grupos microbianos envolvidos na biodeterioração;
- Utilizar a técnica da radiação gama para o combate aos fungos presentes, visando identificar gêneros ou espécies resistentes a este tratamento;
- Estabelecer a dose de radiação necessária para eliminar os fungos levando em conta a resistência de alguns à radiação, a natureza do suporte e o objetivo do tratamento da obra de arte.

- Verificar a composição das tintas ferrogálicas presentes e sua relação com a aceleração dos processos de biodeterioração, utilizando a técnica não destrutiva de FRX, visando propor o tratamento, em grupos, de papéis contendo essas tintas, com soluções quelantes de fitato de cálcio.
- Produzir conhecimento na área de preservação de acervos, relacionando técnicas arqueométricas com procedimentos clássicos da Engenharia Química e da Microbiologia.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biodeterioração do patrimônio histórico e cultural

A maior parte dos livros e documentos que compõem o patrimônio histórico documental da humanidade se conserva nos arquivos e bibliotecas; instituições que têm entre suas funções fundamentais a preservação dos materiais que nelas se guardam e o compromisso social de transmiti-los para o futuro. Tais objetos se caracterizam não apenas por sua grande quantidade e diversidade, mas também por se constituírem basicamente por macromoléculas orgânicas, que são muito susceptíveis aos processos de biodeterioração. Uma importante parte do inventário do patrimônio cultural é preservada em objetos feitos dos mesmos materiais biodegradáveis, incluindo madeiras, couros, tecidos e papéis. Perdê-los significa perder uma parte da identidade da humanidade (CALLOL, 2013; PONTA, 2008).

Os microrganismos ocupam praticamente qualquer lugar do nosso planeta. O Patrimônio Histórico não é uma exceção e alguns microrganismos são capazes de proliferar sobre obras de arte colonizando-as e causando efeitos negativos. Durante seu desenvolvimento podem dar lugar a transformações estéticas, físicas e químicas do substrato colonizado originando uma progressiva deterioração desse patrimônio (GONZÁLEZ; SÁINZ-JIMÉNEZ, 2008).

A biodeterioração pode ser definida como qualquer alteração não desejada em um material causada pelas atividades vitais dos organismos (MELO *et al.*, 2019). Segundo HUECK (1965), são mudanças indesejáveis nas propriedades de um material causada pela atividade biológica dos organismos, ou seja, é o conjunto de danos que ocorrem aos objetos, provocados por agentes biológicos. A microbiodeterioração consiste nos processos de biodeterioração provocados por microrganismos. Esses processos podem ser executados por uma ampla gama de microrganismos, entre eles bactérias, actinomicetes, leveduras, fungos, algas, líquens e musgos (CALLOL, 2013). É a biodegradação de diferentes materiais por diferentes tipos de microrganismos, alterando as suas características iniciais.

Outro termo de uso comum é o de biodegradação. Embora nenhuma definição formal tenha aceitação geral, entende-se a biodegradação como o

aproveitamento, pelo homem, das habilidades de decomposição dos organismos para tornar um material residual mais útil ou aceitável. Ambas as definições envolvem a humanidade, sendo de maneira negativa ou prejudicial no caso de biodeterioração, e de maneira positiva ou útil, no caso de biodegradação. Ambas as definições também envolvem materiais que são de qualquer natureza, com exceção dos organismos vivos, usados pela humanidade. Todos os materiais (e processos) tem um valor intrínseco e, portanto, há uma importante dimensão econômica para a biodeterioração (ALLSOPP *et al.*,2004).

A diferença entre biodegradação e biodeterioração também foi reportada por NUNES *et al.* (2013). De acordo com os autores, a biodegradação diz respeito ao processo de decomposição de materiais (sobretudo de origem orgânica) por ação de seres vivos enquanto que a biodeterioração, como já foi definida é “qualquer mudança indesejável nas propriedades de um material causada pelas atividades vitais dos organismos”.

Mediante todo esse contexto, a biodeterioração é um tópico de crescente preocupação e é particularmente relevante no contexto da conservação do patrimônio cultural, uma vez que as obras de arte e os monumentos fornecem nichos ecológicos para a colonização de microrganismos diversificados na saúde humana e na preservação da qualidade do ar. Apesar de todo o conhecimento adquirido nos últimos anos, as normas estabelecidas atualmente e os limiares de contaminação aceitos têm concentrado um foco importante na saúde humana e na preservação da qualidade do ar. No entanto, ainda não são suficientes ou adequadamente aplicados para a preservação do patrimônio cultural (CARVALHO *et al.*, 2018).

A arte, em suas diferentes formas, tais como as pinturas, esculturas e documentos escritos, estão expostas a agentes de deterioração físicos, químicos e biológicos. Principalmente feitos de matérias primas biodegradáveis, os objetos de arte podem ser alterados e destruídos de acordo com suas características intrínsecas e estruturais e devido aos efeitos das condições ambientais tais como umidade e temperatura. As matérias primas orgânicas são geralmente bons substratos para insetos, bactérias e fungos, o que torna a biodeterioração uma questão central para estudiosos e curadores de arte (NUNES *et al.*, 2013).

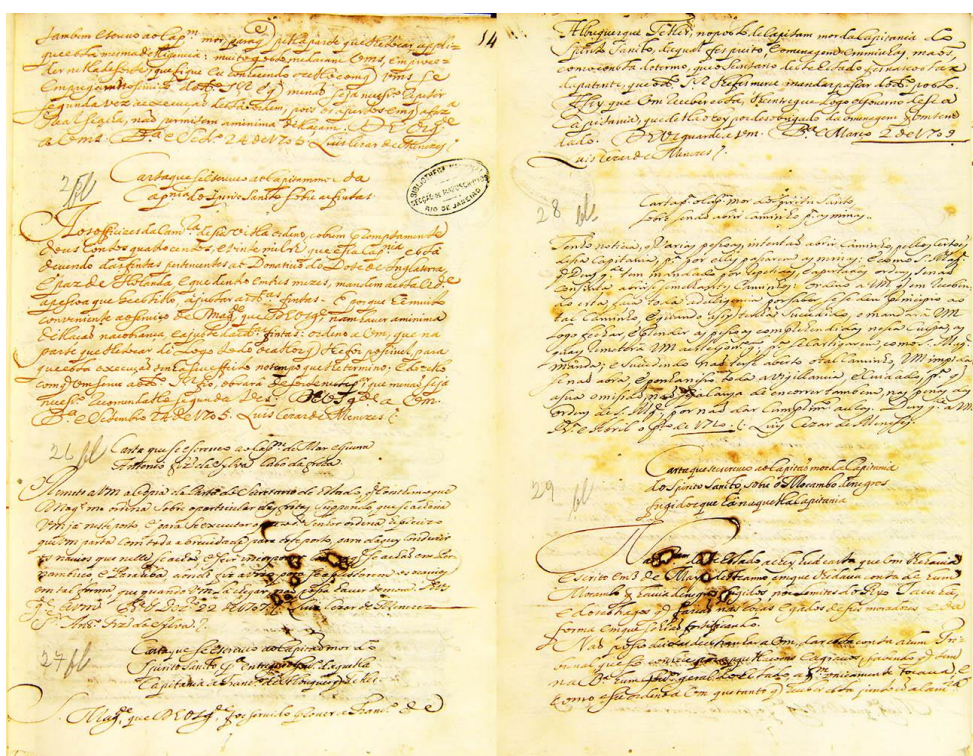
Sendo assim, um dos principais problemas enfrentados pelos restauradores-conservadores para a preservação de acervos documentais são os danos causados

pela ação de insetos xilógrafos e microrganismos (FRANÇA; BARBOZA, 2010). Para eles, polímeros naturais são nutrientes. Água, oxigênio, gases poluentes da atmosfera, ácidos (papel durante seu envelhecimento), temperatura e luz são outros agentes agressivos que induzem modificações estruturais. Os próprios fatores físicos e químicos podem independentemente agir e/ou sinergeticamente interferir na biodegradação (PONTA, 2008).

A Figura 1 mostra um exemplo de documento deteriorado em função de vários fatores de natureza ambiental e biológica.

A biodeterioração de objetos constituídos por materiais orgânicos, tais como papel, madeira, têxteis, couro, pergaminho e outros, é realizada pelos microrganismos heterotróficos, os quais inclusive são capazes de degradar enzimaticamente as macromoléculas constituintes de tais suportes. No caso de objetos de origem inorgânica, tais como pedras, esculturas ao ar livre, cerâmicas, vidros e metais, é levada a cabo por musgos, plantas superiores e microrganismos autotróficos, que possuem as potencialidades metabólicas específicas para executar determinadas reações (CALLOL, 2013).

Figura 1 - Cartas do Século XVIII com sinais de deterioração ambiental e biológica



Fonte: NEVES, 2017.

Estudos apontam que microrganismos tais como bactérias e fungos são importantes agentes na degradação de documentos de arquivos e bibliotecas. Isso porque o pequeno tamanho da bactéria permite que elas penetrem entre as fibras do polímero permitindo-as uma forma agregação ao substrato e consequente colonização. Algumas bactérias podem acelerar o processo de biodeterioração devido à excreção de substâncias específicas, tais como enzimas celulolíticas e ácidos orgânicos que reduzem o pH, promovendo o ataque de novos microrganismos (NUNES *et al.*, 2013).

A atividade de insetos e fungos está diretamente relacionada com as potencialidades metabólicas, com a composição química dos materiais constituintes dos objetos, com as características climatológicas da zona ou região onde estejam localizadas as instituições e seu ambiente interior, assim como o trabalho preventivo que nelas se desenvolva. Entre as características dos materiais que exercem importante influência na biodeterioração estão: sua composição e natureza, seu conteúdo de água, o pH e a presença de impurezas. Os limites de concentração de íons de hidrogênio indicam que os níveis ácidos (4,0 a 6,0) favorecem o desenvolvimento de fungos, enquanto os básicos (8,0 a 9,5) propiciam o crescimento das bactérias (CALLOL, 2013).

A biodeterioração de arquivos e livros é a mais frequentemente fonte de degradação detectável em países localizados em áreas tropicais e subtropicais (AREA; CHERADAME, 2011). Nos países da América do Sul, que possuem um clima tropical com alta temperatura e alta umidade relativa, é muito comum encontrar objetos de arte com fungos. (RIZZO *et al.*, 2002). A umidade relativa do ar constitui um dos fatores mais importantes no desenvolvimento do processo de biodeterioração, já que todas as reações metabólicas requerem um ambiente aquoso. Níveis superiores a 65% propiciam o desenvolvimento de microrganismos e de seus esporos. Além da umidade, a temperatura também é um fator fundamental no desenvolvimento e na atividade dos microrganismos uma vez que o desenvolvimento e a reprodução dos mesmos se baseiam em um conjunto de reações metabólicas inter-relacionadas que requerem uma fonte de energia calorífica obtida do ambiente e transformada em energia celular (CALLOL, 2013).

Outros fatores do meio ambiente que possuem influência no processo de biodeterioração são a luz, o oxigênio e a ventilação. As radiações ultravioletas, assim como as ionizantes, possuem ação que pode ser letal ou mutagênica,

segundo o organismo e a dose recebida. A luz pode acelerar a esporulação dos fungos. Quanto ao oxigênio, depende do tipo de microrganismo e a ventilação está relacionada à circulação de ar e à umidade relativa existente. Em geral, a circulação de ar favorece à rápida evaporação e à secagem dos materiais, evitando assim a acumulação de água no ambiente e diminuindo a probabilidade de germinação dos esporos (CALLOL, 2013).

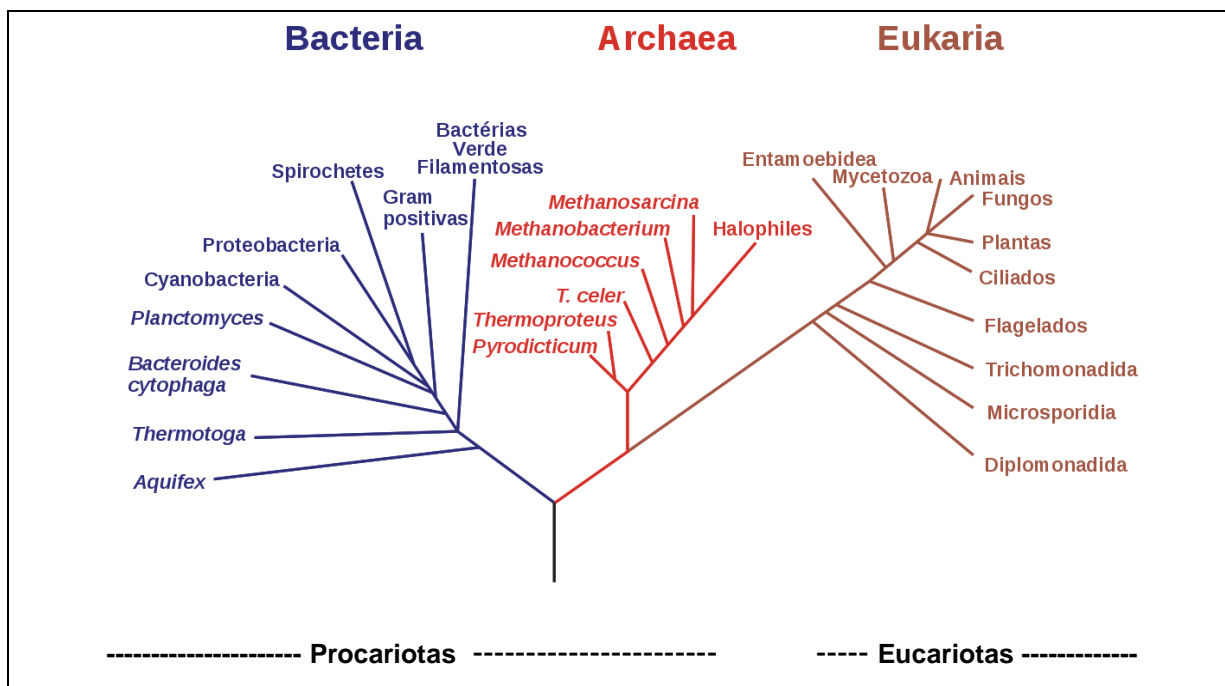
Mediante toda essa problemática, é necessário tomar ações imediatas quando o papel é o substrato de documentos e arquivos interessantes ou de livros raros. Para prevenir e proteger a conservação das coleções deve ser aplicado um enfoque multifatorial que avalie o risco de desenvolvimento de microrganismos no ar e o risco de infecção e/ou infestação nos objetos de valor cultural. Dessa forma, em ambos os casos, a maneira mais adequada de agir nesse sentido deve estar focada em três aspectos: I. identificar os organismos que produzem a biodeterioração, realizando um adequado diagnóstico do problema; II. definir um sistema de controle – erradicação- onde devem ser aplicados procedimentos não tóxicos e não destrutivos, interrompendo o processo destrutivo em andamento e restaurando o objeto de valor cultural a fim de se cumprir seu objetivo relevante; e III. elaborar um plano estratégico de conservação e manutenção a longo prazo que sirva de base para estabelecer um programa de conservação preventiva a longo prazo (MAGAUDDA, 2004; VALENTÍN, 2012).

1.2 Microrganismos envolvidos em processos de biodeterioração

De maneira geral, os microrganismos apresentam grande diversidade e versatilidade metabólica além de elevada diversidade específica. A classificação atual das formas de vida se baseia em sequências de DNA, geralmente da subunidade pequena do gene de RNA ribossômico. A análise dessas sequências permite dividir, dentro da classificação taxonômica moderna, o mundo dos organismos vivos em três grandes domínios: Bacteria, Archae e Eukarya. Os microrganismos compreendem a Bacteria, Archaea e a grande maioria dos Eukarya. Os seres macroscópicos somente estão representados nos extremos de um par de

ramos: Animais e Fungos, conforme ilustrado na Figura 2 (GONZÁLEZ; SÁINZ-JIMÉNEZ, 2008).

Figura 2 - Árvore filogenética das formas de vida



Fonte: GONZÁLEZ; SÁINZ-JIMÉNEZ, 2008.

O prejuízo aos objetos do patrimônio cultural é um processo complicado, causado principalmente por processos químicos e físicos desencadeados por atividades dos organismos envolvidos. O crescimento microbiano na superfície dos materiais pode causar rachaduras, pulverização e deslocamentos de materiais constituintes que resultam em enfraquecimento e até completa destruição da obra (FAROOQ *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2018). A biodeterioração tem sido muito discutida, mas seus impactos negativos têm sido subestimados na maioria das vezes por conta das poucas investigações nos mecanismos envolvidos no passado. Acreditava-se que os processos químicos eram os principais fatores responsáveis pela destruição, mas agora, as percepções têm mudado e tem se admitido que bactérias, arqueias e fungos causam sérias destruições no patrimônio cultural como em múmias, em livros e pinturas, através das suas atividades enzimáticas, processos metabólicos e corrosão (STERFLINGER; PIÑAR, 2013).

1.3 Biodeterioração causada por Bactérias

As bactérias também se encontram em ambientes de museus e salas de armazenamento, podendo contribuir ativamente na biodeterioração de acervos e patrimônio histórico cultural. Na Tabela 1, relacionam-se os gêneros bacterianos encontrados como contaminantes de arquivos; as fontes de isolamento; os metabólitos que produzem e suas atividades deterioradoras (CALLOL, 2013).

Tabela 1 – Bactérias contaminantes encontradas em arquivos e bibliotecas

Gênero	Fonte de Isolamento	Metabólitos que produz	Atividade deterioradora
<i>Acinetobacter</i>	Papel, ambiente	Protease, amilase	Degradação dos componentes do suporte
<i>Bacillus</i>	Materiais orgânicos, ambiente	Amilase, celulase, ácidos orgânicos	Manchas violáceas, acidificação e deterioração das fibras
<i>Cellvibrio</i>	Papel, cartão, têxteis	Protease, celulase, ácido acético	Descoloração, acidificação do suporte
<i>Lactobacillus</i>	Materiais orgânicos	Amilase, celulase, ácido láctico	Acidificação do suporte
<i>Micrococcus</i>	Materiais orgânicos, ambiente	Protease, lipase, celulase, ácidos orgânicos	Descoloração e acidificação do suporte
<i>Pseudomona</i>	Materiais orgânicos	Materiais orgânicos, Glicose Oxidase [GOX], lipase, protease, ácidos orgânicos.	Manchas pigmentares amarelas, descoloração, acidificação
<i>Staphylococcus</i>	Papel, têxteis, ambiente	Ácidos orgânicos	Manchas amarelas e creme, acidificação
<i>Streptococcus</i>	Papel, têxteis, ambiente	Protease, ácido láctico e acético	Acidificação e degradação do suporte

Fonte: CALLOL, 2013.

Em trabalho recentemente publicado por ZHANG *et al.* (2019) foram reportadas algumas reações bioquímicas e mecanismos envolvidos na biodeterioração de patrimônio cultural mundial feitos de pedra sob condições climáticas tropicais, como o Khmer Angkor no sudoeste da Ásia e o Maia e Inca na América. Em regiões tropicais é alta a disponibilidade de água (umidade) e nutrientes minerais suprindo muito bem o crescimento e o metabolismo dos microrganismos fototróficos e se estabelecendo bem a colonização microbiana na superfície das pedras. A luz do Sol provê a energia para que os seres fotossintetizantes assimilem o CO₂ enriquecendo o material celular. As bactérias, como um domínio muito diversificado, têm seu papel na produção de ácidos

fermentativos e também na ciclagem de nutrientes, especificamente assimilação de carbono, produção de cor e pigmento e deposição nas superfícies de monumentos de arenitos causando a destruição negativa através de sua atividade metabólica. O mecanismo responsável pela destruição do arenito inclui a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos, pela oxidação de compostos orgânicos e amônia ou enxofre como as maiores reações bioquímicas. Microrganismos fermentativos são microaerófilos e convertem açúcares ao ácido orgânico intermediário como produto final para obter energia para o crescimento. Outras bactérias, como *Mycobacterium* spp. por exemplo, foram isoladas e identificadas pela produção de acidez através da oxidação de enxofre elementar do Angkor Wat em Camboja. Tanto as bactérias quanto os fungos contribuem para a capacidade bioquímica de destruição de monumentos de arenito do Cambodia devido a sua larga ocorrência e abundância. Suas capacidades bioquímicas foram verificadas pela detecção da acidez. A oxidação do enxofre é um processo bioquímico importante que contribui para o ciclo de enxofre e também para a acidez, que destrói pedras e concreto. Além disso, o ciclo de enxofre contribui significativamente para a corrosão de metais pelas bactérias redutoras de sulfato.

Por estarem presentes em superfícies expostas de murais, pedras e esculturas, as bactérias causam mudança de cor atacam quimicamente os materiais através dos metabólitos. As bactérias fototróficas derivam sua energia a partir da luz do sol enquanto os autotróficos derivam sua energia a partir de reações redox, enquanto o ácido sulfídrico (H_2S) é oxidado pelas bactérias oxidantes de enxofre para formar ácido sulfúrico (H_2SO_4). O processo de nitrificação é conduzido pelas bactérias oxidantes de amônia. Neste processo a amônia é oxidada a nitrato sob condições aeróbias. Bactérias quimiolitototróficas, algumas vezes presentes na superfície das pedras, liberam diferentes tipos de ácidos como o nítrico, sulfúrico e nitroso, que mudam o pH local e causam deterioração (KAKAKHEL *et al.*, 2019).

Apesar de haver alguns estudos na área de biodeterioração envolvendo bactérias presentes em esculturas e monumentos feitos de pedra e expostos ao tempo, poucos são os trabalhos que relatam de maneira relevante a contribuição das bactérias na biodeterioração de objetos de museu de origem orgânica e documentos feitos de papel. Diversos trabalhos relatam que os fungos são, de fato, os principais microrganismos responsáveis pelos processos de biodeterioração.

1.4 Biodeterioração causada por Fungos

Sendo os fungos os microrganismos de maior relevância nos processos de biodeterioração já relatados em diversos trabalhos, é importante conhecer os aspectos relacionados à sua atividade metabólica que prevalecem na biodegradação dos materiais.

São reconhecidos três principais grupos de fungos: os bolores, as leveduras e os cogumelos. Os fungos desempenham um papel considerável na cultura humana e evolução da sociedade por milhares de anos. Leveduras foram usadas para produção de cervejas pelos egípcios, celtas e teutões, embora não tivessem conhecimentos dos processos microbiológicos. Os cogumelos provavelmente serviram de alimento para os caçadores desde o início da humanidade e os cogumelos tóxicos como *Amanita muscaria*, e espécies de *Psilocybe* foram usadas como alucinógenos para rituais culturais da Sibéria até a América do Sul. Os efeitos psicodélicos do LSD 45 derivado da *Claviceps purpureum* influenciou autores – Ernest Junger, Aldous Huxley – e de alguma forma o processo de revolução cultural da década de 1960. A real revolução dos inestimáveis benefícios foi a descoberta do primeiro antibiótico por Flemming em 1930 que lançou as bases para uma abordagem terapêutica completamente nova para salvar vidas (STERFLINGER, 2010).

Em contraste aos numerosos efeitos benéficos, os fungos também possuem o seu “lado sombrio”: micotoxinas, patogenicidade, alérgenos, deterioração de alimentos e biodeterioração de materiais. A biodeterioração de casas foi mencionada na Bíblia como branca, vermelha ou, verde (“leprosa” ou “irritante”) em tijolos, argila e madeira (Velho Testamento, terceiro livro de Moisés, capítulo 14 versículos de 33-57). Hoje, a contaminação fúngica é um problema crescente não apenas em casas ou espaços de trabalho de forma que a prevenção do crescimento dos fungos nos museus assim como o desenvolvimento de medidas de tratamento apropriadas para objetos contaminados é um desafio para restauradores, curadores de museus e arquitetos (MADIGAN *et al.*, 2004; STERFLINGER, 2010).

O tamanho relativamente grande das células fúngicas distingue o grupo de forma muito particular. Todos os fungos são heterotróficos e produzem uma grande

variedade de metabólitos: proteínas celulares e materiais de reserva, ácidos orgânicos, enzimas, pigmentos e substâncias antibióticas. São estruturas frequentemente pluricelulares (ainda que também existam unicelulares), com núcleo diferenciado, mecanismos de reprodução (assexual em certas espécies e sexual em outras), e metabolismo complexo e versátil, que lhes facultam utilizar uma ampla gama de substâncias como fonte de alimento (MADIGAN *et al.*, 2004).

Os fungos são os mais importantes agentes de biodeterioração em museus, salas de armazenamento, em livrarias, coleções e estúdios de restauração. Vivem em uma grande variedade de ambientes, porém a maioria prefere os lugares úmidos, ainda que alguns possam resistir a condições de secura. Sendo assim, os fungos são capazes de viver em ambientes com baixa atividade de água (a_w), são perfeitamente adaptados a ambientes internos, e prosperam em nichos microclimáticos causados pela condensação, falta de ventilação, ou retenção de água por materiais higroscópicos. Os fungos estragam obras de arte esteticamente, mecanicamente, quimicamente e por degradação dos compostos orgânicos (Figura 3) (CARVALHO, 2018; CALLOL, 2013).

Figura 3 – Crescimento do fungo *Cladosporium* sp. (a e b) em uma pintura de parede moderna (Karl Weiser 1952, Weyregg, Austria)



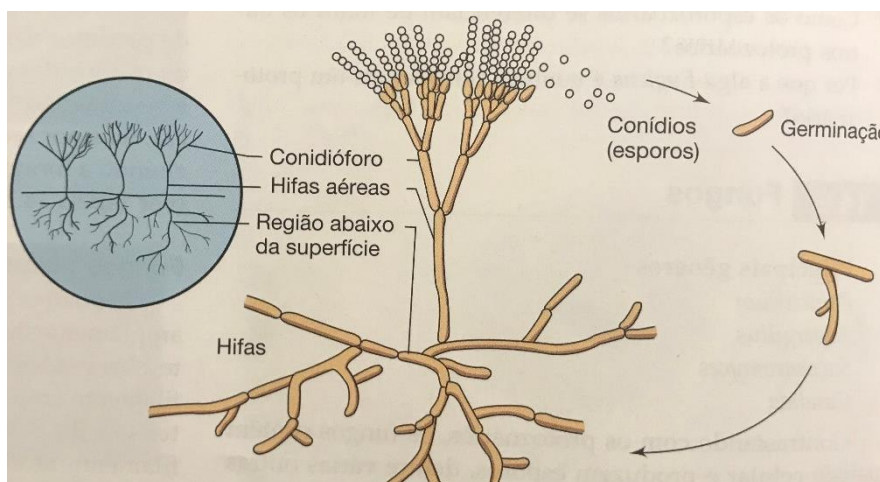
Fonte: STERFLINGER; PIÑAR, 2013.

Os principais microrganismos que deterioram coleções baseadas em papel são os fungos filamentosos, também chamados de bolores. Encontram-se amplamente disseminados na natureza. Cada filamento cresce principalmente na extremidade, pela extensão da célula terminal (Figura 4). A reprodução se realiza, habitualmente,

por esporos, que se separam com facilidade do micélio paterno. São pequenos e facilmente transportados pelo vento e por outros agentes. Essa facilidade de disseminação é o fator principal para a colonização pelos fungos nos ambientes apropriado. Eles crescem no papel e induzem vários processos de deterioração físicos e químicos devido à excreção de substâncias metabólicas que interagem com o substrato e o desenvolvimento de estruturas fúngicas que alteram a organização estrutural do papel. Os metabólitos excretados incluem corantes, enzimas, ácidos orgânicos (oxálico, fumárico, acético e láctico) e inorgânicos, agentes quelantes e outras substâncias químicas. Tais ácidos se depositam sobre o suporte, acidificando-os e debilitando-os. Dessa forma, além das alterações cromáticas, produzem-se danos químicos (MADIGAN *et al.*, 2004; CALLOL, 2013; MELO, 2019).

Além dos problemas causados pela produção de alguns metabólitos secundários tóxicos (e algumas vezes pigmentados), os biocontaminantes fúngicos são especialmente problemáticos devido a suas características morfológicas (capacidade de penetração das hifas) o que o permite se alimentar de quase todos os substratos e seus caminhos de nutrição eventualmente conduzem à secreção de enzimas (SCEZEPANOSWSKA; CAVALIERE, 2000). As hifas podem penetrar profundamente nos materiais, resultando em perda de material devido à corrosão ácida, degradação enzimática e ataque mecânico. Conforme a degradação biológica vai acontecendo, mais de 200 fungos podem ser detectados. A partir de uma simples célula, eles são capazes de proliferar e produzir o micélio que é capaz de se desenvolver na maioria das superfícies sólidas. Entretanto, eles preferem substratos orgânicos tais como celulose e até gelatina, as quais são fontes de alimento para eles se desenvolverem. Para crescerem, os fungos produzem enzimas que irão atacar quimicamente as fibras do papel e clivar a celulose. Entretanto, esse não é o único problema. O metabolismo do fungo produzirá resíduos ácidos que irão contribuir para a degradação do papel. A acidificação é, por si só, um mecanismo de degradação da celulose. Como resultado, o ataque fúngico irá aumentar a fragilidade e os pontos coloridos na superfície do papel. O problema é a incrível resistência dos esporos que são a origem do desenvolvimento dos fungos. Eles podem ser inertes e ficarem adormecidos por anos e serem reativados em condições mais favoráveis (temperatura e umidade relativa). Os prejuízos são irreversíveis e, em pouco tempo, podem causar completa destruição dos documentos (AREA; CHERADAMA, 2011).

Figura 4 - Diagrama de ciclo de vida de bolores.



Fonte: MADIGAN *et al.*, 2004.

Por conta da grande diversidade de exoenzimas produzidas pelos fungos – celulases, glucanases, lacases, fenolases, queratinases, mono-oxigenases, dentre outras. e notável habilidade de crescer em baixos valores de a_w (atividade de água), a preservação de objetos de museus está inevitavelmente conectada com a prevenção, monitoramento e tratamento dos fungos em objetos contaminados (FRANÇA; BARBOSA, 2010).

Os mais importantes gêneros de fungos encontrados em museus são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* o gênero de levedura *Rhodotorula* com uma alta afinidade aos ambientes osmóticos. Alguns são chamados de 'leveduras negras' e fungos microcoloniais, como *Exophiala*, *Aureobasidium*, *Coniosporium* e *Wallemia* que são frequentemente encontrados em associação com materiais de alta osmolaridade (pinturas de paredes) ou contendo hidrocarbonetos, silicones ou ceras parafínicas. Sob o ponto de vista da biodeterioração, os fungos em patrimônio histórico podem ser divididos em dois grupos funcionais principais: 1. Os fungos oportunistas que crescem em praticamente todos os tipos de materiais, se existir umidade suficiente e 2. Os "patogênicos reais" que são capazes de degradar materiais específicos de

obras de arte, como os fungos celulíticos em papel e queratolíticos em couros, cabelos e penas (STERFLINGER; PINZARI, 2011).

Os fungos colonizadores de ambientes internos são divididos em três categorias baseados na atividade de água (a_w), ou seja, na quantidade de água livre no substrato. Colonizadores primários ($a_w < 0,80$; umidade relativa $< 80\%$) são muitas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, *Paecilomyces* spp., e *Wallemia sebi*. Colonizadores secundários ($0,80 < a_w < 0,90$; $80 < \text{umidade relativa} < 90\%$) inclui espécies de *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhizopus*. Colonizadores terciários, que preferem alto conteúdo de água ($a_w > 0,90$; Umidade relativa $>90\%$), inclui espécies de *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Exophiala*, *Phoma*, *Ulocladium* e *Fusarium* (MARUŠIĆ *et al.*, 2019).

Os objetos também influenciam no desenvolvimento de comunidades fúngicas por sua composição química e biodegradabilidade para espécies com diferentes exo-enzimas. Por exemplo, na conservação do papel, algumas espécies fúngicas produzem enzimas degradativas que hidrolisam materiais celulósicos. Particularmente o fungo ativo celulolítico inclui espécies de *Cladosporium* comumente encontradas em ambientes internos e externos. Além da biodegradação, manusear o papel contaminado por fungo pode causar sérios riscos à saúde como o *Cladosporium* spp., por conta de seu potencial alergênico. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* produzem micotoxinas ou podem causar infecções oportunistas em humanos (STERFLINGER, 2010; STERFLINGER; PINZARI, 2011; MARUŠIĆ *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de fungos em museus está relacionado com o clima interno, a quantidade de nutrientes disponíveis – a partir da atmosfera e dos materiais propriamente ditos – e também pelos intervalos de limpeza dos museus. O clima interno como indicado pela temperatura, umidade relativa e pela umidade específica é o mais importante fator para o crescimento fúngico. Normalmente se desenvolvem em pH de 4-6, umidades relativas superiores a 70% e temperaturas bem elevadas, próximas aos 30°C sendo que as oscilações desses favoreçam muito a germinação dos esporos fúngicos. Dependendo do clima nos museus e salas de armazenamento a diversidade fúngica é restrita a poucas espécies xerofílicas e xerotolerantes tais como *Eurotium* sp., *Aspergillus* sp., ou *Wallemia* sp.. Em museus, a taxa de 55% de umidade relativa é geralmente considerada como limite para o crescimento fúngico e também o controle climático é ajustado para abaixo desse

valor. De fato, os fungos que são capazes de sobreviver na umidade relativa de 55% são raros e restritos a ambientes extremos tais como desertos quentes e frios. Além disso, a influência das correntes de ar através das portas, aquecimento pela luz do sol, mudanças diárias no gradiente de temperatura assim como o isolamento e exposição da construção são importantes no desenvolvimento dos fungos. Em climas moderados e úmidos as comunidades fúngicas são dominadas por hifomicetos incluindo espécies de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aureobasidium* e *Phoma* (CALLOL, 2013; STERFLINGER, 2010). Certas espécies preferem os amidos, as gomas e as proteínas facilmente degradáveis, como a base do papel e algumas tintas de desenho; enquanto outras são capazes de degradar a celulose e outros polímeros constituintes dos objetos de valor histórico-artístico. A Tabela 2 apresenta alguns dos gêneros fúngicos encontrados como contaminantes de arquivos.

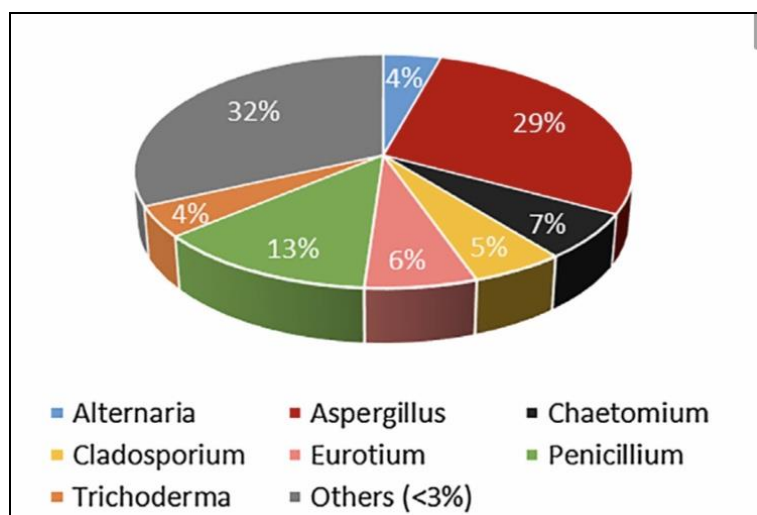
Tabela 2 – Alguns fungos contaminantes em arquivos e bibliotecas

GÊNERO	FONTE DE ISOLAMENTO	METABÓLITOS	ATIVIDADE DETERIORADORA
<i>Alternaria</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Protease, Amilase	Manchas micelianas pardas, degradação do suporte
<i>Aspergillus</i>	Materiais orgânicos, ambiente	Enzimas, ácidos orgânicos	Manchas micelianas, degradação e acidificação
<i>Chaetomium</i>	Papel, cartão, peles, fotografias	Celulase, ácidos acético e láctico	Manchas pigmentares em tons creme e rosa, acidificação
<i>Cladosporium</i>	Materiais orgânicos, fitas magnéticas, ambiente acético	Protease, ácido láctico	Descoloração e acidificação do suporte. Manchas micelianas azul-violeta e/ou rosa
<i>Fusarium</i>	Materiais orgânicos, ambiente.	Celulase, ácidos orgânicos	Manchas rosas, descoloração, danos às fibras
<i>Mucor</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Protease, ácidos orgânicos	Manchas micelianas pardas e amarelas, acidificação
<i>Penicillium</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Enzimas e ácidos orgânicos	Manchas miceliares verdes, degradação e acidificação
<i>Rhizopus</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Enzimas e ácidos orgânicos	Manchas micelianas pardas, escuras, pigmentos, acidificação
<i>Sporotrichum</i>	Papel, têxteis e ambiente	Celulase, lignase, protease e ácido	Manchas pardas escuras, afetam a fibra celulósica

<i>Trichoderma</i>	Papel, cartão e madeiras	Celulase, ácidos celobiótico e acético	Manchas micelianas verdes, degradam a fibra
--------------------	--------------------------	--	---

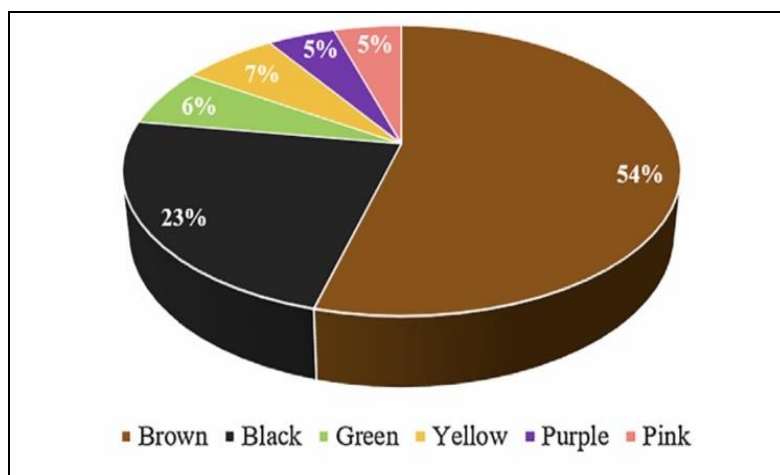
Fonte: CALLOL, 2013.

Figura 5 - Porcentagem dos gêneros dos principais fungos reportados literatura como causadores de manchas no papel



Fonte: MELO *et al.*, 2019.

Figura 6 - Percentagem de manchas coloridas reportadas na literatura



Fonte: MELO *et al.*, 2019.

1.4.1 Identificação dos gêneros e espécies fúngicas

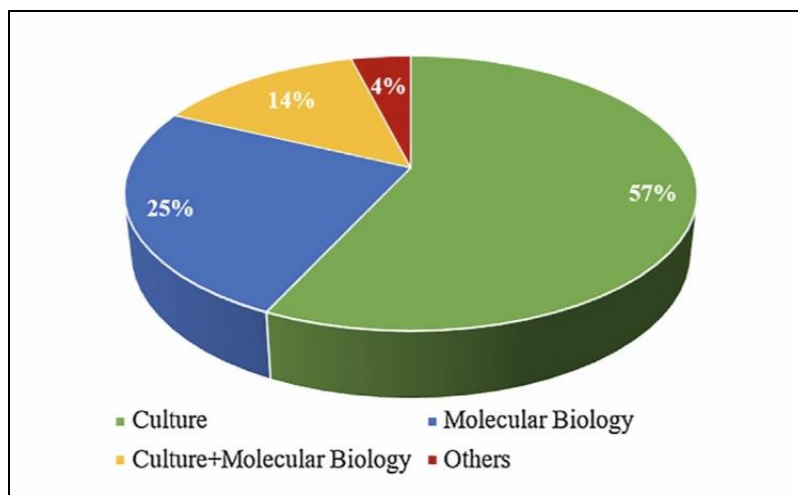
Devido ao fato de os fungos serem afetados por muitos fatores de meio no qual se encontram (como a natureza e a concentração do substrato nutritivo, a umidade relativa, a temperatura, a luz e o pH), as mudanças nesses fatores podem induzir modificações morfológicas e fisiológicas, que tornam difícil o reconhecimento do fungo e alteram seu comportamento de maneira geral (GONZÁLEZ; SÁINZ-JIMÉNEZ, 2008).

Por conta dessa grande diversidade e variabilidade das espécies, métodos de identificação clássicos são utilizados no dia a dia para a identificação a nível de gênero e métodos moleculares permitem a identificação microbiana a nível de espécie. Os métodos clássicos são os baseados no cultivo de microrganismos. O trabalho de MELO *et al.*, 2019 verificou que estudos anteriores reportaram que métodos de cultura tradicionais (clássicos) com identificação morfológica são vantajosos e fornecem os resultados dos fungos cultiváveis e viáveis, permitindo o estudo da fisiologia do fungo. Entretanto, os métodos tradicionais de cultura cobrem menos que 1% dos microrganismos totais em amostras do meio ambiente e, portanto, o verdadeiro culpado pelas manchas fúngicas pode não ser identificado. Em seu trabalho, dados revisados da literatura apontaram que mais que 50% dos fungos, responsáveis pelas manchas reportadas, foram identificados por métodos de cultura e somente 14% dos autores usam tanto os métodos clássicos de cultura quanto os métodos que utilizam a biologia molecular. Cerca de 25% dos estudos reportados usam apenas os métodos de biologia molecular. A Figura 7 apresenta a porcentagem de uso dos métodos de identificação de fungos utilizados na identificação dos gêneros e espécies microbianas que contaminam acervos do patrimônio histórico-cultural.

Os métodos moleculares se baseiam na detecção de microrganismos na base de seus ácidos nucléicos. Os métodos de biologia molecular são reprodutíveis e uma técnica poderosa para a identificação e não somente dos fungos viáveis mas também de fungos anteriormente ativos que poderiam ser responsáveis pelos processos de biodeterioração. Mesmo assim, esse método é ainda prejudicado por conta do custo e conhecimento técnico necessário para aplicar os métodos

baseados no DNA. A aproximação ideal é, entretanto, usar ambos os métodos (cultura e biologia molecular) como um complementando o outro.

Figura 7 - Métodos de identificação dos fungos



Fonte: MELO *et al.*, 2019.

Com relação a outros métodos de identificação, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode ser uma ferramenta útil para a observação das estruturas fúngicas nas amostras. Esta técnica pode ajudar a obter conhecimento sobre a associação de microrganismos específicos com formas particulares de biodeterioração. Apesar de não ser um método seguro para a identificação de fungos, permite uma observação das estruturas fúngica “*in loco*” comparando-as com as espécies identificadas em biologia molecular, por exemplo, conduzindo a uma melhor aproximação com o responsável real da deterioração observada (MELO *et al.*, 2019).

1.5 Tratamentos químicos e físicos de descontaminação

A pesquisa em biodeterioração de documentos antigos e históricos é importante para o desenvolvimento e otimização de metodologias que podem ajudar a prevenir sua degradação. Muitas metodologias químicas e não químicas têm sido

aplicadas para descontaminar e proteger diferentes formas de arte, especialmente documentos de arquivos (NUNES *et al.*, 2013).

Durante muitos anos, a fim de promover a desinfestação dos acervos, os mesmos foram tratados com procedimentos que continham substâncias químicas tóxicas e altamente nocivas à saúde dos profissionais envolvidos nas práticas de conservação bem como dos usuários dos acervos, pois esses tratamentos deixavam resíduos nos objetos (Tabela 3). No levantamento de CASANOVA e PINHEIRO (2020), que revisou os procedimentos de desinfecção de acervos em livrarias e arquivos de Portugal ao longo do século XX, verificaram que além da toxicidade, essas substâncias utilizadas geralmente contribuíam para a alteração e deterioração do patrimônio cultural.

Tabela 3 - Alguns produtos químicos usados em livrarias e arquivos em Portugal ao longo do século XX

Substância	Método de aplicação	Função	Riscos à saúde	Efeitos colaterais nos documentos
Benzeno	n.a.	Inseticida	Carcinogênico	Manchas, oxidação
Hexacloro-ciclohexano (Lindano)	pó	Inseticida	Carcinogênico, neuropatológico e irritante da pele	oxidação
Dissulfeto de carbono	Gás	Fumegante	Doença cardiovascular	n.a.
Diclorofeno	Líquido	Fungicida e germicida	Irritação da pele e olhos	Aumento da taxa de deterioração; amarelamento
Gás cloro	Vapor	Fumegante	Ataque ao sistema respiratório	Aumento da taxa oxidativa; amarelamento
Diclorofenil-tricloroetano (DDT)	Pó	Inseticida	Carcinogênico	Oxidação
Etanol	Líquido (70-90% v/v)	Fungistático	n.a.	Perda do brilho e aumento da opacidade em papéis transparentes.
Óxido de etileno	Gás	Fumegante	Carcinogênico	Mudança nas propriedades mecânicas; polimerização; oxidação; amarelamento.
Formaldeído	Vapor ou líquido	Fumegante Fungicida	Carcinogênico, irritação por inalação; e dermatite	Corrosão da tinta ferrogálica
Ácido cianídrico	Gás	Fumegante	Toxicidade letal sob exposição	n.a.
Brometo de metila	Gás	Fumegante (insetos e roedores)	Efeitos respiratórios e neurológicos; potencial carcinogênico	Afeta os materiais contendo enxofre e compostos por proteínas
Naftaleno	Forma sólida, sublimação	Repelente de insetos	Pode causar anemia; potencial carcinogênico	Descoloração; pode dissolver as gorduras em materiais feitos de pele.
Timol	sublimação	Fumegante Fungistático	Risco genotóxico	Decréscimo das propriedades mecânicas; amarelamento;

				risco de deterioração das tintas ferrogálicas.
--	--	--	--	--

Fonte: CASANOVA; PINHEIRO, 2020.

Um aspecto importante é a questão relacionada à saúde. Muitas espécies de microrganismos são patogênicas e tóxicas e reconhecidamente alérgenos capazes de provocar doenças respiratórias. Sendo assim, desde o final do século XIX até o final do século XX diferentes estratégias relacionadas de conservação e prevenção e práticas de conservação curativa foram implementadas para o controle da biodeterioração em objetos de papel e coleções (CASANOVA; PINHEIRO, 2020).

Mediante a proibição quanto ao uso dessas substâncias, teve início uma busca por métodos e procedimentos que fossem capazes de salvaguardar os acervos sem serem nocivos à saúde e ao meio ambiente. Esses novos procedimentos têm se mostrado eficazes, porém, devido ao fato de não deixarem um efeito residual permitem rápida infestação do acervo caso entrem em contato com outros materiais e locais infestados. Somado a isso, estes processos não são eficientes na eliminação de fungos anaeróbios que podem estar infestando as obras. Diante de toda essa problemática, novos métodos de tratamento têm sido testados o que incluem a desinfecção com radiação gama (FRANÇA; BARBOSA, 2010).

1.5.1 Fumigação

Dentre os diferentes métodos químicos estão os agentes fumegantes. A técnica consistia em utilizar substâncias químicas tóxicas presentes em fungicidas e bactericidas, como, por exemplo, o óxido de etileno, brometo de metila e fosfina (fosfeto de alumínio) altamente nocivos à saúde. Por esse motivo, os fumegantes estão em desuso (FRANÇA; BARBOSA, 2010; NUNES *et al.*, 2013).

1.5.2 Atmosfera Anóxica

É um método de tratamento não químico. Tem sido amplamente utilizado por conservadores-restauradores do Brasil devido a sua relativa facilidade de execução e sua eficácia. É muito utilizada na conservação de plásticos, principalmente para objetos em látex, borrachas e PVC uma vez que evitam a oxidação das borrachas e tornam mais lento o processo de perda do plastificante nos objetos em PVC.

Consiste, basicamente, na substituição do oxigênio por um gás inerte ou, mais recentemente, na remoção do mesmo através da utilização de absorvedores. O princípio básico consiste na criação de uma atmosfera anóxica criada dentro de uma embalagem especial de alta barreira a gases dentro da qual será colocado o objeto infestado por fungos ou outras pragas biológicas. O ar atmosférico desta embalagem, que contém cerca de 20,9% de oxigênio, será substituído por um gás inerte puro que poderá ser o dióxido de carbono (CO_2), argônio (Ar) ou nitrogênio (N_2), retirando o oxigênio da mesma.

O monitoramento de umidade relativa, temperatura e concentração de O_2 devem ser feitos a cada dia durante 25 a 30 dias por poderem haver falhas ou rasgos na embalagem. Um dos problemas do método deve-se à possível formação de ácido carbônico dentro da embalagem, por conta da reação entre CO_2 e H_2O , o que causaria uma aceleração do processo de degradação, além de produzir outros efeitos como a corrosão de metais, pigmentos entre outros (FRANÇA; BARBOSA, 2010).

Outro método que envolve a técnica da anóxica é o que utiliza absorvedores de oxigênio. Através dela, a remoção do oxigênio é obtida a partir da utilização de sachês absorvedores, em embalagens lacradas de alta barreira. Estes sachês são permeáveis e em seu interior existe um composto químico em pó, a base de óxido de ferro e Zeolite. Os indicadores de oxigênio das embalagens monitoram o oxigênio residual dentro das bolsas, uma vez que a eficácia do tratamento exige a condição anóxica abaixo de 0,3% do oxigênio. Quando as condições internas das bolsas apresentam níveis de oxigênio abaixo de 0,3% os absorvedores apresentam coloração rosa. Se os níveis estiverem acima de 0,5% os absorvedores tornam-se azuis.

As vantagens desse método são: I. as embalagens, por serem fechadas, não dependem mais da alimentação de gás; II. Os volumes são tratados em pequenas embalagens, podendo ser alocados nas próprias prateleiras; III. Obtém-se a redução do oxigênio abaixo de 0,3%; IV. o volume de acervo em tratamento é ilimitado; V. permite, em possibilidade, o controle pontual como ação preventiva.

As desvantagens desse método são: I. os volumes tratados não podem apresentar grandes dimensões; II. É ineficiente para desinfestação de fungos anaeróbios (FRANÇA; BARBOSA, 2010).

1.5.3 Congelamento

É uma técnica que permite erradicar pragas dos objetos e coleções de maneira atóxica, rápida e econômica. É muito utilizado em acervos documentais.

Os objetos são acondicionados em embalagens hermeticamente seladas e com o ar interno retirado e colocados no *freezer* por 15 dias sob temperatura constante (-20°C, -25°C ou -30°C). A erradicação das pragas ocorre quando a água contida em suas células e tecidos congela e expande provocando um rompimento dos tecidos.

A desvantagem desse método é que pode causar danos graves aos objetos devido aos diferentes coeficientes de contração e dilatação dos objetos (metais, couros e plásticos). Além disso, o método torna-se inviável, por conta dos problemas que envolvem a logística em grandes acervos. Por fim, esse método ainda pode não ter a eficácia garantida por poder levar insetos e fungos a um estado de dormência, necessitando novas aplicações (FRANÇA; BARBOSA, 2010).

1.5.4 Radiação gama

Os processos de radiação não eram amplamente aceitos por restauradores e conservadores por causa da degradação da celulose causada pela radiação. Mas existe um crescente interesse em utilizar os princípios da mínima intervenção

necessários para a preservação do patrimônio cultural. Nesse sentido, estabelecer uma dose segura de radiação que possa causar uma redução da carga microbiana sem prejudicar a estrutura do papel, tem sido o objeto de estudo de muitos pesquisadores (MOISE *et al.*, 2012). A radiação gama tem provado ser uma alternativa limpa e segura para o tratamento de objetos biodeteriorados. Sua alta capacidade penetrante e a possibilidade de ser aplicada uma grande faixa de materiais (diferentemente dos tratamentos térmicos) tornam essa opção uma alternativa atraente na preservação, conservação e descontaminação de objetos de arte (NUNES *et al.*, 2012).

Mediante diversas possibilidades de técnicas de radiação que têm sido empregadas não apenas na análise da estrutura de objetos como também no seu tratamento com fins de desinfecção e/ou esterilização, a radiação gama tem se mostrado ser uma técnica segura e efetiva para o tratamento de acervos uma vez que já é largamente utilizada com elevada eficiência na redução da carga microbiana ou eliminação de infestação de pragas em produtos médicos alimentos, produtos farmacêuticos e produtos agrícolas, sem deixar nenhum resíduo tóxico (RELA *et al.*, 2007). Em patrimônio cultural tem sido aplicada e testada desde 1960. Baixas doses têm mostrado ser efetivas na descontaminação de arquivos documentais, com poucas evidências de alterações dos materiais (NUNES *et al.*, 2013).

Formada por ondas eletromagnéticas de alta energia que possui, a radiação gama é capaz de penetrar na matéria de forma mais profunda que a radiação alfa e beta. Pode ser obtida através da emissão de um isótopo radioativo, como por exemplo, o Cobalto 60, o Irídio 192 e o Césio 137 (FRANÇA; BARBOZA, 2010). Sendo assim, como tratamento de esterilização, ela causa dano direto ao DNA das células a partir da ionização, induzindo a mutações e morte celular. Também tem um efeito indireto como um resultado da radiólise da água celular e formação de espécies oxigenadas ativas, radicais livres e peróxidos causando ruptura de DNA de fita simples e dupla (MCNAMARA *et al.*, 2003).

Para a desinfecção de fungos e bactérias as doses de radiação que começam a causar letalidade são a partir de 10 kGy. Um Gray corresponde à energia de um joule absorvida em um quilograma do produto irradiado. Estudos mostram que a dose de 10 kGy é normalmente utilizada como dose de segurança para desinfecção de fungos e bactérias presentes em ingredientes de alimentos (especiarias e ervas

desidratadas). Essa dose também foi utilizada em estudos realizados na recuperação de pinturas contaminadas por microrganismos e se mostrou eficaz (RELA *et al.*, 2007).

Importantes vantagens podem ser mencionadas a favor do tratamento que utiliza a radiação: não há risco para o operador; o tratamento é conduzido em sala de irradiação (área protegida e confinada); não há risco associado ao restaurador, curador, visitante ou ao meio ambiente; nenhum resíduo tóxico ou radioativo permanece no objeto tratado; a excelente eficiência ocorre em todo o objeto por conta da excelente penetração da radiação gama; a eficiência está correlacionada com a dose absorvida, que é um parâmetro fácil de medir e controlar; excelente confiabilidade com base no fato de que o campo de radiação é sempre o mesmo; grandes quantidades de objetos podem ser tratados simultaneamente; o tratamento em instalações industriais é realizado em pouco tempo além do custo atrativo (ADAMO *et al.*, 1998, 2001; PONTA, 2008).

Ao mesmo tempo, a interação dos raios gama com qualquer substância pode mudar suas propriedades físicas e químicas e os efeitos são cumulativos. A mudança é proporcional com a dose de radiação e, portanto, repetidos tratamentos devem ser conduzidos com cuidado. Dependendo do item específico a serem tratados, dado o grau de importância para o patrimônio cultural, devem ser usadas doses seguras e bem estabelecidas e testes suplementares devem ser realizados. Diante disso, a técnica da radiação gama deve ser aplicada especialmente quando as seguintes circunstâncias estiverem presentes: houver necessidade de uma intervenção emergencial; a intervenção ser em objetos de estrutura complexa ou em grandes objetos (montagens); os métodos clássicos não podem ser aplicados ou ainda a relação custo/benefício for menor que de outros métodos (PONTA, 2008).

Vários são os estudos e trabalhos que utilizam a radiação gama como método de tratamento para descontaminação de acervos, coleções e obras de arte de museus, bibliotecas e arquivos. MOISE *et al.* (2012) conduziram um estudo para estabelecer a dose de radiação necessária para o tratamento efetivo de documentos de papel levando em conta a carga microbiana e os efeitos da radiação na estrutura do papel. Os resultados mostraram que um tratamento efetivo pode ser conduzido em doses menores que 10 kGy.

A inativação de fungos por radiação de materiais em papel deteriorados também foi estudada por da SILVA *et al.* (2006). *Aspergillus versicolor* e *Eurotium*

chevalieri previamente isolados de livros contaminados naturalmente de uma biblioteca pública brasileira e do ambiente, respectivamente, foram cultivados e tratados com radiação de ^{60}Co em doses que variaram de 14,5 a 25 kGy. A dose mínima requerida que causou letalidade aos fungos foi a de 16kGy.

Pinturas do século 17 foram tratadas utilizando a técnica da radiação ionizante. De acordo com RIZZO *et al.* (2002), os produtos foram irradiados com doses de raios gama de ^{60}Co na faixa de 6-25 kGy. Os resultados concluíram que a aplicação da dose de 6 kGy não prejudicou a pintura restaurada imediatamente, do ponto de vista dos próprios pigmentos e polímeros. Nenhuma modificação significativa de cor foi detectada nesses processos. Além disso, a maior dose de radiação aplicada (25kGy) não causou modificações permanentes na estrutura física e química dos polímeros investigados.

NUNES *et al.* (2012) testaram a utilização da radiação gama a partir do ^{60}Co , em pergaminho com objetivo de estabelecer uma dose segura e máxima ($D_{\text{máx}}$) de irradiação nesse material contaminado por fungos. Pergaminhos, que são boas matrizes para os agentes biodeterioradores, devido a sua natureza, possuem propriedades físicas que são diretamente dependentes do tipo e de pele e idade do animal, bem como de seu processo de manufatura e história. O estudo verificou que as doses testadas de 10, 19, 22, 28 e 30 kGy não causaram mudanças substanciais na dureza, elasticidade ou cor das amostras de pergaminho. Dessa forma, os autores consideraram a dose de 30kGy inofensiva e então propuseram esta como a dose máxima a ser aplicada para o tratamento de descontaminação dos pergaminhos testados.

A radiação gama foi testada também como tratamento de descontaminação de um acervo da USP, em 2005, contaminado por fungos, bactérias e insetos. Nesse acervo continham manuscritos, xilogravuras e impressões em papel pardo. As doses de radiação usadas foram a de 10 kGy para a desinfecção de fungos e bactérias das xilogravuras e de dose inferior a 5 kGy para os manuscritos e impressos contaminados. As doses aplicadas foram eficientes na eliminação dos agentes de biodeteriorantes e não provocaram alterações nas propriedades funcionais dos materiais processados (RELA *et al.*, 2007).

A questão da dose ideal e segura a ser utilizada na descontaminação utilizando a radiação ionizante é uma questão intrigante e objeto de estudo de inúmeros pesquisadores e profissionais da conservação e restauração. O estudo

conduzido por MAGAUDDA (2004) revisou essa questão das doses utilizadas em diversos trabalhos. Mediante muitas evidências expostas, concluiu que o tratamento com a radiação gama, quando conduzido nas doses corretas e necessárias para a recuperação do material, não causa nenhuma contra indicação para o material propriamente dito. Uma análise responsável do custo-benefício quanto ao uso da radiação, indica que esse tratamento é uma opção valiosa comparado às substâncias químicas tão largamente usadas e que já provaram ser tóxicas e prejudiciais para o homem e o meio ambiente.

1.6 Fungos tolerantes à radiação

A vida na Terra surgiu em uma época em que havia altos valores de radiação de forma que as formas de vida primitivas eram consideravelmente resistentes à radiação. Embora os níveis atuais sejam muito inferiores aos da Terra primitiva, a vida terrestre ainda existe com um nível de radiação natural. No entanto, existem evidências consideráveis de que os fungos respondem à radiação de uma maneira que pode diferir da de outros organismos vivos. Fungos em geral, especialmente os que contém melanina, são altamente radio resistentes quando submetidos a altas doses de radiação ionizante sob condições experimentais. Estudos realizados por ZHDANOVA *et al.* (1991), sobre o crescimento fúngico observado em áreas próximas do acidente nuclear de Chernobyl (1986) revelaram que tanto a radiação beta quanto a radiação gama promoveram o crescimento direcional de fungos de áreas contaminadas e limpas em direção às fontes de radiação ionizante. Essa atração dos fungos para a radiação foi nomeada de radiotropismo (ZHDANOVA *et al.*, 2004). Também foi observado em estudos posteriores que a radiação promove germinação de esporos em espécies de regiões contaminadas que foi definida como radioestimulação (TUGAY *et al.*, 2006; DADACHOVA; CASADEVALL, 2008).

Dada a resiliência e adaptabilidade dos fungos à ambientes de radiação ionizante e que muitos fungos produzem melanina, acredita-se que a radiação ionizante possa mudar as propriedades da melanina, de modo que o pigmento possa funcionar na transdução de energia e que isso possa melhorar o crescimento de fungos melanizados. Além disso, a melanina tem significativas propriedades

radioprotetivas por diversos motivos. A melanina extingue os radicais livres de curta duração citotóxicos e, portanto, previne prejuízos ao DNA. Entretanto também acredita-se que propriedades radioprotetivas da melanina em microrganismos resultaram de uma combinação de blindagem física e extinção dos radicais livres citotóxicos. Outros estudos concluíram que a melanina protegeu os fungos contra a radiação ionizante e suas propriedades radioprotetivas eram função da sua composição química, da capacidade de extinção dos radicais livres e do seu arranjo espacial esférico (DADACHOVA; CASADEVALL, 2008; DADACHOVA *et al.*, 2008).

Diversos estudos verificaram a resistência de fungos quando submetidos à radiação ionizante como forma de tratamento na desinfecção de materiais em processo de biodeterioração. De acordo com BONIEK *et al.* (2017), a espécie *C. cladosporioides* foi a única resistente à exposição da radiação gama e concluiu que esta característica pode estar relacionada ao fato de que algumas cepas têm a capacidade metabólica de produzir uma tinta preta (o biopolímero melanina) que se acumula dentro do micélio e protege contra os raios ultravioleta (UV) e radiação ionizante fato verificado em outros trabalhos publicados onde foi relatado que espécies fúngicas radiotróficas usam a melanina para converter a radiação beta e gama à energia química para crescimento.

No estudo desenvolvido por SALEH *et al.* (1988), dez espécies de fungos representando os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium* foram examinadas por sua resistência à radiação gama a partir de uma fonte de ^{137}Cs . Neste estudo, foi constatado que os fungos que possuem hifas com melanina tais como, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata* e *Curvularia geniculata* sobrevivem a altas doses de radiação gama. Os macroconídios de *Curvularia* e *Alternaria* sp., que são de parede multicelular e grossa e contém pigmento melanina, apresentaram resistência e, essas duas características podem, provavelmente, contribuir para o aumento da resistência dessas espécies. O mesmo foi verificado em outro trabalho onde, dentre todos os fungos isolados de documentos suportados em amostras de pergaminho, os gêneros mais frequentes (e mais resistentes à radiação gama) foram *Penicillium* e *Aspergillus* (NUNES *et al.*, 2013).

Melaninas são polímeros complexos com uma variedade de propriedades que podem ser produzidas enzimaticamente a partir de precursores relativamente simples. Um aspecto notável da melanina é sua habilidade de absorver todos os tipos

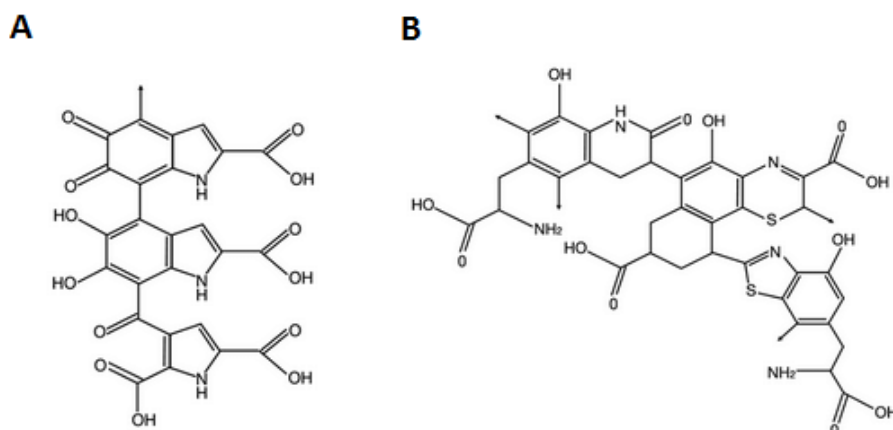
de radiação eletromagnética que as dotam de capacidade para transdução de energia e blindagem (DADACHOVA; CASADEVALL, 2008).

A melanina é um pigmento de alto peso molecular, de natureza onipresente, com uma variedade de funções biológicas. Muitos fungos sintetizam constitutivamente a melanina, o que provavelmente confere uma vantagem de sobrevivência ao meio ambiente, protegendo contra a radiação UV e solar. Os microrganismos melanizados habitam alguns ambientes notavelmente extremos, incluindo alta altitude, regiões ártica e antártica e, como já relatado, De maneira mais dramática, as espécies de fungos melanizados colonizam as paredes do reator altamente radioativo danificado em Chernobyl e nos solos vizinhos. Esses achados e as observações laboratoriais da resistência de fungos melanizados à radiação ionizante, sugerem um papel para esse pigmento na radioproteção. Dado que as melaninas podem absorver luz visível e UV de todos os comprimentos de onda, acredita-se que a exposição à radiação ionizante altera as propriedades eletrônicas da melanina, afetando o crescimento de microrganismos melanizados (DADACHOVA *et al.*, 2007).

É geralmente aceito, no entanto, que existem dois tipos principais de melanina: eumelanina e feomelanina, como apresentado na Figura 8. A eumelanina é um pigmento marrom-escuro a preto composto por unidades de monômero de 5,6-di-hidroxiindol (DHI) e ácido 5,6-di-hidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) com 6 a 9% de nitrogênio e 0 a 1% de enxofre (Figura 8A). Por outro lado, a feomelanina é um pigmento marrom-avermelhado composto por unidades de monômero de benzotiazina com 8 a 11% de nitrogênio e 9 a 12% de enxofre (Figura 8B).

A melanina parece ter significantes propriedades radioprotetivas. Isto porque ela extingue os radicais livres de vida curta citotóxicos e, portanto, previne os prejuízos ao DNA. Entretanto, acredita-se também que as propriedades radioprotetivas da melanina em microrganismos resultem da combinação de blindagem física e extinção dos radicais livres citotóxicos. A melanina protege os fungos contra a radiação ionizante e suas propriedades radioprotetivas são uma função da sua composição química, da extinção dos radicais livres e do seu arranjo espacial esférico (DADACHOVA; CASADEVAL, 2008).

Figura 8 - Estrutura da eumelanina (A) e estrutura da feomelanina (B)



Fonte: DADACHOVA *et al.*, 2007.

No trabalho desenvolvido por MARUŠIĆ *et al.* (2019), apresentou que o gênero *Cladosporium* foi o mais resistente e que a eficiência da sua descontaminação é fortemente dependente tanto da dose de irradiação quanto da taxa de dose. Foi utilizado Co-60 como fonte de irradiação e a taxa de dose aplicada foi de 0,4 kGy/h (baixa taxa) e de 31 kGy/h (alta taxa). A explicação dada à resistência foi relacionada ao conteúdo de melanina que este gênero fúngico apresentou, como já foi discutido anteriormente. No entanto, apresentou alguns dados da literatura baseados em um levantamento de outros estudos já realizados que mostraram que a resistência à radiação de muitas leveduras está fortemente relacionada com o conteúdo de manganês (Mn) antioxidante intracelular que produz enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD). O Mn é importante entre os metais de transição redox ativos nas células e seu ciclo redox favorece a eliminação do oxigênio (O₂) sem a liberação do radical hidroxil (.OH) muito reativo, enquanto que o ciclo redox de outros metais tais como Fe e Cr produz radicais (.OH). O acúmulo de altas concentrações de Mn antioxidante podia ser também uma explicação plausível para a resistência à radiação dos fungos brancos. Além disso, outros estudos mostraram que na exposição dos fungos à altas taxas de doses, a dose total é liberada para as células por um tempo muito curto para reparar prejuízos substanciais. Culturas misturadas de leveduras expostas à baixa taxa de dose sobre períodos mais longos de tempo compartilham enzimas antioxidantes de forma que uma alta concentração de células pode suprimir o estresse oxidativo.

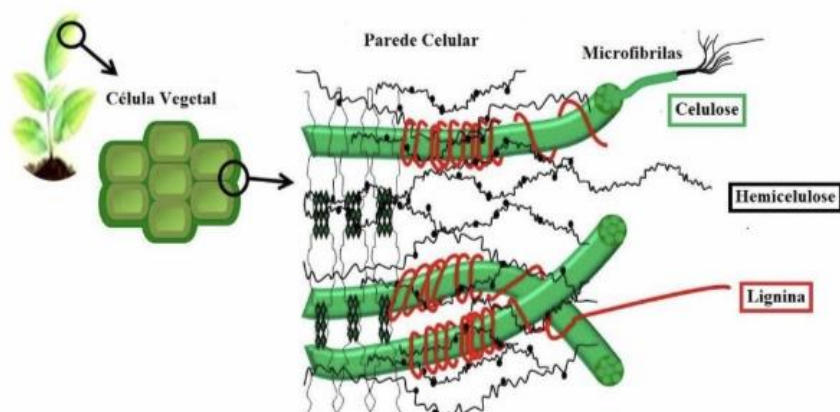
Dessa forma, conclui-se que o efeito antifúngico da radiação gama depende fortemente da dose e da taxa de dose. Isso porque os fungos resistentes (e.g. *Cladosporia* e/ou levedura) presentes em altas concentrações (e.g. 10^4 CFU/g) e expostos à altas doses, porém à baixa taxa de dose, podem causar a supressão do estresse oxidativo pelo compartilhamento intercelular de enzimas que eliminam espécies oxigenadas reativas permitindo crescimento e reparos simultâneos.

1.7 Material lignocelulósico como substrato dos agentes biodeteriorantes

Os materiais de arquivo apresentam diferentes susceptibilidades aos microrganismos em função das suas estruturas e componentes específicos. O papel, os pergaminhos, as telas, a madeira, os têxteis e, em geral, todos os suportes orgânicos o que inclui os lignocelulósicos, são materiais susceptíveis a serem biodegradados pelos microrganismos devido às suas macromoléculas constituintes (TIANO, 2002).

Os suportes lignocelulósicos são materiais fibrosos, encontrados na biomassa vegetal, que formam matrizes complexas constituídas de celulose, hemiceluloses, pectinas e outras gomas (Tabela 4). Adicionalmente essa matriz é impregnada com lignina, a qual pode ser considerada como uma cobertura de resina plástica (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos



Fonte: TOMME *et al.*, 1995.

Tabela 4 - Composição típica dos lignocelulósicos

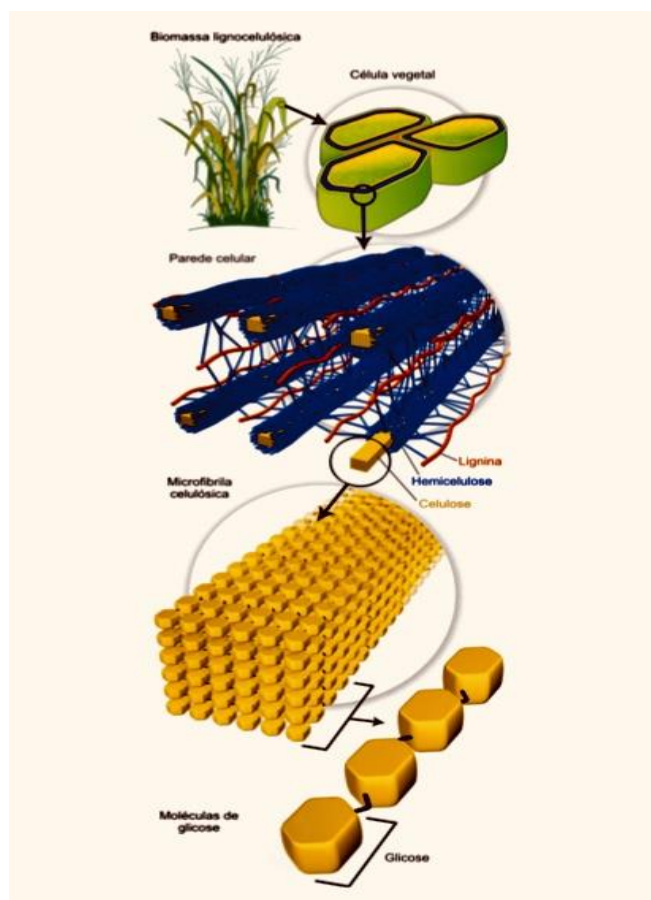
Componente	Faixa de Variação (%)
Celulose	40-50
Hemicelulose	25-30
Lignina	15-25

Fonte: CASTRO, 2009

1.7.1 Celulose

É um polímero linear de glicose de alta massa molecular formado por ligações β -1,4 glicosídicas, insolúvel em água, sendo o principal componente da parede celular da biomassa vegetal (Figura 10).

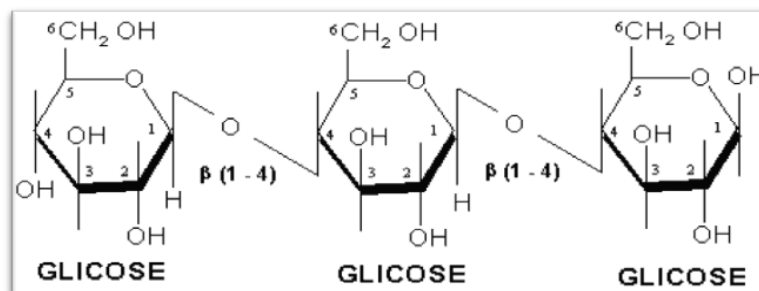
Figura 10 - Composição química da parede celular de material de origem vegetal



Fonte: SANTOS *et al.*, 2012.

O polímero de celulose pode ser muito longo. O número de unidades de glicose na molécula de celulose varia entre 15 a 15.000, apresentando um valor médio na ordem de 3000 unidades (Figura 11). Essa diferença estrutural prova ser bastante significativa. As cadeias de celulose são lineares e um pouco rígidas. Isso torna as cadeias de celulose passíveis de formar inúmeras ligações de hidrogênio, que levam as cadeias de celulose a se agruparem em feixes de fibrilas cristalinas, semelhantes a cabos, com alta resistência à tração e resistentes à hidrólise (RITTER, 2008).

Figura 11 - Fragmento da estrutura da celulose



Fonte: A autora, 2019.

Uma molécula de celulose pode ter áreas com configuração ordenada, rígida e inflexível em sua estrutura (celulose cristalina) e outras de estruturas flexíveis (celulose amorfa). O grau de polimerização das cadeias de celulose e o grau de cristalinidade das microfibrilas dependem da natureza e origem das fibras vegetais. Essas diferenças são responsáveis por algumas variações de comportamento físico, que podem ser observadas em uma molécula de celulose (AREA; CHERADAME, 2011; CASTRO, 2009).

A celulose, quando separada dos outros constituintes do material lignocelulósico (hemicelulose e lignina), apresenta grande reatividade e sendo susceptível a reações de vários tipos (adição e substituição), incluindo as de degradação. Por degradação, entende-se a cisão da ligação β -1,4 glicosídica da molécula da celulose, ou seja, a cisão da ligação entre dois monômeros de glicose. A degradação produz moléculas com grau de polimerização menor, afetando, portanto, as propriedades que dependem do comprimento da cadeia molecular da celulose, tais como viscosidade e resistência mecânica.

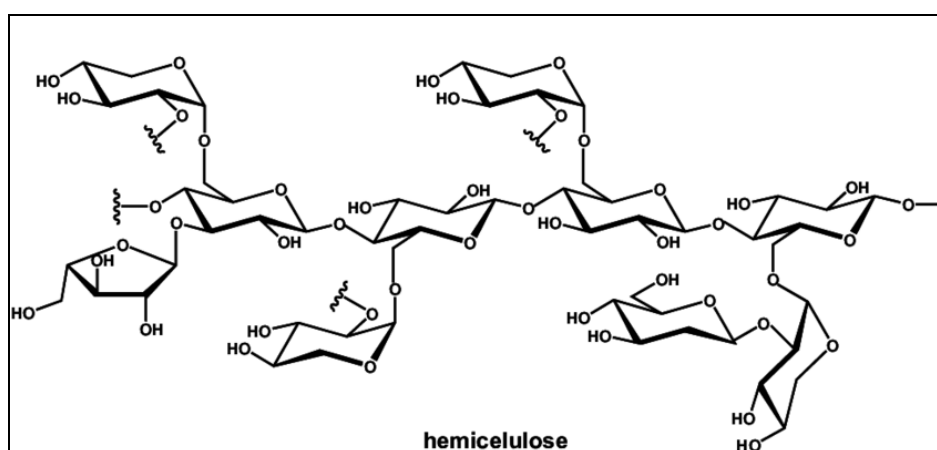
A biodegradação da celulose na natureza é realizada pelos microrganismos celulósicos que são os capazes de produzir as enzimas denominadas "celulases". Trata-se de um complexo enzimático. A atividade e a composição da celulase sintetizada dependem fundamentalmente do microrganismo em questão, dos componentes presentes no complexo enzimático, do tipo de celulose a degradar, assim como das características físico-químicas e estruturais do suporte. As maiores atividades celulósicas têm sido atribuídas aos fungos *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Paecilomyces* e *Myrothecium*. Este processo ocorre em várias etapas e podem ocorrer a oxidação e a hidrólise parcial ou total do polímero celulósico. Durante a hidrólise se produz a ruptura do enlace principal (β -glucosídico) da molécula, dando

lugar à diminuição da cadeia polimérica e à formação de grupos redutores (CALLOL, 2013).

1.7.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são um grupo misturado de heteropolímeros tanto lineares quanto ramificados compreendendo principalmente cinco açúcares monoméricos denominados D-glucose, D-manose, D-galactose, D-xilose e L-arabinose. Eles são ligados na sua maioria por ligações β -1,4 glicosídicas, mas ligações glicosídicas β -1,3-, β 1,6-, α -1,2-, α -1,3- e α -1,6-, pode também ser encontradas (Figura 12). O grau de polimerização das hemiceluloses é de 100 a 200, que é muito menor que da celulose. Hemiceluloses e lignina são covalentemente ligadas juntas, e esta ligação proporciona uma força adicional. Devido à ausência de cristalinidade, sua baixa massa molecular e configuração irregular, as hemiceluloses absorvem água facilmente (AREA; CHERADAME, 2009).

Figura 12 - Estrutura da hemicelulose



Fonte: A autora, 2019.

A maior parte dos fungos e das bactérias, inclusive muitas leveduras, são capazes de biodegradar a hemicelulose, por meio da produção da enzima genericamente denominada “hemicelulase ou xilanase”. A “hemicelulase” é também um complexo enzimático e, na degradação da hemicelulose ocorrem reações oxidativas e hidrolíticas no nível de cadeia polimérica, podendo levar até xilose

(unidade monomérica). Pela hemicelulose ser amorfa e por ter tamanho e peso moleculares menores do que a celulose, a biodegradação desse polímero ocorre com maior velocidade. Porém, como quase sempre se encontra associada à lignina e à celulose, os complexos macromoleculares que a recobrem a torna menos acessível. A presença de taninos e algumas resinas também inibem o crescimento de muitos microrganismos (CALLOL, 2013). A Tabela 5 apresenta as principais diferenças entre a celulose e a hemicelulose.

Tabela 5 - Principais diferenças entre celulose e hemicelulose

CELULOSE	HEMICELULOSE
Consiste em unidades de glicose ligadas entre si	Consiste em diferentes unidades de açúcares ligados entre si
Tem grau de polimerização elevado	Tem grau de polimerização baixo
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Leva a formação de regiões amorfas e cristalinas	Leva à formação somente de regiões amorfas
É lentamente atacada por ácido mineral diluído	É rapidamente atacada por ácido mineral diluído a quente
É insolúvel em álcali	É solúvel em álcali

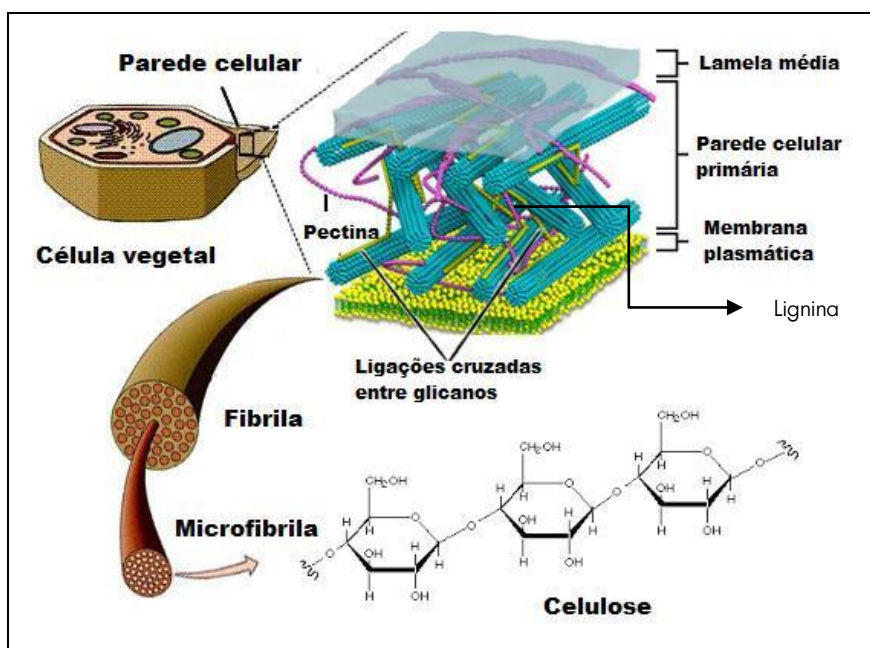
Fonte: CASTRO, 2009.

1.7.3 Lignina

A lignina é um polímero amorfo, aromático, insolúvel em água, heterogêneo, tridimensional e reticulado. Não é composta exatamente por unidades repetidas e pode ser mais precisamente descrita como macromolécula do que como polímero. Possui uma estrutura tridimensional complexa que consiste em unidades de fenilpropano, ou seja, é um polifenol construído de unidades de fenil-propanas (C6-C3). É considerada como um dos materiais mais resistentes da natureza. É a fonte natural e renovável mais abundante de compostos aromáticos. Trata-se de um componente importante dos materiais lignocelulósicos, que contribui com até 40% do conteúdo energético. Na biomassa vegetal está associada juntamente com a

celulose e a hemicelulose, o que impede a degradação desses materiais, isto é, a lignina confere firmeza e rigidez ao conjunto de fibras da celulose. A lignina é um constituinte importante da parede celular (Figura 13), pois fornece o suporte estrutural e evita ataques microbianos e decomposição da parede celular (KHAN; AHRING, 2019; AREA; CHERADAME, 2011; CASTRO, 2009).

Figura 13 - Esquema representando fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular de vegetais



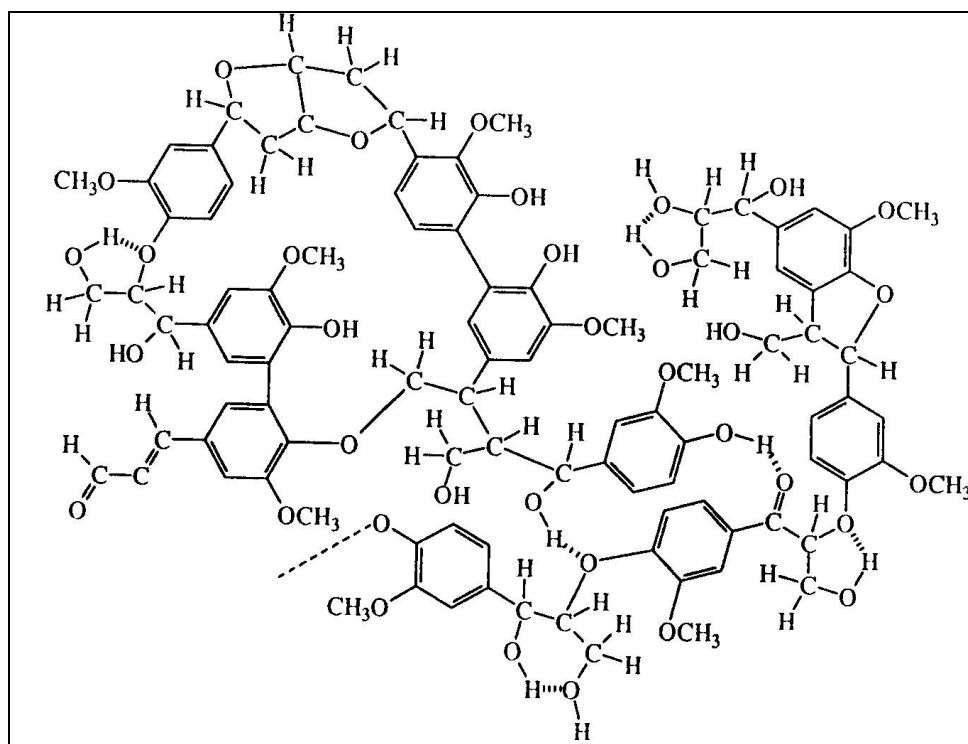
Fonte: SILBERMAN, 2020.

O conteúdo de lignina difere em diferentes espécies de materiais lignocelulósicos e as madeiras duras contêm maior quantidade de lignina quando comparadas às madeiras macias. Devido a sua estrutura química, é um polímero bastante resistente à degradação microbiana. Têm sido reportados alguns fungos que decompõem a madeira, tais como basidiomiceto, alguns actinomicetes termófilos e umas poucas bactérias com capacidade lignolítica, ainda que estas últimas tenham mostrado uma atividade muito limitada (CALLOL, 2013).

Devido ao fato da lignina ser um polímero orgânico polifenólico, recalcitrante, com uma estrutura complicada reticulada, ela não é degradável por hidrólise enzimática direta, como a celulose e a hemicelulose (Figura 14). Isso torna os compostos formados por materiais lignocelulósicos menos susceptíveis a biodegradação quanto maior for o teor de lignina presente. Apesar de sua natureza

recalcitrante, alguns microrganismos têm o potencial de degradar a lignina através da ação de reações enzimáticas oxidativas, formando radicais e mediadores redox, que podem atuar na molécula de lignina (KAHN; AHRING, 2019).

Figura 14 - Estrutura química da lignina



Fonte: KLOCK, 2020.

A biodegradação da lignina na natureza é um processo muito complexo, que ainda não está totalmente esclarecido. É catalisado pela enzima, genericamente denominada “lignase”, que é multienzimática e várias reações podem ocorrer: rompimento das cadeias alifáticas e do anel aromático, demetilação, ruptura das ligações carbono-carbono, ruptura das ligações duplas, oxidação e polimerização (CALLOL, 2013).

Alguns dos microrganismos mais estudados, conhecidos por suas capacidades de degradação da lignina, são os fungos de podridão pardos e brancos. Esses microrganismos produzem enzimas lignolíticas, como a lignina peroxidase. Os fungos da podridão branca produzem uma variedade de outras enzimas, que podem promover a degradação da lignina, como lacases e manganês peroxidase. (KAHN; AHRING, 2019). Durante a degradação da lignina, fragmentos de lignina serão produzidos com diferentes estruturas aromáticas.

Os fungos de podridão branca podem degradar a lignina juntamente com a celulose, enquanto os fungos de podridão marrom atacam principalmente a celulose. Os fungos da podridão parda degradam apenas parcialmente a lignina e, durante essa degradação, o teor de hidroxila fenólica da mistura de reação aumenta devido à oxidação parcial e produção de novos grupos carbonila e carboxila degradando a lignina pelo processo de humificação, em que os resíduos de lignina são convertidos em ácidos fúlvico e húmico. Além disso, a degradação da lignina pelos fungos da podridão parda também ocorre por hidroxilação, desmetilação e oxidação das cadeias laterais. Durante a degradação os anéis aromáticos permanecem conservados e os carboidratos são removidos, deixando para trás um resíduo de lignina marrom escuro (HATAKKA; HAMMEL, 2011; GOODELL, 2003).

Ainda que a quantidade de lignina presentes nos suportes celulósicos, especialmente nos utilizados para a elaboração de livros e documentos seja muito pequena, pode provocar reações indesejáveis. Sob a influência da radiação UV e também da luz visível, o papel amarela, a complexa estrutura de lignina muda e, conseqüentemente, vários produtos de degradação de alto peso molecular com propriedades cromóforas separam. Esses produtos de degradação permanecem no papel e influenciam significativamente na usabilidade e longevidade do papel. A presença de grupos hidroxila fenólicos livres e grupos C- α -carbonila é necessária para as reações de oxidação dos radicais induzidos por luz na lignina. Outros fatores importantes de degradação da lignina são as reações hidrolíticas no meio ácido ou alcalino. Além disso, estudos já mostraram que as propriedades ópticas de papéis alcalinos com lignina são menos estáveis do que de papéis livres de lignina (AREA; CHERADAME, 2011).

Apesar dos materiais ligno-celulósicos possuírem em sua composição celulose, hemicelulose e lignina, os fungos fundamentalmente se interessam apenas pela glicose proveniente da celulose, utilizando-a como substrato de metabolismo e crescimento.

1.8 O papel como suporte

Um dos mais antigos meios de conduzir a informação é o papel. Apesar de certa controvérsia quanto ao início da sua produção, a origem do papel está na China no começo do segundo século. Em 105 d.C. T'sai Lun, observando vespas triturando fibras vegetais de bambu e amoreira, verificou a formação de uma pasta celulósica que era usada na construção dos ninhos. Usando o mesmo princípio dos insetos, ele produziu a partir de cascas de amoreira, bambu e redes de pescar, uma pasta úmida que estendeu e colocou para secar, dando origem à primeira folha de papel, cujo princípio básico de produção permanece quase inalterado mesmo após dois mil anos de sua invenção. Somente no século XI a técnica de produção do papel foi levada para a Europa e conseqüentemente ao Ocidente através do movimento das colonizações. Na Europa pré-industrial os papéis geralmente continham fibra de pano e cola de gelatina. Os papéis feitos à mão de outras regiões podiam incluir fibras provenientes do cânhamo, amoreira, casca interior, bambu, palha de arroz assim como vários amidos como colantes ou não colantes (FRITOLI, *et al.*, 2016; AREA; CHERADAME, 2011).

No Brasil, a primeira presença do papel é a carta de Pero Vaz de Caminha, escrita em papel de linho holandês, na ocasião do descobrimento do país (ROTH, 1982). Quanto à manufatura do papel em solo nacional, de acordo com MOTTA e SALGADO (1971), foi realizada pelo botânico e frei José Mariano da Conceição Velozo, datando de 1808, com a chegada da família real e toda a corte portuguesa.

Sendo assim, desde a sua origem, o papel consiste em sua maior parte de fibras de celulose de diferentes fontes de plantas tais como trapos de algodão e linho, gramíneas de linho e bambu, folhas de manilha e sisal ou linho, cânhamo, rami ou juta e, recentemente, da madeira. Cada fibra de celulose dessas fontes tem características próprias que influenciam na estabilidade e permanência do papel. A celulose da madeira nativa, por exemplo, exibe um grau de polimerização acima de 10.000 enquanto que de algodão nativo pode atingir 15.000. (PRONIEWICZ *et al.*, 2002).

Durante todo esse período, desde a descoberta até início do século XX, importantes tecnologias surgiram e permitiram a fabricação do papel a partir de madeiras, o que aumentou bastante a capacidade de produção devido ao fato de a

madeira ser uma matéria-prima renovável. Atualmente, aqui no Brasil, se utiliza o eucalipto como matéria-prima para a celulose sendo esta, a principal matéria-prima para a produção do papel.

A fibra ou material fibroso constituinte do papel é o material celulósico, componente majoritário. Também contem, em menor quantidade, polímeros como lignina, hemicelulose e outras macromoléculas aderidas fortemente às estruturas fitotissulares além de partículas minerais (talco, caolina, carbonato de cálcio, etc), agentes colantes naturais (amido ou resina) ou sintéticos. Os principais comportamentos do papel (propriedades físicas e químicas, estabilidade, degradação, etc) são fortemente dependentes da sua natureza, origem e características dos componentes bem como das suas interações. A estrutura do papel e suas propriedades também são dependentes do seu processo de manufatura (CALLOL, 2013; AREA; CHERADAME, 2011).

No século XIX, com o aumento da demanda por papel os processos para a fabricação do papel a partir da madeira foram desenvolvidos na busca por uma fonte de celulose mais abundante e mais barata. Sendo assim, vários processos de produção papel a partir da madeira foram desenvolvidos e o uso dessas novas tecnologias de produção tornaram o papel manufaturado menos durável e mais passível de deterioração causada, principalmente, pela oxidação da lignina que influencia na estabilidade mecânica. Na indústria de celulose e papel, os processos químicos e as operações unitárias utilizados têm como objetivo a obtenção de um sólido final composto de celulose e hemicelulose, solubilizando a lignina. Esses processos seguem as etapas de: (1) preparação da madeira; (2) extração da celulose e polpação; (3) branqueamento da celulose; (4) refino e (5) secagem e papel acabado. Sendo assim, de todos os processos, o de polpação é fundamental e crítico uma vez que a obtenção de uma massa celulósica (polpa) com menor teor de lignina, influenciando na estabilidade e qualidade do papel. Os processos de polpação podem ser mecânicos ou químicos (alcalina, *kraft* ou ácida) e ambos causam a deslignificação. Na polpação mecânica não ocorre remoção total da lignina o que torna o papel mais quebradiço e amarelado em pouco tempo. Já na polpação química, que é o mais utilizado na indústria, ocorre remoção total da lignina e as fibras de celulose obtidas são mais longas. O processo *kraft* obtém-se a deslignificação sem a degradação da celulose o que torna a polpa obtida de elevada resistência a partir da utilização de NaOH e Na₂S (“licor de cozimento”) a altas

temperaturas (170 a 177°C). Na polpação em meio ácido (processo ao sulfito), são utilizados ácido sulfuroso e íons bissulfito em altas temperaturas (125 a 160°C) obtendo-se uma polpa muito utilizada para produção de papéis brancos, os quais são utilizados para produção de livros. Na etapa de branqueamento da celulose ocorre a remoção da lignina residual por meio de agentes branqueadores como hidróxido de sódio, cloro e seus compostos e o ozônio, sendo assim uma continuação dos processos de deslignificação (TEIXEIRA *et al.*, 2017; PRONIEWICZ *et al.*, 2002).

Dentro de todo esse cenário de novos processos de produção do papel, a partir do século XIX começaram então a surgir os problemas relacionados à preservação dos papéis devido às mudanças nos processos de produção por conta do emprego de tecnologias que diminuíram a qualidade do papel principalmente no que diz respeito à presença de acidez. A produção de papéis de polpa de madeira, sem tratamento, resultou num produto que se tornaria extremamente ácido e quebradiço nos anos seguintes. Além da fragilidade da matéria-prima utilizada, a substituição da antiga cola de animais utilizada na encolagem das folhas por uma mistura de “alumen-breu”, que se transforma em ácido abiético, agravou ainda mais o problema da conservação das obras. Sendo assim, os papéis produzidos a partir da segunda metade do século XIX foram alvo de silenciosa degradação química, só percebida em sua real e preocupante situação no século seguinte, quando já estavam praticamente condenados ao desaparecimento. (FRITOLI *et al.*, 2016)

O papel pode ser deteriorado por agentes físicos, químicos e biológicos. Ele sofre processos de envelhecimento natural que causam degradação molecular do seu principal componente, a celulose, gerando assim uma perda de força da fibra. Isto é manifestado em menor estabilidade mecânica que pode conduzir, algumas vezes, à completa desintegração das folhas de papel. Esses processos de degradação da celulose e/ou polímeros de lignina são causados pela presença de umidade, diferentes ácidos, agentes oxidativos traços de íons de metais de transição (Fe II, Cu II, Cr III), luz, assim como microrganismos. Mais de 140 compostos voláteis (alcoóis, aldeídos, cetonas, ácido carboxílico, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, ésteres, terpenos e terpenoides) podem ser liberados das folhas de papel durante os processos de degradação dependendo da composição química do papel (PRONIEWICZ *et al.*, 2002).

Este material é particularmente susceptível aos processos de biodeterioração por conta da sua composição orgânica e capacidade higroscópica (MELO *et al.*, 2019). Sendo assim, a atividade de microbiodeterioração dos fungos se baseia na capacidade de utilizarem os componentes do papel como fonte de carbono e energia. Além disso, tintas ou meios de impressão usados historicamente na escrita e ilustração podem impactar, a longo prazo, a estabilidade do papel (CALLOL, 2013; TIANO, 2002; AREA; CHERADAME, 2011).

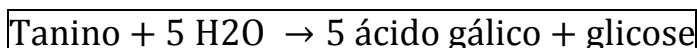
1.9 Tintas ferrogálicas

As tintas ferrogálicas foram um material comum de escrita usadas em manuscritos na Europa e na América desde o século IV até o início do século XX. (ZAMORANO, 2018) Inicialmente sintetizadas na Europa ocidental no século XII e utilizadas no Brasil até o início do século XX (LEAL, 2010; ALBRO E BIGGS, 2008), as tintas metaloácidas possuíam excesso de metais em sua composição com alta tendência a se oxidarem, como o Fe (em grande maioria) e o Cu, ameaçando a integridade de documentos importantes, como os de importância científico-cultural nos dias atuais. Isso porque elas são compostas por elementos que são degradados pelos processos de envelhecimento, acidificação e oxidação chegando ao ponto de perfurar o documento e colocar a conservação e a integridade do manuscrito e as informações exclusivas que ele contém em perigo (ZAMORANO, 2018).

A literatura reporta que as tintas ferrogálicas são uma mistura de diferentes ingredientes orgânicos e inorgânicos que reagem entre si para gerar um produto líquido que é consistente e adequado para a escrita. Considerando a variedade de materiais que podem ser adicionados para preservar, para criar odor, para engrossar, dentre outros, inúmeras podem ser as combinações químicas (ZAMORANO, 2018). Fabricadas por artesãos, são desde os tempos antigos uma das tintas mais usadas. Consistem de vitríolo (sulfato ferroso, FeSO_4), extrato de galha de carvalho (tanino vegetal), um meio de extração (como água, vinho, urina, álcool ou vinagre) e goma arábica como dispersante e meio ligante. O vitríolo é contaminado em várias percentagens com sais, na maioria das vezes, de sulfatos de cobre, manganês, alumínio ou zinco. Estes contaminantes são característicos das

tintas ferrogálicas históricas. Pela exposição ao oxigênio atmosférico, o complexo preto de galatonato férrico (Fe III) é formado (FAUBEL *et al.*, 2007). Dessa forma, o processo de formação da tinta se dá a partir de algumas etapas. Primeiro, o tanino é hidrolisado liberando o ácido gálico (Figura 15).

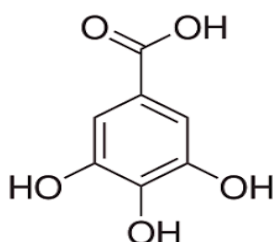
Figura 15 - Reação de hidrólise do tanino



Fonte: A autora, 2020.

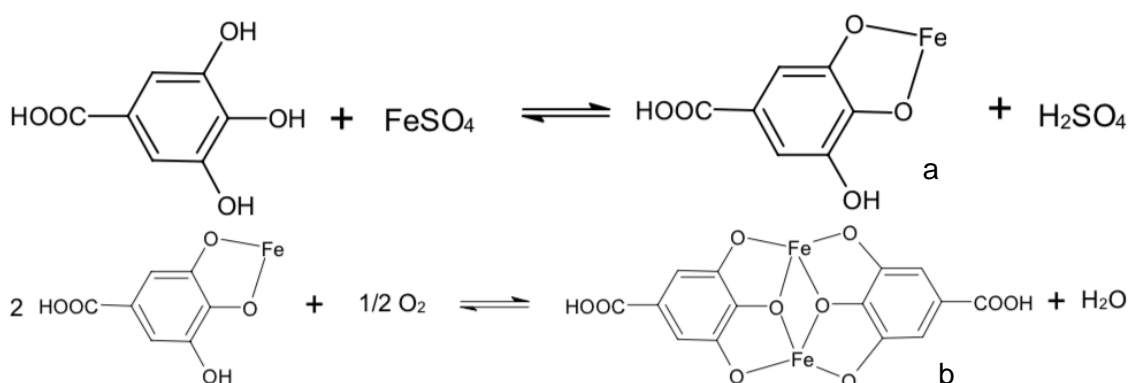
A reação entre o ácido gálico (Figura 16) e o sulfato de ferro gera uma tinta de coloração preta como é conhecida. Para obter esse ácido era essencial que os polifenóis presentes nos taninos de vegetais (provenientes de galhas, crosta de granada, etc) fossem hidrolisados. Este processo era realizado por maceração ou fervura dos diferentes componentes principalmente em água ou vinho. Como o aumento da temperatura acelerava a reação, algumas vezes a maceração era exposta ao sol, ou produtos alcóolicos eram usados no lugar da água. Sulfato ferroso, puro ou contendo impurezas como cobre ou zinco, era adicionado à mistura geralmente seco e moído e, em pouco tempo ocorria a mudança de cor da mistura com a formação do galotاناتo ferroso e do ácido sulfúrico, conforme reação química apresentada na Figura 17a. O complexo estável de Fe^{3+} é resultante da oxidação do galotاناتo ferroso com o oxigênio do ambiente, conforme a reação apresentada na Figura 17b. O galotاناتo férrico que dá origem à cor castanho-escuro (ZAMORANO, 2018).

Figura 16 - Estrutura química do ácido gálico



Fonte: A autora, 2020.

Figura 17 - Reações de formação do galotanato ferroso (a) e do galotanato férrico solúvel em água (b)

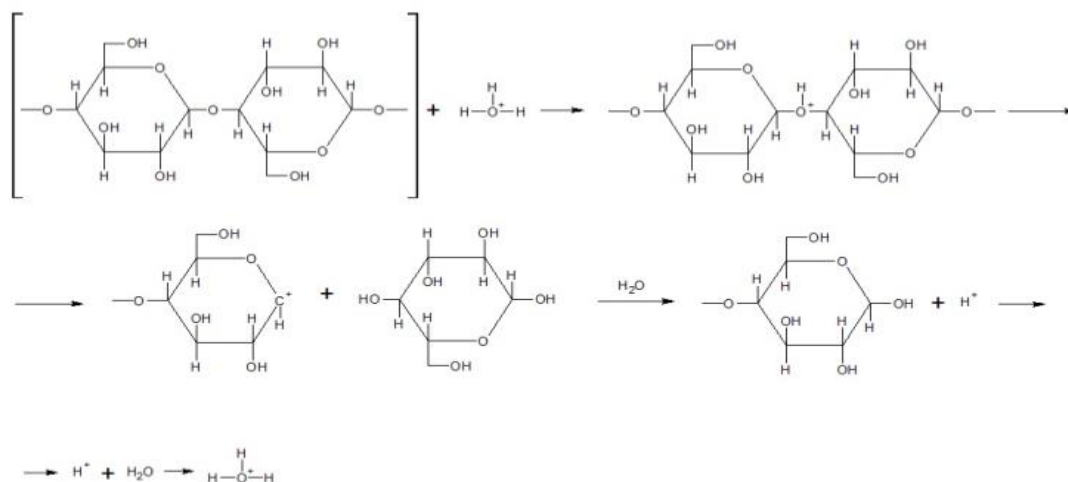


Fonte: MAITLAND, 2009.

As concentrações dos reagentes variavam entre os fabricantes e muitas delas continham excesso de ferro em sua composição; além de outros elementos traços, como o cobre, geralmente usados para intensificar a cor. Pode ser que haja um excesso de íons Fe²⁺ em relação à quantidade de tanino durante a produção da tinta uma vez que 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). Dessa forma, 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).

Esse excesso de ferro presente na tinta pode contribuir para a degradação dos 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 (COSTA *et al.*, 2016). Com relação à hidrólise ácida, sabe-se que a degradação da celulose é conhecida como dependente do pH do meio macromolecular e ocorre segundo o mecanismo básico apresentado na Figura 18.

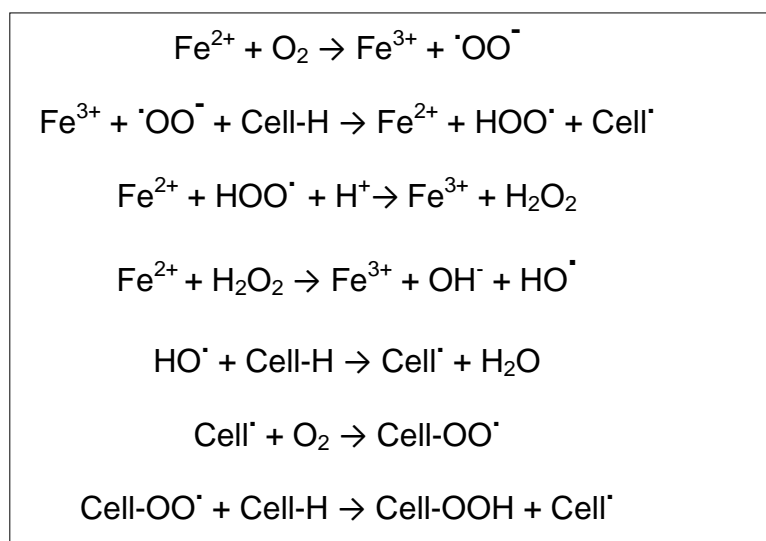
Figura 18 – Mecanismo de hidrólise ácida da celulose



Fonte: STRLIČ; KOLAR, 2005.

O segundo mecanismo é aquele no qual os íons ferro solúveis catalisam reações de oxidação em dois processos distintos: no primeiro os íons ferro contribuem para a quebra das cadeias de celulose, liberando radicais orgânicos e peróxidos que são altamente reativos também resultando em um decréscimo na quantidade de polímeros de celulose (COSTA *et al.*, 2014). A oxidação ocorre via reação de íons Fe^{2+} com peróxidos (produzidos durante a oxidação de materiais orgânicos). Libera, assim, radicais hidroxilas, extremamente reativos, em uma reação conhecida como Reação de Fenton (Figura 19).

Figura 19 – Sistema de Fenton



Fonte: NEEVEL, 1995

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 oxirradicais.

A deterioração do papel causada pelas tintas ferrogálicas também chamada de corrosão da tinta ferrogálica é conhecida há muito tempo. Além da corrosão da própria tinta, causada pelo seu envelhecimento e exposição ao ambiente, a corrosão do excesso do vitríolo a óxidos de ferro e ácido sulfúrico e outros metais de transição presentes, especialmente cobre contribuem para a deterioração do papel por catalisarem os processos de oxidação da celulose (FAUBEL *et al.*, 2007).

Sendo assim, a corrosão química do papel está intrinsicamente ligada aos componentes básicos da tinta ferrogálica que podem gerar a despolimerização da celulose. Esta 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. Em papéis ácidos, produzidos mais ou menos no período de 1850-1990, a hidrólise catalisada por ácido prevalece sobre a oxidação.

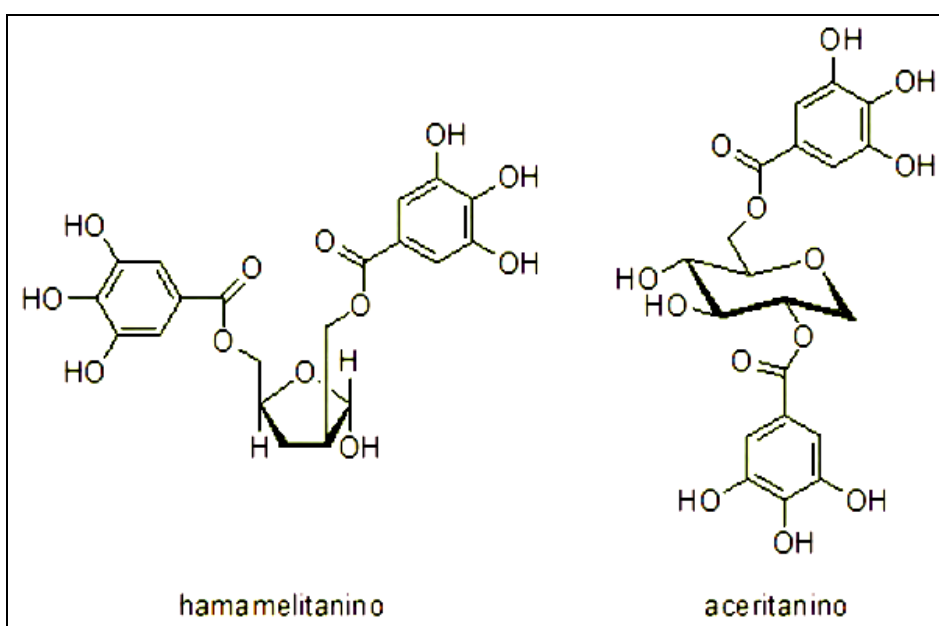
No trabalho de FIGUEIRA *et al.* (2020), foram realizados estudos sobre as manchas de *foxing* em três coleções de papel dos séculos XVI a XX. Verificaram que, a despeito de vários fatores poderem contribuir para as manchas de *foxing*, a presença de impurezas contendo ferro ao longo da folha de papel e uma distinta absorção da umidade devido a vários fatores é, de acordo com o ponto de vista dos autores, a maior responsável pela incidência de *foxing* sendo o crescimento dos fungos dentro das manchas de *foxing* não mais do que um ato oportunista.

O excesso de oxidação nas tintas ferrogálicas de preparações antigas não está atribuída somente à presença do ferro, mas também à fonte de tanino usado já que ele pode impactar na composição da tinta e no seu comportamento ao envelhecer junto ao papel. Sendo assim, a tinta está sujeita a variações de composição e concentração inerentes a produtos naturais. Isso pode dar origem a uma tinta ferrogálica mais ou menos corrosiva ao suporte celulósico (COSTA *et al.*, 2014).

Os taninos são substâncias complexas presentes em inúmeros vegetais. De acordo com sua estrutura química são classificados em hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são constituídos por diversas moléculas de ácidos fenólicos, como o gálico e o elágico, que estão unidos a um resíduo de glicose central. São chamados

de hidrolisáveis uma vez que suas ligações ésteres são passíveis de sofrerem hidrólise por ácidos ou enzimas. O ácido gálico, espécie química responsável pela reação de complexação com o ferro, é produzido a partir da hidrólise dos taninos hidrolisáveis. Em solução desenvolvem coloração azul com cloreto férrico, assim como o ácido gálico. A Figura 20 apresenta as fórmulas estruturais de dois taninos hidrolisáveis.

Figura 20 - Fórmulas estruturais de taninos hidrolisáveis



Fonte: PORTAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2020.

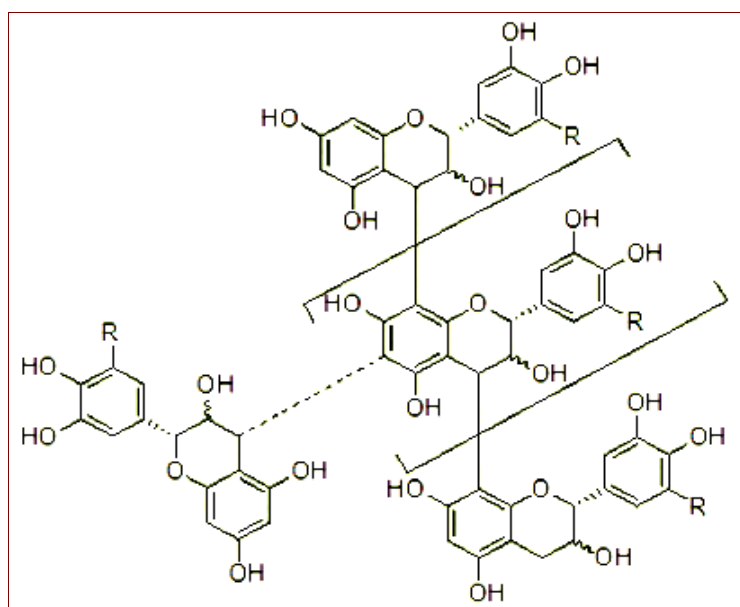
Os taninos condensados incluem todos os outros taninos verdadeiros. Suas moléculas são mais resistentes à fragmentação e estão relacionadas com os pigmentos flavonóides, tendo uma estrutura “polimérica” do flavan-3-ol, como a catequina, ou de flavan-3,4-diol, da leucocianidina. Sob tratamento com ácidos ou enzimas esses compostos tendem a se polimerizar em substâncias vermelhas insolúveis, chamadas de flobafenos, que conferem a coloração vermelha de diversas cascas de plantas (Portal Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2020).

Os taninos condensados (Figura 21) são altamente resistentes à hidrólise e isso explica sua natureza não reativa com o ferro explicando então o fato de os íons de ferro serem facilmente liberados. Dessa forma, a corrosão do papel é acelerada pelo excesso de ferro já que apenas uma pequena quantidade de taninos reativos se

associa ao ferro na formação do galatonato férrico. Sendo assim, são poucos íons Fe que ficam associados aos taninos. Os demais ficam livres, em excesso, acelerando a corrosão.

Além disso, a oxidação acelerada ocorre devido ao envelhecimento natural das próprias tintas ferrogálicas. Ocorre formação de cristais na superfície das fibras de papel devido ao excesso sal inorgânico.

Figura 21 – Modelo de estrutura dos taninos condensados



Fonte: PORTAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, 2020.

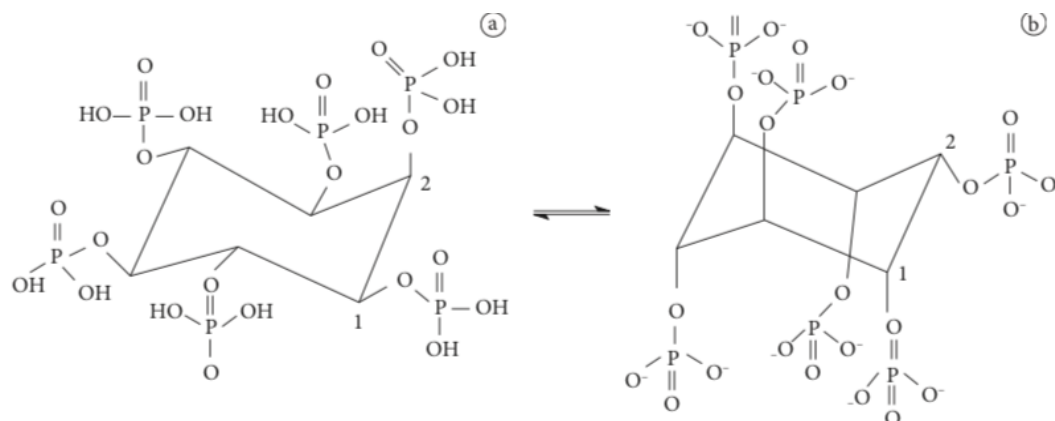
No trabalho realizado por COSTA *et al.*(2014) foi verificado que, dependendo da fonte de tanino utilizado nas preparações das tintas ferrogálicas estudadas, os níveis de oxidação do ferro foram nitidamente diferentes e tal observação foi realizada a partir da microscopia de varredura eletrônica que identificou partículas de cristais e agregados confirmando a baixa reatividade entre o ferro e os taninos em diferentes preparações. Os sedimentos geralmente encontrados em documentos contendo tintas ferrogálicas são cálcio, potássio e ferro oxalatos, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio e sulfato ferroso. O processo de cristalização é geralmente caracterizado por microscopia óptica e, em alguns casos, é claramente observado macroscopicamente.

Em outro trabalho desenvolvido por COSTA *et al.* (2013), diferentes preparações de tintas ferrogálicas (variando proporções estequiométricas e fonte de taninos) foram realizadas a fim de verificar os processos de envelhecimento natural e térmico das tintas ferrogálicas utilizando ferramentas arqueométricas de investigação. O estudo concluiu que o excesso de ferro das tintas ferrogálicas oxidaram de forma diferente dependendo da fonte de tanino utilizada e que os taninos condensados apresentaram taxas de oxidação maiores, por terem maior excesso de ferro que não ficou associado a eles. Sendo assim, os taninos condensados não são desejáveis devido à sua natureza quelante diferenciada.

Diante disso, 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. Quanto à adição de compostos alcalinos para neutralizar a hidrólise ácida, são usadas soluções aquosas de hidrogenocarbonatos de cálcio ou de magnésio, ou soluções ou suspensões dos seus óxidos, alcoolatos, etc., em solventes orgânicos. Quanto à adição de antioxidantes para inibir o processo oxidativo catalisado por metais nas reações de Fenton, o ácido fítico é utilizado pois ele inibe e/ou retarda a formação dos radicais livres (Figura 22).

O trabalho realizado por QUIRRENBACH *et al.* (2009) estudou o grau de interação do ácido fítico com os íons metálicos Fe (II) e Fe (III), de importância biológica e revisou dados da literatura que apresentaram o potencial antioxidante do ácido fítico em sistemas alimentares. Os resultados mostraram que o ácido fítico apresenta potencial para quelar ferro. Dessa forma, ele suprime a catálise desse íon nas reações oxidativas. Na prática, diversos trabalhos envolvendo as tintas ferrogálicas utilizam o sal fitato de cálcio que atua na remoção do excesso de íons Fe^{3+} (COSTA *et al.*, 2014, COSTA *et al.*, 2013; NEEVEL, 2005). O fitato de cálcio interage com os íons de ferro, promovendo a quelação do mesmo, removendo seu excesso da tinta (Figura 23).

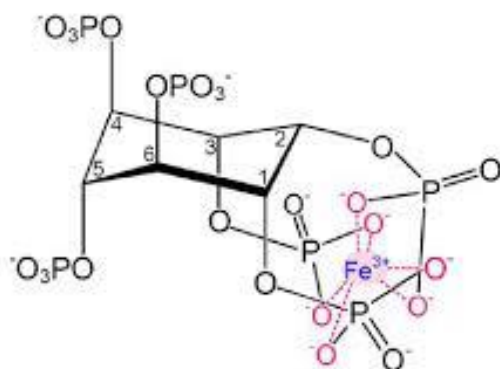
Figura 22 - Conformações do ácido fítico



Legenda: a) uma posição axial e cinco equatoriais; b) cinco posições axiais e uma equatorial.
 Fonte: QUIRRENBACH *et al.*, 2009.

A estrutura do ácido fítico com seis fosfatos no plano equatorial da molécula é capaz de bloquear todas as posições do ferro impedindo que ele catalise o sistema de Fenton com a consequente formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Outro ponto importante, é que o complexo de ferro com o fitato possui constante de complexação menor que a do ferro com o ácido gálico, evitando assim a destruição do pigmento (NEEVEL, 1995).

Figura 23 - Complexo fitato-ferro



Fonte: Adaptado de NIELSEN *et al.* (2013).

1.10 Envelhecimento do papel

A deterioração do papel é um processo inevitável gerado por vários fatores intrínsecos tais como colagem, preenchimento, adesivos, presença de grupos ácidos, íons metálicos, lignina, produtos de degradação, etc. Além disso, temperatura, luz, umidade, oxigênio, poluição e microrganismos são os principais fatores ambientais que podem afetar as coleções dos manuscritos. A estabilidade à longo prazo, de obras de arte feitas de papel é determinada pela extensão de reações hidrolíticas e oxidativas ocorrendo durante o envelhecimento da celulose e que progressivamente reduz as propriedades físico-mecânica e química do papel, resultando finalmente em uma total perda da qualidade do material (HAJJI *et al.*, 2016).

A questão de estudar os efeitos à longo prazo dos tratamentos de conservação e os mecanismos de específicos processos de deterioração apresenta um enorme obstáculo visto que o processo de envelhecimento natural do papel é muito lento para permitir a observação de mudanças em um tempo razoável. A solução para superar esse problema é a aplicação de métodos de envelhecimento artificial ou acelerado. Estes métodos consistem em expor o papel a condições físicas e/ou extremas em termos de temperatura, umidade, poluentes ácidos, iluminação intensiva e agentes oxidantes, de forma a acelerar o processo de degradação. Por comparação entre amostras tratadas e não tratadas tenta-se determinar o efeito esperado do tratamento de conservação. Além disso, o envelhecimento acelerado é também considerado uma aproximação confiável do envelhecimento natural para a previsão da longevidade do papel (HAJJI *et al.*, 2016).

Existem três mecanismos envolvidos no processo de degradação do papel. O primeiro, que é a reação mais comum, é a degradação hidrolítica das moléculas de celulose, na qual a presença de água (umidade) desempenha um papel fundamental. De acordo com os princípios padrão da cinética reacional, a taxa dos processos hidrolíticos é determinada pela temperatura, acidez (valor de pH) e a quantidade de umidade presente no papel. O conteúdo de umidade é novamente dependente da umidade relativa no ambiente de estocagem. O segundo processo de deterioração é a degradação oxidativa da celulose, primariamente induzida pela

presença de oxigênio do ar do meio ambiente. O terceiro mecanismo de deterioração é o processo da degradação térmica. Esse mecanismo diz respeito à quebra das ligações como uma consequência dos movimentos temperatura-dependentes das moléculas de celulose e seus átomos constituintes. A deterioração dos materiais de papel também se deve à poluição do ar, ataque biológico e presença de microrganismos como bactérias e fungos (MANSO *et al.*, 2006).

Sendo assim, os testes de envelhecimento acelerado do papel são realizados com três objetivos principais. O primeiro é estabelecer em um prazo conveniente a classificação relativa dos materiais, com relação a sua estabilidade química ou durabilidade física, ou seja, classificam materiais e sistemas no que diz respeito à sua estabilidade em relação a um ao outro sob um dado conjunto de condições de forma que os relatórios de estudos de envelhecimento acelerado costumam colocar os materiais em uma escala de classificação. O segundo é estimar ou “prever” a capacidade de manutenção em potencial à longo prazo dos sistemas de materiais nas condições de uso esperadas; e o terceiro é elucidar as reações químicas envolvidas (o “mecanismo” de degradação) e suas consequências físicas. Uma faceta importante desse esforço é a divulgação do padrão geral de deterioração, isto é, se os processos se aceleram com o tempo, se há um período de indução ou se vários estágios distintos são observáveis antes da falha. O objetivo final desta terceira área de investigação é o desenvolvimento de técnicas que podem monitorar a extensão da degradação e métodos pelos quais a vida útil de materiais podem ser estendidos. Esses três objetivos principais são citados na ordem da facilidade em que eles podem ser alcançados (FELLER, 1995).

No estudo realizado por CIGLANSKÁ *et al.* (2014), os autores utilizaram três tipos de técnicas para proceder o envelhecimento acelerado na investigação da influência dos poluentes no envelhecimento acelerado do pergaminho com tintas ferrogálicas. A primeira foi o envelhecimento acelerado das amostras em tubos fechados (100 mL) à temperatura de 100°C de acordo com o método descrito na padronização da ISO 5630-5 em forno por 28 dias. Imediatamente após esse prazo, as amostras foram acondicionadas a 23°C e 50% de UR por 24 h. A segunda técnica de envelhecimento foi conduzida em atmosfera com SO₂. Os tubos contendo as amostras foram tratados com gás SO₂ por 40s antes do envelhecimento e depois fechados e envelhecidos a 100°C no mesmo forno já mencionado por 28 dias. E a terceira técnica de envelhecimento foi conduzida em atmosfera de NO_x. O

procedimento foi conduzido sob as mesmas condições que os anteriores mas os tubos foram tratados com NO_x por 40 s antes do envelhecimento em forno por 28 dias. Verificaram que a presença de tintas e poluentes atmosféricos (SO₂ e NO_x) aumentaram os prejuízos oxidativos do pergaminho. (CIGLANSKÁ *et al.*, 2014)

No trabalho realizado por HAJJI *et al.*, 2016, técnicas de envelhecimento artificial foram empregadas para analisar a performance a longo prazo dos tratamentos de conservação-restauração aplicados em bibliotecas marroquinas, para prever e classificar o comportamento de papéis restaurados em condições extremas de armazenamento. Para tal utilizaram como técnica de envelhecimento artificial o tratamento térmico usando calor seco e calor úmido.

Documentos contendo tintas ferrogálicas, também sofrem processos de envelhecimento natural e, conseqüentemente, estão sujeitos à oxidação dos seus componentes. A fim de se reproduzir esse cenário que duraria anos para compor, as técnicas de envelhecimento acelerado ou artificiais são estudadas e vêm sendo utilizadas em laboratórios. No entanto, existem falhas de padronização de tais técnicas. Geralmente, os procedimentos envolvem a submissão da amostra à tratamento térmico e à determinadas condições de umidade relativa contra o tempo.

Existem muitas técnicas padronizadas diferentes para o envelhecimento acelerado (por exemplo, ISO, TAPPI e ASTM), envolvendo muitas diferenças nos próprios métodos, mas adicionalmente, muitos autores decidem aplicar condições não padronizadas (AREA; CHERADAME, 2011).

Mediante isto, um novo método tem sido usado para acelerar o envelhecimento de papéis dentro de tubos de vidro herméticos a 100°C por 5 dias de forma a medir a retenção de suas propriedades de resistências originais. Este teste foi utilizado como a norma de envelhecimento ASTM (SHAHANI, 2004).

Essa técnica foi desenvolvida no trabalho de COSTA *et al.*, 2013 onde foi estudado o envelhecimento térmico e natural de tintas ferrogálicas usando diferentes fontes de taninos.

1.11 Fluorescência de Raio-X

Atualmente é grande o interesse de muitos pesquisadores, de diversas áreas, em experimentar técnicas não destrutivas para a identificação e/ou remoção desses metais em excesso, sem agressão ao suporte (COSTA *et al.*, 2016). De modo a acessar os danos a tais documentos, tem sido necessário acessar pelo menos microamostras de suporte para permitir a análise. Entretanto, o dano causado aos documentos pela amostragem é dificilmente aceitável e pode até conduzir, subsequentemente, a maiores prejuízos. Em muitos casos, o tamanho de uma microamostra não é suficiente para realizar procedimentos clássicos de avaliação (FAUBEL *et al.*, 2007). Sendo assim, a capacidade de avaliar a condição de objetos com valor cultural cuja natureza é papel com a utilização de uma ferramenta de análise não destrutiva é de grande importância, visto que os resultados podem fornecer uma base de dados para o desenvolvimento de uma política de conservação equilibrada, adequada e não invasiva.

Existem diversas técnicas não destrutivas voltadas para a conservação do patrimônio cultural, onde é imprescindível a integridade do material, uma vez que se trata geralmente de peças únicas e originais (MUSÍLEK *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-GARRIDO *et al.*, 2018; ERENOGLU *et al.*, 2017; LACLAVETINE *et al.*, 2016; LUTTEROTTI *et al.*, 2016). Sendo assim, uma atenção intensiva tem sido focada na aplicação de técnicas espectroscópicas não invasivas tais como a difração de raio-X (XRD), Espectroscopia de indução de raios-X por partículas (PIXE), Fluorescência de raio-X (FRX), Espectroscopia Raman (RS), análises fotográficas e reflectografia infravermelha (IR), luz visível, iluminação tangencial e luz visível com iluminação ultravioleta (UV), que promovem informações valiosas no estado atual de amostras históricas. Com objetivo de evitar os efeitos indesejáveis da conservação, estas técnicas são aplicadas com sucesso também para a simulação dos processos de envelhecimento usando novas amostras de laboratório (CIGLANSKÁ *et al.*, 2014; SANCHES *et al.*, 2020).

A análise de fluorescência de raio-X (FRX) é uma excelente ferramenta não destrutiva para a análise da composição elementar dos materiais em uma grande quantidade de obras de arte e pode servir para identificar esses materiais. (TROJEK *et al.*, 2014). Pelo menos três razões justificam sua aplicabilidade do estudo de

materiais de interesse cultural: a) Trata-se de uma técnica elementar, que permite a identificação dos materiais componentes de um objeto, como também o estudo de sua proveniência e tecnologias de fabricação; b) não é destrutiva, prestando-se à análise de objetos únicos e de grande relevância artística; c) adequa-se à instrumentação portátil, o que possibilita seu emprego no interior de museus e laboratórios de restauro para análise de obras de difícil locomoção, por serem frágeis ou de grandes proporções (FERRETTI, 2009).

Não é fácil distinguir as tintas ferrogálicas corrosivas das demais tintas (bistre e sépia) com menos envelhecimento no estágio na qual elas ainda não mostram sinais de corrosão. Assim, a identificação das tintas é de tamanha importância não apenas para entender a história e estética de um objeto, mas também para avaliar os riscos relacionados ao seu uso bem como avaliar os adequados tratamentos de conservação. Diferentes métodos analíticos podem ser usados para a identificação das tintas como a fluorescência por raio-X e a espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) que têm sido aplicadas para identificar tintas (REHÁKOVÁ *et al.*, 2017).

O uso da espectroscopia de fluorescência de raio-X para identificação de metais em manuscritos contendo tinta ferrogálica além de ser um método não destrutivo, também tem a vantagem de ser um instrumento portátil, podendo ser facilmente conduzido ao local específico onde a obra se encontra, quando esta não pode ser retirada do seu ambiente de guarda. Além disso, essa técnica consegue identificar elementos em baixíssimas concentrações, apenas como traços. As principais vantagens oferecidas por essa técnica são: pequenas amostras são necessárias sem necessidade de preparação especial prévia; gases ou reagentes químicos não são necessários; uma análise multielementar pode ser conduzida; alta resolução transversal fornecida (micrômetros na faixa de milímetros); depois da análise a amostra está preservada (SANTINI, 2019)

De acordo com LACLAVETINE *et al.* (2019), a aplicação da técnica de fluorescência de raio-X para o estudo de materiais e técnicas utilizadas em xilogravuras teve o objetivo de analisar a composição química da tinta e do papel e definir a sequência das camadas impressas de forma a entender como os artistas e seus trabalhos obtiveram os efeitos visuais, demonstrando a grande potencialidade e habilidade das técnicas de espectroscopia não invasivas utilizadas nas pesquisas relacionadas à história e à arte.

Um desenvolvimento fundamental na leitura e digitalização de manuscritos antigos, escritos à mão, foi estudado usando análises químicas por espectroscopia de fluorescência de raio-X e tomografia de raio-X para decifrar palavras e desenhos dentro de um livro fechado do século 18 de 200 páginas e escrito a mão. O ferro presente nas antigas tintas ferrogálicas era essencial para fornecer contraste de raio-X suficiente em comparação com o carbono moderno ou tintas orgânicas. Esses resultados foram apresentados como um passo em direção à leitura não invasiva de documentos frágeis e/ou não abertos (WEST, 2016).

No trabalho de CAMPOS *et al.* (2014), o uso da espectroscopia EDXRF (Energy-Dispersive R-Ray Fluorescence) e imagem foram utilizadas como técnicas não invasivas para analisar pinturas do artista brasileiro Oscar Pereira da Silva. Os resultados da EDXRF permitiram identificar os elementos químicos presentes nos pigmentos mostrando o uso de muitos pigmentos baseados em ferro, outros modernos tais como o cobalto azul e o cádmio amarelo assim como pigmentos brancos, contendo chumbo e zinco, usados pelos artistas em diferentes camadas.

SANCHES *et al.* (2020) usaram em seu trabalho as técnicas de XRF, μ XRF, XRD e espectroscopia Raman na caracterização de uma estatueta de madeira de “Nossa Senhora da Conceição Aparecida”. A análise da fluorescência de Raios -X foi conduzida em 66 pontos distribuídos na peça e o mapeamento da composição elementar da camada de pigmento e da camada de revestimento foi conduzido usando a μ XRF. As análises foram úteis para detectar nove elementos: Si, S, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn e Sr. Através das imagens do mapeamento elementar obtidas com μ XRF, foi possível distinguir a distribuição desses elementos entre a camada de revestimento e o pigmento. A combinação das técnicas de XRF e μ XRF foi muito útil na determinação dos elementos e sua distribuição na camada do pigmento, onde foram encontrados os elementos Si, S, K, Ti, Mn e Fe. Esses resultados, juntamente os obtidos pelas medidas por espectroscopia Raman, concluíram que o pigmento usado foi o Brunt Sienna.

A literatura reporta o uso da fluorescência de raio-X como técnica não destrutiva e não invasiva de análise em muitos trabalhos relacionados não apenas à conservação do patrimônio histórico cultural como também à área de arqueologia contribuindo significativamente, na caracterização de uma ampla gama de artefatos, muitas vezes acompanhadas por uma gama de técnicas complementares. No trabalho de FRAHM *et al.*, 2013, o estudo de revisão revelou a pertinência da

utilização do FRX portátil (pFRX) como técnica de análise facilitadora em campos de escavação e estruturas históricas. No entanto, esse estudo de revisão revelou que apenas 43% dos documentos arqueológicos realmente contaram com instrumentos portáteis e em apenas 3% foi utilizado em campo, o que revela a necessidade do entendimento de mudanças na abordagem metodológica e teórica que envolve espaço, contexto e estruturas relacionadas.

No trabalho de RUBIO-BARBERÁ *et al.* (2019) foi utilizado um sistema portátil de fluorescência de raio X dispersivo de energia (pEDXRF) no estudo da composição metálica de uma importante coleção de estatuetas de bronze ibero-romanas expostas no museu arqueológico de Sagunto (Espanha). A técnica permitiu identificar com sucesso, pela primeira vez, a composição metálica de 20 estatuetas arqueológicas de bronze de Sagunto, apesar das limitações para efetuar as medições em objetos arqueológicos valiosos e frágeis.

1.11.1 Técnica da Fluorescência de Raio-X (FRX)

A espectrometria de FRX é uma técnica analítica elementar quali-quantitativo cujos princípios físicos são simples e baseiam-se na indução de transições eletrônicas entre os orbitais mais internos dos átomos quando são submetidos à radiação por meio do uso de uma fonte externa de excitação controlada. Essa fonte de energia pode ser de vários tipos: radiações eletromagnéticas de energia adequada como os raios X e os raios gama, feixe de partícula e/ou feixe de elétrons primários provenientes de aceleradores de elétrons (síncrotron) ou ainda radiações alfa de fontes radioativas. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron e esta energia é emitida na forma de um fóton de raio-X de energia característica que permitem a identificação da espécie atômica envolvida na transição, sendo possível medir sua abundância. Este fóton, quando possui energia na faixa da energia dos raios-X, é então denominado de raios X característicos. A diferença de energia da transição da camada mais externa para a camada mais interna é própria de cada átomo. A intensidade da emissão das linhas espectrais com energias características do elemento está relacionada com a concentração do elemento na amostra. Sendo assim, neste processo, a energia de radiação de

fluorescência identifica o elemento e a partir da sua intensidade é possível medir sua concentração na amostra analisada mediante uma prévia calibragem. Assim, de modo resumido, a análise de fluorescência de raio-X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios-X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios-X (FERRETTI, 2009; TROYAK, 2020; PEREIRA JUNIOR, 2014; NASCIMENTO FILHO, 1999).

O rendimento da fluorescência tem relação com o número de fótons de raios X emitidos, sendo dependente do número atômico do elemento e da transição envolvida. Átomos de número atômico menor que 20 têm menor rendimento de fluorescência de raios X do que elementos de maior número atômico.

A identificação dos raios-X característicos pode ser feita através de diferentes configurações que integram a espectroscopia de fluorescência de raios-X, como a fluorescência de raio-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF – *Wave Length Dispersive X-Ray Fluorescence*), a fluorescência de raio-X por dispersão de energia (EDXRF – *Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*). As intensidades medidas destes raios-X característicos (número de fótons detectados por unidade de tempo) estão relacionadas com as concentrações dos elementos na amostra. Dentro do campo da fluorescência de raios-X por dispersão de energia existem várias formas além da convencional na busca pela otimização da medida. Elas são denominadas fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF – *Total Reflection X-Ray Fluorescence*) e fluorescência com microfeixe (μ -XRF – *Micro X-Ray Fluorescence*). Todas essas técnicas analíticas de fluorescência são aplicadas em estudos de patrimônio cultural, porém, a técnica de EDXRF vem ganhando vários adeptos devido a sua simplicidade, velocidade de informação, portabilidade e ao baixo custo, em comparação às demais técnicas (ASFORA, 2010).

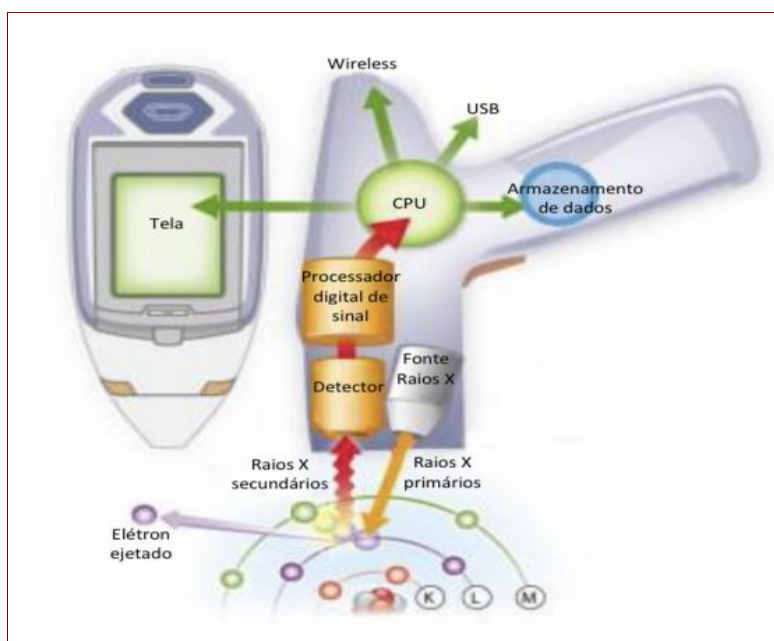
A espectrometria de fluorescência de raios-X portátil (pXRF) tem ganhado destaque nos últimos anos principalmente por conta dos avanços tecnológicos na miniaturização e na tecnologia dos semicondutores. Dentro da comunidade arqueológica, ganharam considerável atenção uma vez que é bastante adequado para análise “*in situ*”, facilitando as pesquisas e análises em objetos de valores inestimáveis cujo acesso é difícil. Permite a aquisição de uma maior quantidade de dados, baixo custo efetivo por amostra, agilidade na obtenção de resultados e tomada de decisão em tempo real. A portabilidade significa a seleção de todos os componentes com ênfase na minimização da massa e do consumo de energia em

um instrumento ergonomicamente projetado (FRAHM; DOONAN, 2013; PEREIRA JUNIOR 2014).

Um trabalho realizado recentemente no Museu de Astronomia e Ciências Afins (MAST) (HANNESCH *et al.*, 2019) avaliou a obra do Formulário Médico, um manuscrito sem autoria do século XVIII, atribuído à ordem Jesuítica. A obra, contendo uma série de receitas medicinais utilizadas pelos jesuítas, está escrita em tinta metaloácida sobre papel de trapo. Várias partes do formulário foram analisadas em ensaios não destrutivos, visando avaliar a presença de elementos químicos constituintes do papel e da tinta, através da técnica de fluorescência de raios-X. Nos testes analíticos foi utilizado um espectrômetro portátil, facilitando as análises por conta da facilidade do mínimo manuseio da obra. Através da análise, verificou-se pela composição da tinta que ela possuía natureza artesanal, de receita desconhecida, mas que o ferro era um dos principais dos seus componentes e, portanto, se tratava de uma tinta ferrogálica. A natureza da tinta, portanto, explicava grande parte dos processos corrosivos em andamento, como a oxidação e a corrosão do suporte bem como presença de áreas onde a tinta encontrava-se bastante esmaecida. Também foi afirmado, com base no exame de fluorescência de raios-X, uma composição distinta de dois grafites utilizados na composição dos manuscritos. Sendo assim, a técnica ajudou a elucidar de maneira assertiva, os problemas encontrados no volume com relação à tinta de escrita, que provocou oxidação do suporte em diferentes partes do volume.

A configuração de um aparelho de FRX portátil consiste basicamente de uma fonte de excitação, um porta amostras, um detector, um analisador e um processador de pulso, conforme esquema apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Esquema da configuração básica do aparelho portátil de Fluorescência de Raio-X (FRX)



Fonte: Adaptado de THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2021.

Sendo assim, como vantagens desse método se pode citar: a preparação mínima da amostra, ser uma metodologia não destrutiva, ser aplicável para uma grande faixa de concentrações, ser um método preciso e de espectro simples. Como desvantagens: os elementos leves possuem sensibilidade limitada, efeitos da matriz e interferências espectrais entre elementos e a baixa penetração dos raios-X de fluorescência na matéria, da ordem de dezenas de microns, em função do elemento fluorescente e da matriz que limita a informação analítica aos estratos mais superficiais do material estudado, o que constituindo uma das principais limitações desta técnica (FERRETTI, 2009; TROJEK, 2020).

2 METODOLOGIA

A descrição da metodologia utilizada será feita de maneira separada, em duas partes, em função da realização de trabalhos em torno dos dois principais eixos: I. Biodeterioração de peças museológicas – o Trono Imperial e a obra de Cândido Portinari; II. Emprego de técnica não destrutiva de análise de documentos contendo tintas ferrogálicas.

2.1 Parte I: Biodeterioração de peças museológicas

2.1.1 Peça Museológica I: Trono Imperial

2.1.1.1 Características da peça museológica

O Trono, considerado uma das peças mais preciosas e de maior relevância no acervo do Museu Imperial (Figura 25) representa o poder imperial, pelo seu caráter simbólico e evocativo, tendo um significado ímpar para a instituição que é dedicada à preservação da memória do império (CANCLINI, 1998).

Figura 25 - Trono de D. Pedro II



Fonte: A autora, 2018.

Com 1,75 m de altura, o trono imperial pertenceu ao Paço da Quinta de São Cristóvão, e após o regime monárquico esta peça foi para o Museu Histórico Nacional sendo nos anos de 1940 transferido para o Museu Imperial. A sua manufatura é em talha dourada com estofamento em veludo verde no encosto, assento e braços.

O encosto é em medalhão oval com estreita moldura. No centro, encimada por uma estrela, está a sigla P.II.I (Pedro II Imperador) entre duas palmas atadas por um laço, todos bordados a fios de ouro.

O medalhão liga-se ao bastidor do assento por um suporte de folhas estilizadas e as hastes laterais formam a moldura do espaldar. Folhagens de acanto, em voluta, encimando o medalhão e partindo das mesmas hastes são sustentadas sob o friso do dragão de Bragança, sentado, voltado a $\frac{3}{4}$ para a esquerda, com dois estandartes de cada lado. Os pés dianteiros são representados por duas esfinges cujas asas formam os braços do assento. As esfinges repousam sobre dois pedestais unidos por um travessão.

É importante salientar que a peça museológica estudada é toda constituída de madeira e tecido, ou seja, material lignocelulósico. Sendo assim, constitui fonte de matéria prima para agentes biodeteriorantes, tais como fungos e bactérias.

2.1.1.2 Estado de conservação e procedimentos de higienização e restauro

O estado de conservação geral do Trono Imperial apresentava-se bom, principalmente nas partes de madeira do objeto. As demais partes, que possuíam revestimento têxtil, se encontravam em pior estado de conservação. Insetos xilófagos causaram algumas perfurações na base central da estrutura do trono e isso o deixou mais fragilizado nessa região. As partes que continham acabamento dourado acumularam sujidades ao longo dos anos, gerando degradação da camada protetora. Algumas dessas áreas apresentavam purpurina como substituinte do revestimento com folha de ouro.

O encosto do veludo encontrava-se bastante deteriorado e com as tachas de fixação oxidadas.

Durante a análise da peça museológica, pode-se verificar que a estrutura do assento já havia passado por intervenções anteriores, provavelmente na ocasião da sua transferência definitiva para o Museu Imperial em Petrópolis em 1940. Evidências revelaram que o veludo não era mais o original, sendo que os braços e o assento possuíam outro veludo diferente do encosto. O enchimento dessas partes estofadas continha crina e capim sob pasta de algodão.

As técnicas utilizadas para o restauro foram norteadas pela teoria da conservação/restauração fundamentada por BRANDI (1963) de forma que, foi priorizada e respeitada, a veracidade do patrimônio histórico e cultural em questão, mantendo a integridade e originalidade da peça bem como as marcas do seu uso.

Dentro dessas premissas, procedeu-se então a higienização mecânica utilizando-se uma trincha bem macia e um aspirador de baixa sucção. O douramento das madeiras passou por processo de higienização utilizando *swab* umedecido com uma solução aquosa de etanol bem diluída. As partes de madeira que sofreram perda foram restauradas com massa à base de carboximetilcelulose e carbonato de cálcio. As tachas que continham uma grossa camada de purpurina foram

mecanicamente higienizadas utilizando um bisturi com intuito de remover oxidação e repintura, seguido da aplicação de ácido fosfórico para eliminar resíduos ferruginosos.

As partes têxteis dos revestimentos em veludo (encosto, assento e braços), que já não eram mais originais, foram removidas por apresentarem desgaste acentuado. No entanto, a pasta de algodão presente no enchimento foi higienizada e nas crinas de cavalo foram aspiradas (sob tela), lavadas com água e detergente neutro, secas e reutilizadas.

As fotografias (Figura 26) apresentam o objeto museológico antes, durante e após os procedimentos de higienização e restauro.

Foram coletadas amostras para a avaliação da presença de microrganismos no ar e no Trono do Imperador com o objetivo de detectar espécies bacterianas em áreas selecionadas da peça (antes e depois das intervenções de higienização e restauro) e espécies fúngicas apenas no ar da área de exposição (antes e depois das intervenções). As coletas antes e depois das intervenções aconteceram no intervalo de 1 ano.

Figura 26 - Intervenções de higienização e restauro do Trono Imperial (continua)



Figura 26 - Intervenções de higienização e restauro do Trono Imperial(continuação)

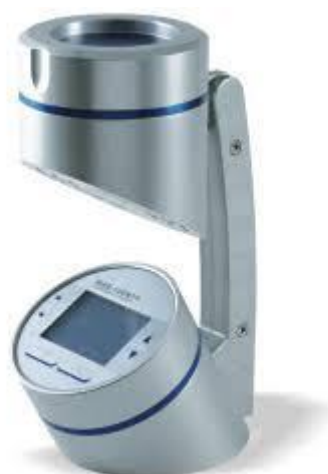


Fonte: Acervo do Museu Imperial, 2019.

2.1.1.3 Monitoramento e identificação microbiológica por biologia clássica.

A coleta dos microrganismos presentes no ar do ambiente de entorno onde estava salvaguardado o trono foi realizada por meio de um coletor de ar (Figura 27). Neste aparelho foram posicionadas, na parte superior, placa de Petri contendo o meio de cultura apropriado. O aparelho recebeu durante duas horas amostras do ar contaminado e os microrganismos presentes foram coletados ativamente por meio de sedimentação direta nas placas.

Figura 27 – Coletor de ar



Fonte: A autora, 2019.

A caracterização da microbiota do trono foi feita por raspagem através de *swabs*. Foram inspecionados o ambiente da área de guarda (1), o veludo da cortina atrás do trono (2), o veludo e a madeira do braço direito (3) e esquerdo do trono (4) e a parte central do trono (5), todas representadas na Figura 28. As coletas feitas diretamente no trono foram executadas apenas com vistas ao monitoramento de bactérias. As coletas feitas no ambiente serviram para monitorar a presença tanto de bactérias quanto de fungos. O meio de cultura utilizado para o crescimento das espécies fúngicas foi o Agar Sabouraud Dextrose e para o cultivo das bactérias foi utilizado o meio PCA (ágar padrão para contagem).

Um ano após a finalização da restauração do Trono Imperial e após sua recolocação no pavilhão de exposições, as coletas foram realizadas novamente seguindo o mesmo procedimento: coletas no ar (ambiente circundante do Trono

Imperial) e coletas diretas na peça museológica (Trono), para detecção das bactérias e, apenas no ar, para detecção dos fungos.

No caso da utilização dos *swabs*, depois de esfregá-los, os mesmos foram colocados dentro de 9,0 mL de água salina na concentração de 0,9% (m/v), seguido de diluições decimais, inoculando-se 0,1 mL das diluições em placas de Petri contendo o meio PCA, previamente esterilizado a 120°C por 20 minutos em autoclave. Quando realizada a sedimentação direta, as amostras foram coletadas a cada metro cúbico do espaço, aguardando-se a sedimentação por 2 horas. Após estes procedimentos, as placas de Petri foram então colocadas dentro de uma câmara com temperatura controlada a 25°C durante 21 dias para o crescimento fúngico e numa câmara com temperatura controlada a 32°C durante 1 semana para o crescimento bacteriano.

Os fungos crescidos sobre as placas foram isolados com o auxílio de *swab* em tubos de vidro contendo o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose e armazenados em óleo mineral.

Nas espécies bacterianas encontradas foi realizado o método da coloração de Gram de acordo com procedimentos clássicos de Microbiologia. Após o isolamento dos microrganismos, as técnicas de microcultivo foram feitas, seguido de incubação de 7 a 21 dias, dependendo do gênero específico.

Depois do crescimento, a identificação dos fungos e bactérias foi realizada por meio de observações macroscópicas e microscópicas, de acordo com protocolos convencionais, e, posteriormente, por identificação filogenética por sequenciamento do DNA.

Figura 28 – Pontos de coleta das amostras



Legenda: Indicação dos pontos de coleta de amostra: 1 – Ar; 2 – Cortina; 3 – Braço Direito do Trono Imperial; 4 – Braço Esquerdo do Trono Imperial; 5 – Parte frontal do Trono Imperial.

Fonte: A autora, 2018.

2.1.1.4 Identificação filogenética das bactérias por biologia molecular

As extrações de DNA foram realizadas usando como método para obtenção de DNA genômico o Choque Térmico/Lise Térmica, a partir de uma cultura pura, obtida através do processo de isolamento e cultivo, conforme anteriormente descrito.

O procedimento consiste, após a obtenção da cultura pura, com o auxílio de uma alça descartável de capacidade de 0,1 μL pegar uma pequena quantidade da colônia isolada. Foi feita uma suspensão da colônia isolada em um tubo de fundo cônico de 200 μL (tubo de PCR), contendo 50 μL de água Milli-Q. A alça é então agitada até que a amostra esteja totalmente dissolvida em água Milli-Q, tornando-se essa ligeiramente turva. Após essa etapa inicial, os frascos são submetidos à variação de temperatura em banho seco, por 10 minutos a 96°C e 15 minutos a 4°C. Em seguida, a amostra é centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante é transferido para um novo tubo de PCR e congelado.

Após a obtenção do DNA genômico, é realizado um PCR para a amplificação da região alvo correspondente ao gene 16S bacteriano que será utilizado na reação

de sequenciamento. Para amplificação é utilizado o par de primers Sadir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') / S17 (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). A reação é submetida à amplificação em termociclador com etapa de desnaturação por 15 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 90 segundos. Por último, procede-se à extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após checagem da amplificação por eletroforese em gel de agarose, o produto amplificado é submetido a um processo de purificação utilizando o kit comercial Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-molde (30 ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol ou do primer Sadir ou do primer S17 e 0,5 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cycler com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% (v/v) e lavagem com etanol a 60% (v/v). Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"; e, Analysis Module 1 "BC-3500SR_Seq_FASTA.saz".

2.1.1.5 Identificação filogenética dos fungos por biologia molecular

Após crescimento em meio específico, os fungos foram retirados por meio de raspagem da placa de Petri e transferidos para um tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi colocado em um cilindro contendo nitrogênio líquido por 5 min, aquecido em banho

maria à 60 °C por 10 min e macerados 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 fornecedor. 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).

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 à água, num volume total de 50 µL. Uma primeira desnaturação foi realizada a 94 °C durante 4 min seguidos de 30 ciclos nas seguintes condições: 94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s. O experimento foi encerrado a 72 °C por 10 min. 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. O produto da amplificação foi visualizado através de uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TE 1X.

Os fragmentos de DNA dos fungos isolados foram submetidos a sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator v. 3.1 (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. Para validar as sequências a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) foi realizada. Apenas os fragmentos com similaridade acima de 98% foram considerados “confiáveis” e devidamente registrados.

2.1.2 Peça Museológica II: Obra de Portinari

2.1.2.1 Características da obra de arte

A obra retrata o desenho de três cabeças de índio e um outro desenho de cabeça, esboçado ao fundo (Figura 29). Os desenhos foram feitos com carvão sobre papel *Kraft* e ocupam quase a totalidade da área do suporte. Os índios estão com as cabeças voltadas 3/4 para a direita, dois à frente, lado a lado e o do centro imediatamente atrás com a face parcialmente encoberta pela cabeça à direita. Tem rosto anguloso, cabelos lisos com franja cobrindo a testa, olhos puxados para cima, nariz reto, lábios carnudos fechados e queixo reto. No fundo, à esquerda, esboço de parte de outra cabeça apenas sombreada. A tela continha suporte colado em tela. Suas dimensões são 99,5 cm de altura por 119 cm de largura e não apresenta assinatura ou data. Encontrava-se na coleção do Museu Nacional.

Figura 29 - Obra "Índios" de Cândido Portinari



Fonte: PORTAL CANDIDO PORTINARI, 2019.

2.1.2.2 Monitoramento e identificação microbiológica por biologia clássica e molecular

A caracterização da microbiota no ar da sala onde estava abrigada a obra foi feita conforme procedimento já descrito no item 2.1.1.3. As amostras foram coletadas a cada metro cúbico de espaço, um metro acima do chão da sala, por 2 horas (Figura 30). A sala onde se encontrava a obra não apresentava qualquer tipo de controle climático e ambiental, por conter janelas abertas e incidência direta de luz, além da entrada e saída de diversas pessoas por ser um espaço também destinado a outros usos.

Algumas partes da tela em particular foram monitoradas, onde a contaminação por fungos estava claramente presente, em superfícies selecionadas do quadro (Figuras 31 e 32). Depois de esfregar, os *swabs* contaminados foram colocados dentro de 9,0 mL de água salina 0,9% m/v.

Figura 30 - Sala onde estava abrigada a obra, fora de exposição.



Fonte: A autora, 2018.

Figura 31 – Regiões selecionadas da obra onde foram realizadas as coletas de material biológico



Fonte: A autora, 2019.

Figura 32 – Procedimento de coleta das amostras com *swab*



Fonte: A autora, 2019.

A identificação filogenética dos fungos por biologia molecular foi realizada utilizando-se os mesmos procedimentos descritos no item 2.1.1.5.

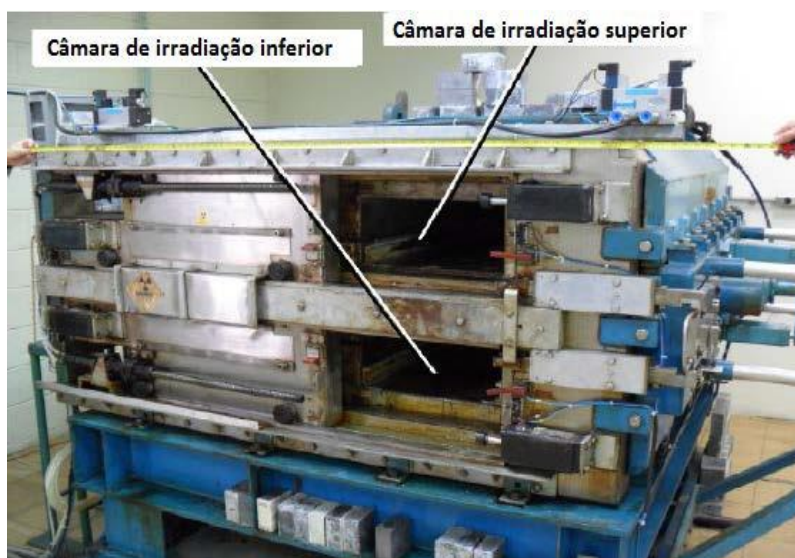
2.1.2.3 Irradiação das amostras com Césio 137

A instalação de irradiação do Instituto de Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear (IDQBRN) do Exército Brasileiro (EB), localizada no Centro Tecnológico do Exército (CTEx), é composta por um irradiador de pesquisas do tipo cavidade de 19 toneladas conforme pode ser visto na Figura 32. Atualmente, suas

fontes de ^{137}Cs com atividade de 43,2 KCi fornecem uma taxa de dose máxima de $1,45 \text{ K Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ em duas câmaras de irradiação retangulares de 68 cm de largura, 137 cm de comprimento e 20 cm de altura posicionadas acima e abaixo do plano da fonte gama. A fonte gama consiste de vinte e oito placas paralelas espaçadas, duplamente encapsuladas contendo cloreto de célio 137. Além disso, um sistema pneumático permite que não somente a porta de acesso seja movimentada, mas também as fontes, por meio de um painel de controle.

O mapeamento dosimétrico da câmara, realizado anualmente, indica uma homogeneidade da distribuição da taxa de dose com variação em torno de $\pm 3\%$.

Figura 33 – Vista frontal do irradiador gama do IDQBNR com as portas abertas



Fonte: COSTA *et al.*, 2022.

O tempo de irradiação foi crescente para estabelecer o limiar para cada fungo. As irradiações foram feitas após 14 dias de incubação, no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro Tecnológico do Exército (IPD/CTEx) em Guaratiba – RJ.

As placas foram acomodadas no irradiador em grupos, de forma a ocuparem o espaço central da gaveta (Figura 34), obedecendo a altura máxima pré-estabelecida de 7 cm, a fim de se obter uma menor incerteza na dose.

Em seguida, o irradiador foi fechado para que as amostras fossem submetidas à irradiação com uma fonte de Cs-137, nos diferentes tempos

previamente calculados (Figura 35). O cálculo do tempo de irradiação das amostras foi efetuado por um programa baseado no mapeamento dosimétrico mais recente do irradiador. A incerteza média no valor das doses, estimada com base nas dimensões das amostras e na distribuição de dose no interior do irradiador, foi de $\pm 5\%$ (COSTA *et al.*, 2022).

Figura 34 – Amostras sendo acomodadas no irradiador



Fonte: COSTA *et al.*, 2022.

Imediatamente após as sequências de irradiação, sendo o tempo de exposição diretamente proporcional à dose desejada (Tabela 6), as amostras foram recolocadas em caixas e retornadas ao laboratório, onde foram realizadas as análises de monitoramento da viabilidade fúngica. Assim, foram realizadas irradiações pelo tempo necessário para se alcançar as doses propostas.

Figura 35 – Amostras prontas e tempo determinado para iniciar a irradiação



Fonte: COSTA *et al.*, 2022.

Tabela 6 – Tempos de exposição das amostras no irradiador

Tempo de irradiação (h)	Dose correspondente (KGy)
14	16
17	19
19	22

Fonte: A autora, 2019.

2.1.2.4 Repique dos fungos irradiados

Os procedimentos para as análises de viabilidade foram efetuados 24h após as amostras terem sofrido as irradiações. Dessa forma, as espécies fúngicas, irradiadas com Césio 137 nas doses de 16kGy, 19 kGy e 22 kGy, foram inoculadas em placas de Petri estéreis, contendo o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose, a fim de verificar se em alguma dessas respectivas doses ocorreu resistência desses microrganismos. Após a inoculação, as placas de Petri foram acondicionadas em câmara de germinação por sete dias a 25°C. Após esse período, foi feita a observação do crescimento fúngico. Nos casos em que não foi observado um

crescimento pós-irradiação na área da colônia, considerou-se que a ela sofreu inativação em virtude desse processo.

2.2 Parte II - Emprego de técnica não destrutiva de análise em documentos contendo tintas ferrogálicas.

2.2.1 Utilização da fluorescência de Raio X (FRX) para semi-quantificação e qualificação da tinta ferrogálica.

2.2.1.1 Confeção das tintas ferrogálicas

As tintas ferrogálicas foram preparadas para a avaliação do grau de oxidação que elas podem sofrer com o tempo, quando aplicadas em suportes de papel, devido à presença de dois distintos tipos de taninos: hidrolisável (*Castanheiro KPN, Tanac*) e condensado (*Weibull, Tanac*) em sua composição. O preparo ocorreu em diferentes concentrações: estequiométrica e com excesso de ferro e com os dois tipos de tanino separadamente. Essas escolhas para a realização do experimento buscaram seguir a falta de uma padronização no preparo das tintas ferrogálicas que havia no passado onde, de forma artesanal, eram produzidas sem preocupação e conhecimento estequiométrico. Além disso, foram adicionados goma arábica e etanol em concentrações iguais para todas as tintas produzidas. A Tabela 7 apresenta as quantidades utilizadas nas preparações das tintas estudadas.

Tabela 7 – Preparações das tintas.

Preparações	FeSO ₄ .7H ₂ O (g)	Tanino ^{1,2} (g)	G. Arábica (g)	Etanol (mL)
Quantidade estequiométrica	1,0	5,5	2,0	5,0
Em excesso	10,0	5,5	2,0	5,0

Legenda: ¹Tintas produzidas com tanino vegetal hidrolisável (*Castanheiro KPN, Tanac*); ²Tintas produzidas com tanino vegetal condensado (*Weibull, Tanac*)

Fonte: A autora, 2020.

A razão entre sulfato ferroso e tanino (ácido tânico) foi investigada por NEEVEL (1995) e foi constatado, depois de uma análise de 104 receitas antigas, em que a razão era de aproximadamente 5,5 para 1.

As tintas foram preparadas em temperatura ambiente e ficaram expostas ao ar atmosférico por 24 horas para intensificar a cor devido à formação gradual do complexo. Depois da preparação, as tintas foram mantidas em frasco de vidro âmbar fechado, em temperatura ambiente.

2.2.1.2 Impregnação das amostras de papéis ácidos e alcalinos

As amostras de papéis ácidos e alcalinos (papel Whatman), de 0,5 x 6,0 cm de largura por comprimento, foram impregnadas com as tintas ferrogálicas de diferentes composições, com o auxílio de um pincel, apenas em uma das faces dos papéis. Após a impregnação das tintas nas amostras, as mesmas foram submetidas ao envelhecimento artificial acelerado durante cinco dias, em estufa a 100°C, para estimular o processo oxidativo do ferro, buscando simular condições que ocorrem no processo de envelhecimento natural. Esse procedimento de envelhecimento artificial seguiu as normas estabelecidas em outros estudos já realizados (COSTA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2013). Após esse procedimento, as amostras foram encaminhadas para análise por fluorescência de raios-X.

2.2.1.3 Fluorescência de raio-X nas tiras de papel

Os papéis ácidos e alcalinos impregnados com tintas ferrogálicas foram amostrados, em ensaios não destrutivos, visando avaliar a presença de elementos químicos constituintes do papel e da tinta, através da técnica de fluorescência de raios-X. Nos testes analíticos, foi empregado o Espectrômetro Genius 5000 XRF, produzido pela Skyray, que é empregado para a análise não destrutiva de materiais,

visando avaliar sua composição química fundamental. Este equipamento é capaz de fazer a medição da composição percentual de até 80 elementos químicos da tabela periódica, com precisão de até 0,05% com avaliação dos elementos num prazo médio de apenas 30 segundos. Neste estudo foi utilizado um tempo de 20 segundos, operando a 38 kV e 0,5 mA, para cada tira de papel analisada.

Figura 36 – Espectrômetro portátil Genius 5000 XRF com tela de cristal líquido.



Fonte: A autora, 2020.

2.2.1.4 Tratamento químico com fitato de cálcio para remoção de ferro em excesso

Após a etapa de fluorescência de raio-X, as amostras passaram pelo processo de tratamento com fitato de cálcio, para a retirada do ferro em excesso presente na superfície dos papéis. O fitato é um agente quelante natural, com o poder de ocupar os sítios de coordenação do metal, precipitando-o e evitando que ele fique livre para reagir com hidroperóxidos. Para a preparação do fitato de cálcio,

foram utilizados o ácido fítico e o carbonato de cálcio, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição química da solução de fitato

Ácido fítico(mL)	CaCO₃ (g)	Água (L)
0,875	0,22	1,0

Fonte: A autora, 2020.

A solução de fitato de cálcio preparada foi distribuída em tubos de vidro de 25 mL cada. As tiras de papel foram então imersas nessa solução por 15 minutos, sob temperatura ambiente e sem agitação. Em seguida, as tiras de papel foram retiradas da solução de fitato e deixadas sob a bancada em temperatura ambiente para secarem. Depois de secas, as amostras foram novamente envelhecidas artificialmente e, mais uma vez, analisadas por fluorescência de raio-X para verificar o conteúdo de ferro presente na amostra após o tratamento com o fitato.

3 RESULTADOS

3.1 PARTE I - Biodeterioração de peças museológicas

3.1.1 Peça museológica I: Trono Imperial (Museu Imperial)

Os principais resultados, distribuídos por local de coleta, conforme já indicados anteriormente na Figura 28, encontram-se apresentados nas Tabelas 9 e 10. É importante ressaltar que o monitoramento dos fungos foi realizado apenas no ar do ambiente de exposição onde se encontrava o Trono, tanto para a coleta 1 (antes dos procedimentos de restauro) quanto para a coleta 2 (após os procedimentos de restauro, ou seja, 1 ano depois da coleta 1). Já para as bactérias, o monitoramento foi mais abrangente e detalhado uma vez que foi realizado tanto no ar quanto em partes selecionadas do objeto, na coleta 1 e na coleta 2. A razão dessa escolha se deve ao fato de que a literatura já reporta, em diversos trabalhos, a atuação dos fungos e sua recorrência nas ações biodeteriorantes em peças de museu. No entanto, pouco se reporta sobre as bactérias e suas ações no estudo da biodeterioração.

Tabela 9 - Fungos e bactérias encontrados no ambiente de exposição (ar) do Trono Imperial de d. Pedro II.

FUNGOS		BACTÉRIAS	
Coleta 1	Coleta 2	Coleta 1	Coleta 2
<i>Cladosporium oxysporum</i>	-	<i>Kocuria</i> sp.	-
<i>Cladosporium</i> sp.*		<i>Pseudomonas</i> sp.	-
<i>Penicillium toxicarum</i>	-	<i>Arthrobacter</i> sp.	-
<i>Eutypella</i> sp.	-	<i>Staphylococcus</i> sp.	-
<i>Massarina</i> sp.	-	<i>Microbacterium</i> sp.	
<i>Penicillium brevicompactum</i>	-	<i>Curtobacterium</i> sp.	-
<i>Phaeosphaeriopsis</i>	-	<i>Bacillus</i> sp.	-
<i>Ochroconis sexualis</i>	-		
<i>Pseudocercospora norchiensis</i>	-		

<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	-
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	-
<i>Arthrinium arundinis</i>	-
<i>Aureobasidium sp.</i>	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	
<i>Porostereum crassum</i>	-
-	<i>Absidia sp.</i>
-	<i>Alternaria brassicicola</i>
-	<i>Aspergillus sp.</i>
-	<i>Curvularia sp.</i>
-	<i>Epicoccum nigrum</i>
-	<i>Periconia byssoides</i>

Legenda: Coleta 1: antes das intervenções de restauro e higienização.

Coleta 2: depois das intervenções de restauro e higienização.

*Microorganismos ressaltados em sombreado foram encontrados nas duas coletas.

Fonte: A autora, 2019.

Dos resultados apresentados pode-se levantar uma série de informações acerca da ocorrência de fungos e bactérias no ambiente de guarda e exposição do trono Imperial bem como de partes específicas do objeto museológico. A primeira conclusão que se pode tirar tem relação com a ocorrência consideravelmente maior de fungos, em comparação com a ocorrência de bactérias, antes do procedimento de limpeza da área e restauração do Trono, fato enfatizado também por outros autores (LAVIN *et al.*, 2016).

Tabela 10 – Bactérias encontradas **no Trono Imperial** de d. Pedro II e **na cortina** do entorno

Coleta 1	Coleta 2
Cortina do entorno do Trono Imperial	
<i>Kocuria</i> sp.	-
Braço direito do Trono Imperial	
<i>Kocuria</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Roseomonas</i> sp.
Braço esquerdo do Trono Imperial	
-	<i>Staphylococcus</i> sp.
-	<i>Quadrisphaera</i> sp.
-	<i>Deinococcus</i> sp.
Parte central do Trono Imperial	
<i>Sinomonas</i> sp.	<i>Deinococcus</i> sp.
-	<i>Dermacoccus</i> sp.

Legenda: Coleta 1: antes das intervenções de restauro e higienização.

Coleta 2: depois das intervenções de restauro e higienização.

Fonte: A autora, 2019.

Antes da restauração, ou seja, na coleta 1, foram identificadas 15 espécies fúngicas no **ar** (entorno do trono) e 10 espécies bacterianas, sendo 7 no entorno do Trono (ar) e 3 em partes selecionadas da peça. Uma vez que houve a restauração do Trono, com substituição de muitos materiais (tecidos, pequenas peças metálicas, adornos dourados, etc.), seguida de uma higienização da área de exposição, o monitoramento, então realizado no entorno do trono (ar), indicou na coleta 2 a presença de 8 espécies fúngicas (sendo 2 delas reincidentes) e 1 espécie bacteriana (reincidente). Pode-se concluir que o procedimento de higienização e restauração foi bastante efetivo para redução da carga microbiana, prevenindo a recontaminação do ambiente. Houve uma redução percentual da ordem de 47% para os fungos. Já para as espécies bacterianas, a redução foi da ordem de 85%. Esses resultados podem ser uma indicação da maior resistência fúngica à permanência no ambiente, em comparação com as bactérias, explicando até o fato de se haver, na literatura reportada, uma maior incidência de trabalhos que buscam métodos efetivos de descontaminação fúngica.

Uma avaliação mais criteriosa dos **fungos** identificados **no ar** onde o Trono Imperial encontra-se alocado mostrou a reincidentência de duas espécies (*Cladosporium* sp. e *Cladosporium cladosporioides*) após os procedimentos de

higienização. Isto é uma constatação de que algumas espécies fúngicas devem ser típicas da região, podendo até ser removidas por algum tipo de higienização, mas que facilmente voltam a colonizar o ambiente. O gênero *Cladosporium* constitui-se num dos maiores problemas para os museus, arquivos e bibliotecas devido à sua fácil disseminação e alta atividade celulolítica. Com relação ao gênero *Absidia*, STERFLINGER (2010) relaciona o gênero como potencialmente biodegradador devido à sua elevada carga enzimática.

Fazendo a mesma avaliação para os grupos bacterianos no ar, pode-se verificar (Tabela 9) que na Coleta 1 foram identificadas 7 espécies bacterianas e na Coleta 2 apenas 1 espécie bacteriana, sendo que esta, *Microbacterium* sp., também já havia sido identificada na Coleta 1, ou seja, foi reincidente. Bactérias do gênero *Microbacterium* são relacionadas a casos clínicos e não há uma clara definição do seu potencial biodegradador para elementos do patrimônio histórico, sendo reportada sua origem em ambientes naturais (FUNKE *et al.*, 1995).

Na **cortina** alocada atrás do Trono Imperial, na Coleta 1 foi identificada apenas uma espécie de bactéria (*Kocuria* sp.) que na coleta 2, não reapareceu.

Pensando agora no monitoramento feito diretamente com auxílio de *swab* no objeto museológico, pode-se verificar que no **braço direito** do Trono foram identificadas na Coleta 1, duas bactérias (*Kocuria* sp. e *Pseudomonas* sp.). Já na Coleta 2 foram identificadas *Staphylococcus* sp. e *Roseomonas* sp. espécies até então não identificadas.

No **braço esquerdo** do Trono foram identificadas bactérias somente na Coleta 2, sendo elas dos gêneros *Staphylococcus* sp., *Quadrisphaera* sp. e *Deinococcus* sp.

Na parte central do Trono Imperial, na coleta 1 estava presente apenas bactérias da espécie *Sinomonas* sp., enquanto que na coleta 2, foram identificadas duas novas espécies, *Deinococcus* sp. e *Dermacoccus* sp.

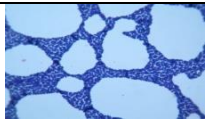
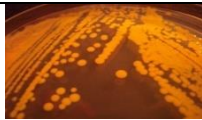
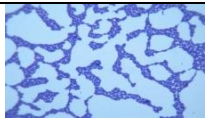

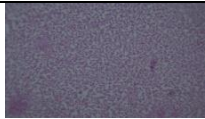

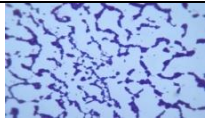


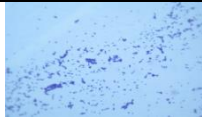

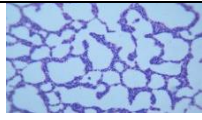

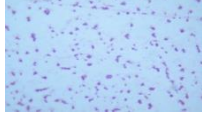


O que chama atenção para estes dados é o fato de ter-se observado recontaminação do ambiente e da peça museológica por novas bactérias. Na coleta 2 foram identificadas várias bactérias, sendo que 6 dessas bactérias não estavam presentes na coleta 1, efetuada antes da restauração e higienização do espaço expositivo. Conclui-se, portanto, que as bactérias podem representar um risco potencial do ponto de vista da biodegradação, devido à sua persistência e/ou

reincidência no ambiente e facilidade de disseminação tanto quanto os fungos filamentosos.

Dentre essas espécies contaminantes ressaltam-se a *Microbacterium* sp. e *Staphylococcus* sp.. A *Microbacterium* sp., de origem ambiental, relaciona-se com casos clínicos. Já a *Staphylococcus* sp. é típica de contaminações de alimentos. A questão é que houve a reincidência de ambas já que foram encontradas em duas coletas distintas, efetuadas na mesma época do ano, porém com intervalo de um ano, tanto no ar quanto em partes do trono. Isso alerta para estudos futuros no sentido de compreender o papel dessas espécies em ambientes de museu. Ambas provavelmente estão associadas a ações de manuseio durante o processo de restauração (SANMARTÍN *et al.*, 2018; SCHLOCCHI *et al.*, 2017). Isso é comprovado pelo fato de que a partir de um total de 8 gêneros bacterianos identificados em três locais distintos (ar, cortina e trono), 7 estavam no ar, 3 estavam em partes do trono Imperial e 1 estava na cortina, sendo que 1 desses gêneros estava simultaneamente no ar, no Trono e na cortina (*Kocuria* sp.) e a outro gênero (*Pseudomonas* sp.) estava simultaneamente no ar e no braço do trono, conforme dados da coleta 1 apresentados nas Tabelas 8 e 9. Observando os resultados obtidos a partir da coleta 2, ou seja, obtidos após os procedimentos de higienização e restauração, de um total das 7 bactérias identificadas, apenas 1 estava presente no ar enquanto que 6 estavam presentes no Trono. Isso leva a constatar que a contaminação do ar parece ter sido o veículo para a contaminação do Trono Imperial antes dos procedimentos de higienização e restauro mas que, após a restauração, a manipulação do objeto museológico conduziu à uma nova contaminação bacteriana, como visto nos dados da coleta 2 e como já foi abordado no texto.

As Figuras 37 e 38 apresentam as características macroscópicas e microscópicas das bactérias cultiváveis encontrados no ambiente de exposição (ar) e em partes selecionadas do Trono Imperial de D. Pedro II.

Figura 37 – Bactérias sequenciadas coletadas, antes do processo de restauro, no ar e em partes selecionadas do Trono Imperial de D. Pedro II

<i>Kocuria sp.</i>	
	
<i>Sinomonas sp.</i>	
	
<i>Pseudomonas sp.</i>	
	
<i>Arthrobacter sp.</i>	
	
<i>Staphylococcus sp.</i>	
	
<i>Curtobacterium sp.</i>	
	
<i>Microbacterium sp.</i>	
	
<i>Bacillus sp.</i>	
	


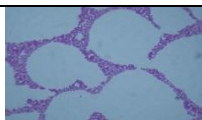
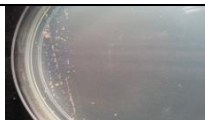
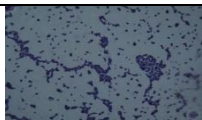

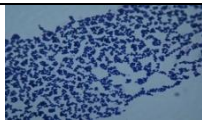

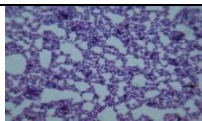

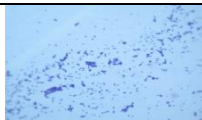
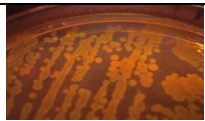
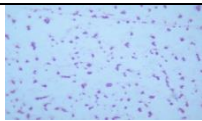
Legenda: Esquerda: aspeto colonial; Direita: aspecto microscópico.

Fonte: A autora, 2019.

No caso das bactérias, apenas o gênero *Microbacterium sp.* repetiu-se nas coletas realizadas no mesmo local (ar) em datas diferentes (1 ano de intervalo). Em relação aos fungos, as espécies *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sp.*

permaneceram presentes mesmo após a limpeza, apesar de novas espécies terem surgido. Isso indica que a ocorrência de espécies em áreas de exposição é parcialmente cíclica, requerendo procedimentos de conservação preventiva permanentes. Os microrganismos identificados no Trono apresentaram uma relação muito coerente com o tipo de ambiente em que o trono fora exposto até então. No entanto, a manipulação de objetos durante procedimentos de restauração e/ou higienização faz com que gêneros novos possam aparecer após tais procedimentos.



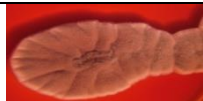


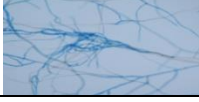







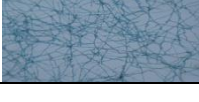

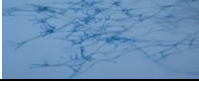






Figura 38 – Bactérias sequenciadas, coletadas após o processo de restauro no ar e em partes selecionadas do Trono Imperial de D. Pedro II

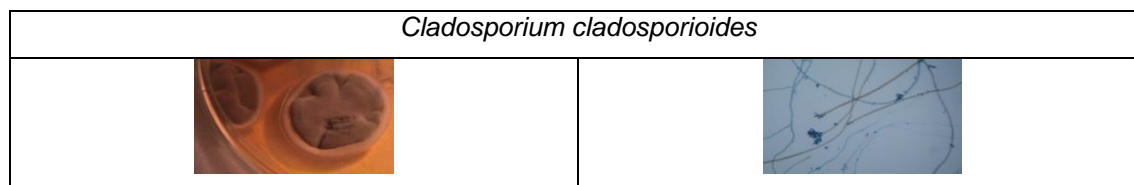
<i>Roseomonas sp.</i>	
	
<i>Quadrisphaera sp.</i>	
	
<i>Deinococcus sp.</i>	
	
<i>Dermacoccus sp.</i>	
	
<i>Staphylococcus sp.</i>	
	
<i>Microbacterium sp.</i>	
	

Legenda: Esquerda: aspeto colonial; Direita: aspecto microscópico.
Fonte: A autora, 2019.

As Figuras 39 e 40 revelam as características macro e microscópicas de alguns dos fungos isolados do ambiente (ar) onde estava abrigado o Trono, antes e após o processo de higienização e restauro.

Figura 39 – Fungos coletados (ar), antes do processo de restauro.

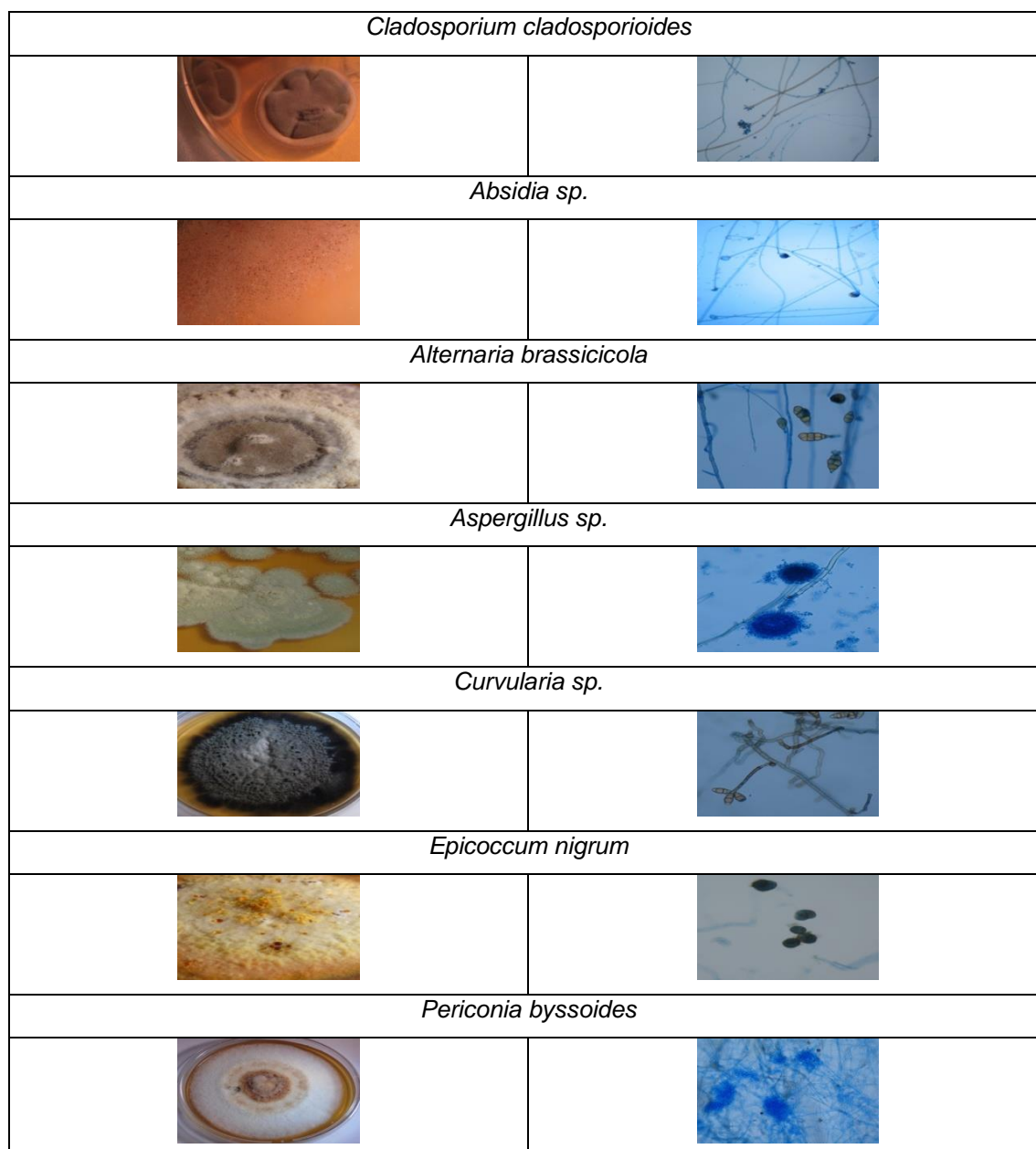
<i>Cladosporium oxysporum</i>			
			
<i>Cladosporium sp.</i>			
			
<i>Penicillium toxicarium</i>			
<i>Não disponível</i>			
<i>Eutypella sp.</i>			
<i>Não disponível</i>			
<i>Massarina sp.</i>			
			
<i>Penicillium brvicompectum</i>			
			
<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i>			
			
<i>Ochroconis sexualis</i>			
			
<i>Pseudocercospora norchiensis</i>			
			
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>			
			
<i>Pestalotiopsis sp.</i>			
			
<i>Arthrinium arundinis</i>			
			



Legenda: Esquerda: aspeto colonial; Direita: aspecto microscópico.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 40 – Fungos coletados (ar), após o processo de restauro



Legenda: Esquerda: aspeto colonial; Direita: aspecto microscópico.

Fonte: A autora, 2018.

Dados da literatura publicada embasam as conclusões tiradas até o momento. PRINCIPI *et al.* (2011) trabalhando com um Codex de Leonardo da Vinci

identificaram a presença de fungos filamentosos por técnicas moleculares, observando também uma contaminação bacteriana, associada aos materiais do chão do repositório bem como bactérias típicas da pele humana. Isso serviu como alerta para a necessidade de monitoramento permanente e mudanças na forma de manuseio dos documentos.

Analogamente MICHAELSEN *et al.* (2010) trabalharam com um antigo manuscrito, também identificando uma grande diversidade de culturas bacterianas, sendo muitas delas com natureza celulolítica, o que seria um grande problema no caso do Trono Imperial, devido à sua estrutura de madeira e tecido, fundamentalmente.

A avaliação da ação potencial destas bactérias sobre partes estruturais (celulose de tecidos, madeira, tintas, pigmentos) do Trono Imperial requer uma investigação mais profunda, uma vez que testes de susceptibilidade aos componentes devem ser efetuados em ausência de outras fontes de carbono.

Uma avaliação um pouco mais aprofundada sobre alguns dos gêneros encontrados está descrita nos parágrafos a seguir, não levando-se em consideração somente questões relacionadas à suas estruturas superficiais (testes de Gram) ou ocorrência no ambiente.

A caracterização de bactérias aeróbias cultiváveis, isoladas da janela de vidro histórica "Natività" na Catedral de Florença, construída entre 1443 e 1444 foi realizada por MARVASI *et al.* (2009). Cepas microbianas de quatro dos 25 painéis da "Natività" foram isoladas em ocasião de um recente tratamento de conservação, devido à presença de vários tipos de crostas. Uma variedade de microrganismos, incluindo líquens, fungos e bactérias foram identificadas. As bactérias presentes na janela histórica foram caracterizadas através de técnicas microbiológicas clássicas e moleculares. As técnicas clássicas como microscopia e investigações fisiológicas mostrou que bactérias Gram positivas e bacilos foram dominantes, em concordância com o observado no presente trabalho.

SANTOS *et al.* (2009) ressaltam a necessidade de se buscar espécies bacterianas em peças do Patrimônio Cultural, em detrimento da busca disseminada por fungos deteriorantes. A questão, ressaltada pelos autores, é que a maioria das bactérias presentes nesses ambientes ou peças museológicas são de natureza não cultivável, requerendo avançadas técnicas microbiológicas para completa caracterização da flora dominante.

SUIHKO *et al.* (2007) retirou vinte amostras de superfícies interiores e exteriores de monumentos de pedra de seis edifícios históricos escoceses em ruínas. Os biofilmes em desenvolvimento nos substratos minerais foram analisados por microscopia eletrônica de varredura *in situ* e cultivados por técnicas tradicionais e de biologia molecular. Os gêneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter* e *Deinococcus* foram típicas para as amostras ao ar livre, enquanto que espécies de *Pseudomonas* foram comuns nas amostras de interiores.

Espécies fúngicas hialinas de *Acremonium* ocorreram principalmente em amostras de interior, enquanto as espécies pigmentadas de *Cladosporium*, *Penicillium* e *Phialophora* foram encontrados ao ar livre. Os fungos filamentosos são conhecidos, principalmente, por serem responsáveis pela decomposição de materiais de madeira. O fungo *Cladosporium cladosporioides* é difundido na natureza e os seus esporos são comuns em ar, justificando a sua reincidência e persistência em ambientes de museus especialmente no outono, quando eles podem provocar reações alérgicas em seres humanos.

Estudos sobre a otimização das condições de desinfecção utilizando nanopartículas de prata em objetos museológicos foram realizados por GUTAROWSKA *et al.* (2012). As análises da contaminação microbiana de ar e superfícies em seis museus e arquivos diferentes foram realizadas na Polônia. Os resultados mostraram que os fungos mais comuns, que contaminam museus e arquivos foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Botrytis* e *Chrysonila*; e a bactéria *Bacillus*.

Microbacterium, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Dermacoccus* foram algumas das bactérias encontradas por sequenciamento do gene 16S rRNA no trabalho realizado por SAARELA *et al.* (2004) na caracterização da microbiota heterotrófica em amostras superficiais e no ar das catacumbas romanas de São Calisto e Santa Bomitilla. Estas informações corroboram com o que se encontrou no presente trabalho, em relação à uma elevada diversidade de espécies bacterianas e fúngicas.

WANG *et al.* (2012) estudaram a diversidade e dinâmica sazonal de bactérias no ar, nas Grutas Mogao (Dunhuang, China). O objetivo foi analisar a composição filogenética da comunidade bacteriana no ar utilizando uma abordagem molecular dependente da cultura. Os genes 16S rRNA foram amplificados diretamente dos

micro-organismos isolados. Um total de 19 gêneros de bactérias foi identificado entre os 49 tipos de sequências bacterianas. As bactérias predominantes foram *Janthinobacterium* (14,91%), *Pseudomonas* (13,40%), *Bacillus* (11,25%), *Sphingomonas* (11,21%), *Micrococcus* (10,31%), *Microbacterium* (6,92%), *Caulobacter* (6,31%), e *Roseomonas* (5,85%). A distribuição de várias bactérias foi afetada principalmente por parâmetros climáticas e atividades humanas. Essas descobertas sugerem que a abertura deste Patrimônio Cultural para os visitantes deve ser controlada e que a manutenção de condições climáticas naturais ajudaria na conservação.

As bactérias *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria* e *Roseomonas*, dentre outras espécies, foram isoladas de pinturas de murais danificados do túmulo de Servília (necrópole de Carmona, Sevilha, Espanha), esculpido em rocha de calcarenito, no estudo realizado por Heyrman e Swings (2001). As cepas selecionadas, representativas de diferentes grupos de isolados, foram analisadas por sequência de 16S rDNA.

Em se tratando das espécies fúngicas identificadas neste trabalho, existem diversos estudos na literatura que relacionam a presença desses microrganismos aos danos verificados em Patrimônio Cultural.

Para evitar danos por fungos em objetos de madeira, KIM *et al.* (2016) investigaram a diversidade de fungos existentes nesses bens de relevância histórica. Os fungos no ar foram isolados duas vezes na primavera (março) e no verão (agosto), utilizando o método de sedimentação espontânea e foram identificados utilizando técnicas morfológicas e moleculares. Houve diferenças na diversidade de fungos, dependendo da localização geográfica, das condições climáticas e do estado aberto ou fechado de um edifício. Dentro do total de 671 fungos isolados, as espécies *Arthrimum phaeospermum*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Eutypella* sp., *Penicillium* sp. e *Phaeosphaeriopsis triseptata* estavam presentes, alguns dos quais também encontrados no Trono Imperial ou no seu ambiente de exposição.

COUTINHO *et al.* (2015) relataram a ocorrência dos fungos *Arthrimum* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. em sua grande maioria em tijolos e cerâmicas esmaltadas. Também, ORTIZ *et al.* (2014) estudou igrejas históricas no Chile, construídas em madeira entre os anos de 1700 e 1800, constituindo-se num conjunto tombado pela UNESCO, onde os problemas de

biodeterioração são claramente observados, particularmente devido à natureza celulósica das construções, da mesma forma que toda a estrutura do Trono Imperial, abaixo dos tecidos que o recobrem parcialmente.

RUGA *et al.* (2015) investigaram a qualidade do ar na cripta da Basílica de São Pedro, em Perugia (Itália) através de diferentes metodologias, como indicativo do nível de contaminação do meio ambiente. Os gêneros *Aureobasidium*, *Arthrinium*, *Cladosporium* e *Penicillium* estavam presentes nas amostras de ar coletadas. A análise qualitativa do componente fúngico no ar permitiu a determinação de diferentes gêneros de fungos existentes, tanto no interior da cripta quanto no ambiente externo. A análise quantitativa demonstrou distribuições heterogêneas de esporos e diferentes concentrações de pico nas áreas estudadas.

DOCAMPO *et al.* (2011) estudaram o teor de esporos da atmosfera da Caverna de Nerja, uma cavidade que se constitui numa importante atração turística situada na costa oriental de Málaga (sul da Espanha), durante um período ininterrupto de quatro anos (2002-2005). Na atmosfera da caverna foram detectados 72 tipos de esporos diferentes durante o período estudado e a concentração média diária de até 282.000 esporos/m³ foi alcançada. *Aspergillus/Penicillium* foram os tipos de esporo mais abundante com uma percentagem média anual de 50% do total, seguido por *Cladosporium*. Outros gêneros presentes no trabalho atual foram identificados na obra de DOCAMPO *et al.* (2011), tais como *Arthrinium* e *Massarina*. A origem dos esporos dos fungos encontrados dentro da caverna foi discutida com base nas concentrações do interior/exterior e no comportamento sazonal observado.

Em um estudo aerobiológico realizado por PORCA *et al.* (2011), sobre salas selecionadas de diversas cavernas espanholas e francesas com pinturas rupestres, *Arthrinium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aureobasidium pullulans* e *Ochroconis sp.* foram, novamente, alguns dos diversos fungos identificados.

Outro trabalho sobre pinturas rupestres, na caverna de Lascaux, na França, foi desenvolvido para detectar e quantificar a espécie *Ochroconis lascauxensis*. MARTIN-SANCHEZ *et al.* (2013) verificaram que este fungo é o agente causal principal das manchas negras que ameaçam as pinturas paleolíticas deste Patrimônio Mundial da UNESCO. O ensaio de PCR em tempo real específico e sensível foi útil para quantificar a presença de *O. lascauxensis* nas manchas sobre as paredes, sedimentos e ar da cavidade. Os resultados confirmaram a associação desse fungo com as manchas pretas e sua ampla disseminação em todos os

compartimentos da caverna. Outras 13 espécies de fungos frequentemente isoladas de cavernas foram detectadas, dentre elas, as espécies *Cladosporium* sp. e *Penicillium commune*.

Em suma, qualquer que seja a peça museológica ou o documento arquivístico ou bibliográfico, seremos defrontados por uma grande diversidade de fungos e bactérias, potencialmente nocivos às peças. Microrganismos ambientais tendem a ficar dormentes por vários meses ou anos, aguardando condições climatológicas adequadas e disponibilidade nutricional para sua multiplicação e princípio de biodeterioração. O que se conclui do presente trabalho é que há informações bem sistematizadas sobre ocorrência fúngica em peças do Patrimônio Histórico, tais como o Trono Imperial. No entanto, o que se observou foi uma diversidade bacteriana tão representativa quanto a diversidade fúngica, esta última amplamente documentada na literatura. Cabe, em investigações futuras, direcionar esforços para a pesquisa sistematizada dessa ocorrência bacteriana. Por estarem presentes nestes ambientes e suportes é porque encontraram condições ambientais adequadas e disponibilidade de fontes nutricionais. PIÑAR *et al.* (2015) estudaram um manuscrito em pergaminho identificando a presença de bactérias, na sua maioria não cultiváveis, e oriundas da pele humana. No entanto, em acordo com o presente artigo, a alta diversidade fúngica parece mascarar a atividade bacteriana. Dessa forma, antes de pensar sobre a biodeterioração do Patrimônio Cultural, esforços devem ser direcionados para uma conservação preventiva que efetivamente impeça a multiplicidade de espécies bacterianas e fúngicas que aguardam silenciosamente o momento de iniciar sua atividade destrutiva.

3.1.2 Peça museológica II: Obra de Cândido Portinari (Museu Nacional)

Foram encontrados diversos fungos nas três regiões selecionadas para a coleta das amostras: no ar da sala onde se encontrava o quadro, sobre o desenho no quadro e no tecido suporte do quadro.

Um total de 17 fungos foram isolados, correspondentes a 11 diferentes gêneros e 13 diferentes espécies. A Tabela 11 apresenta os resultados da

distribuição das espécies e gêneros fúngicos obtidos de cada região de amostragem.

A identificação dos fungos foi realizada a partir da técnica de biologia molecular desenvolvida a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o sequenciamento do DNA. Para esta finalidade, o marcador molecular utilizado foi o sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Este separa os genes 18S e 28S do rDNA. *Primers* específicos foram posicionados nestas regiões (ITS 4 e ITS 5). Por essa região ser altamente conservada intraespecificamente, embora variável entre diferentes espécies, é possível fazer a distinção ao nível específico (FUNGARO, 2000). Dessa forma, após a obtenção do DNA genômico dos isolados fúngicos e posterior sequenciamento da região ITS5 e ITS4, alguns isolados fúngicos foram identificados por análise de similaridade com o banco de dados (National Center for Biotechnology Information - NCBI).

Tabela 11 – Gêneros e espécies isoladas e identificadas

Ar da sala	Desenho	Borda do tecido
<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>	<i>Cladosporium perangustum</i> ;
<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Cladosporium halotolerans</i> ;
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	<i>Curvularia lunata</i> ;
<i>Cladosporium subuliforme</i>	<i>Arthrinium marii</i>	<i>Cladosporium tenuissimum</i> ;
	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>
	<i>Nigrospora sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>
	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Periconia macrospinosa</i> ;
	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Penicillium raistrickii</i>
		<i>Cladosporium sp.</i>

Fonte: A autora, 2018.


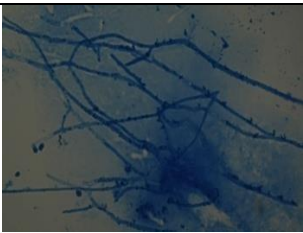






3.1.3 Viabilidade dos fungos após a radiação gama

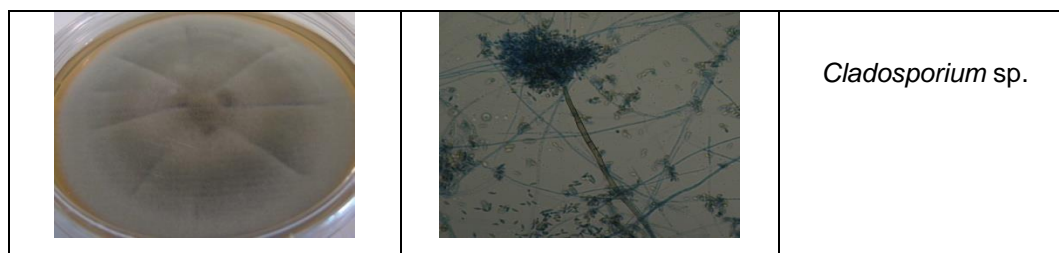
Após a irradiação dos fungos, realizou-se o teste de viabilidade microbiana a partir da análise do crescimento dos mesmos nas condições de cultivo normais. A

maioria dos microrganismos não apresentou viabilidade a partir da primeira dose de radiação a que foram submetidos, ou seja, 16 kGy, sendo classificados, então, como inativos. Essa viabilidade foi verificada pela existência ou não de crescimento microbiano após ter sofrido a irradiação.

De todos os fungos isolados que foram submetidos à radiação gama, apenas os que estão apresentados na Figura 41 foram resistentes à dose de radiação de 16kGy já que ainda apresentavam crescimento mesmo após terem sofrido irradiação.

Figura 41 – Imagens apresentando os aspectos macroscópicos e microscópicos dos fungos isolados e identificados que foram resistentes à irradiação de 16 KGy

Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico	Fungo
		<i>Nigrospora</i> sp.
		<i>Curvularia lunata</i>
		<i>Cladosporium halotolerans</i>
		<i>Penicillium</i> sp.



Fonte: A autora, 2019.

Alguns fungos apresentaram resistência à irradiação apresentando viabilidade ainda na dose de 16 kGy. Sendo assim, ao serem submetidos a doses maiores, ou seja, de 19 kGy e de 22 kGy, novos testes de viabilidade foram realizados e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Viabilidade fúngica após irradiação

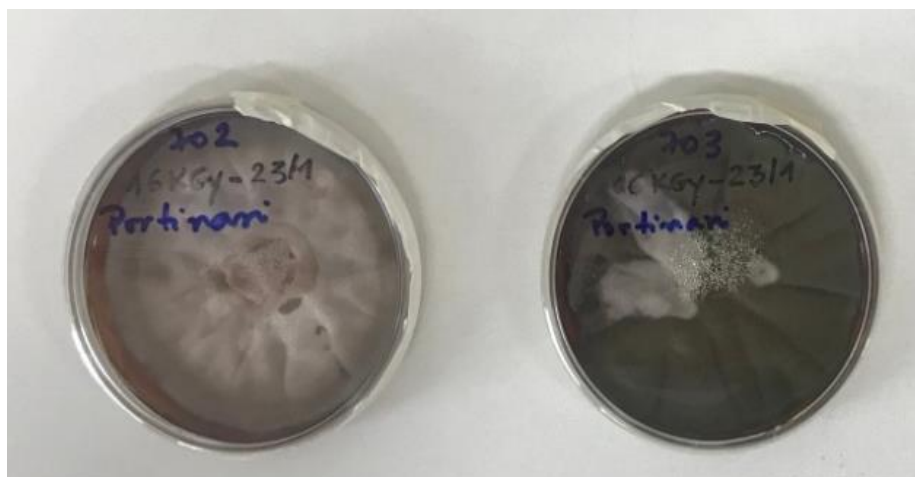
Fungo	16 kGy	19 kGy	22 kGy
<i>Nigrospora sp.</i>	☺	x	x
<i>Curvularia lunata</i>	☺	x	x
<i>Cladosporium halotolerans</i>	☺	☺	x
<i>Penicillium sp.</i>	☺	x	x
<i>Cladosporium sp.</i>	☺	☺	x

Legenda: ☺ : Ainda ativos (viáveis); x: inativos

Fonte: A autora, 2019

As Figuras 42, 43 e 44 apresentam as imagens relacionadas à presença de viabilidade fúngica após terem sido submetidos à irradiação de 16 KGy mostrando, dessa forma, o crescimento das espécies que foram tolerantes à radiação. Pode-se observar que a maioria deles apresenta uma coloração escura.

Figura 42– Imagem da presença de viabilidade fúngica após a irradiação de 16 KGy



Legenda: à esquerda: *Nigrospora* sp. e à direita *Curvularia lunata*
Fonte: A autora, 2019.

Figura 43 – Imagem da presença de viabilidade fúngica da espécie *Cladosporium* sp. após a irradiação de 16 KGy



Fonte: A autora, 2019.

Figura 44 – Imagem da viabilidade fúngica da espécie *Penicillium* sp. (à esquerda) e da espécie *Cladosporium* sp. (à direita) após a irradiação de 16 KGy e 19 KGy, respectivamente



Fonte: A autora, 2019

Os resultados obtidos apresentam os gêneros e as espécies encontrados na obra de Portinari (Tabela 11) que são muito comuns em museus e salas de armazenamento. Em climas moderados ou úmidos, as comunidades fúngicas estão dominadas pelos hifomicetos incluindo espécies de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aureobasidium* e *Phoma*. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, entre outras, também são sempre encontradas em livros, pergaminhos e pinturas (STERFLINGER, 2010). A mera presença de certas espécies de fungos contaminantes pode representar, por si só, uma ameaça para a saúde e para a conservação do patrimônio cultural. Por exemplo, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *C. globosum*, *C. cladosporioides*, *P. corylophilum*, *Penicillium crustosum*, *P. crysogenum*, *P.olsonii* e *P. oxalicum*, são considerados como potenciais agentes patogênicos (CARVALHO *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de fungos em museus é intimamente determinado pelo clima interior, pela quantidade de nutrientes disponíveis e também pelo intervalo de limpeza do museu. O clima interno como indicado pela temperatura, umidade relativa e pela umidade específica é o fator mais importante para o crescimento fúngico. Em salas de armazenamento onde a umidade é maior que 70% por um período de muitas semanas ou meses, uma grande diversidade fúngica pode se estabelecer sendo 55% o limite para o crescimento fúngico. Assim, o controle climático deve ser ajustado para valores abaixo disso já que fungos que são capazes de sobreviver à umidade relativa de 55% são raros e restritos a ambientes

extremos. Instituições como museus, galerias, bibliotecas e arquivos são fortemente advertidos para garantir condições de temperatura e umidade ótimas de forma a manter suas coleções baseadas em matéria orgânica, livres de prejuízos mecânicos e de biodeterioração (STERFLINGER, 2009). Entretanto, foi realizado o registro da umidade relativa onde a obra estava armazenada e verificou-se que, apesar da umidade relativa do dia estar em 64%, na sala onde a obra estava salvaguardada não havia controle de UR, nem de temperatura e nem de luminosidade. Tais condições podem ter agravado a contaminação e a proliferação fúngica desordenada e imprevisível. Como já foi reportado, até quando se mantém a UR em torno de 60%, as coleções não estão livres de contaminação e proliferação fúngica. A condensação da água ocorre em superfícies frias até quando estão em baixa UR, e isto representa oportunidade de crescimento para diferentes espécies fúngicas, uma vez que eles não são muito exigentes em termos nutricionais e são capazes de prosperar em uma ampla gama de substratos. (CARVALHO *et al.*, 2018).

Os mais preciosos documentos da humanidade são livros e tecidos feitos de papel, papiros e pergaminhos. Devido à grande diversidade de exoenzimas produzidas pelos fungos – celulasas, glucanases, “laccases”, fenolases, queratinases, mono-oxigenases e muitas outras- e sua notável habilidade para crescer em baixos valores de a_w , a preservação de objetos de museus está inevitavelmente conectada com a prevenção, monitoramento e tratamento do mofo em objetos contaminados. (STERFLINGER, 2010).

Foi verificado o isolamento de várias espécies de *Penicillium* e *Cladosporium* nas três regiões monitoradas - ar, desenho e borda - evidenciando a predominância que eles assumem na contaminação e proliferação fúngica em obras de arte. Estudos revelam que o microfungo do gênero *Penicillium*, dentre a maioria dos agentes que promovem a biodeterioração, é um organismo onipresente responsável por modificações em suportes de papel. Sendo um fungo celulolítico, ataca o papel quando vive em ambiente favorável para seu crescimento, ou seja, com temperatura e umidade favoráveis e outros elementos nutricionais essenciais disponíveis. Tais condições são muito comuns em bibliotecas e acervos que guardam peças históricas já que muitos deles não possuem um controle rígido dessas condições, podendo haver assim presença de sujeiras, umidades vindas de infiltrações e até mesmo possíveis descontroles ambientais, como enchentes, demolições, etc. (MAGAUDDA, 2004).

O presente trabalho também revelou a contaminação do ar da sala pela presença de algumas espécies de fungos. O perigo dessa contaminação reside no fato de que os esporos dos fungos suspensos no ar são um risco tanto para a saúde humana quanto para os materiais de arte. Suas habilidades de biodeterioração podem potencialmente causar prejuízos irreversíveis em peças de arte e outros objetos do patrimônio cultural. Já foi reportado por outros autores que a contaminação do ar é o principal veículo para a disseminação. Além disso, a co-ocorrência da mesma espécie fúngica em obras de arte e em amostras do ar é por si só demonstrativa dessa contaminação cruzada (CARVALHO *et al.*, 2018).

Diante da presença de tantas espécies isoladas, algumas de forma repetida em vários pontos de coleta, a utilização da radiação gama para se fazer a inibição desses fungos foi aplicada. Sabe-se que a radiação gama destrói a estrutura do DNA das células inibindo completamente o crescimento fúngico uma vez que elas perdem suas funções. A inibição incompleta pode causar apenas um pequeno prejuízo às células. Raios de alta energia da irradiação prejudicam diretamente o DNA dos organismos vivos, induzindo as ligações cruzadas e outras mudanças que tornam um organismo incapaz de crescer ou reproduzir. Quando esses raios interagem com moléculas de água em um organismo, eles geram radicais livres transientes que podem causar prejuízo indireto adicional ao DNA. Além disso, outros fatores podem estar envolvidos para a sensibilidade dos fungos ou a tolerância à radiação gama. Esporos multicelulares ou esporos bicelulares são mais tolerantes à radiação gama do que esporos unicelulares. Além disso, o número ou densidade de micélios no inóculo exposto à radiação pode afetar a dose de radiação requerida para a inativação do microrganismo. Geralmente, uma alta densidade de micélio no inóculo, necessita elevar a dose de radiação (SHATHELE, 2009).

Neste presente trabalho, foram adotadas três doses de radiação: 16, 19 e 22 kGy. Tais valores estipulados foram baseados em estudos anteriores já realizados e publicados na literatura que revelam que, algumas espécies de fungos podem ser resistentes à radiação gama ou desenvolver alguns mecanismos de tolerância sendo portanto, difíceis de sofrerem uma inibição completa. Os resultados apresentados mostraram que os fungos do gênero *Penicillium*, *Cladosporium*, *Nigrospora* e *Curvularia* apresentaram uma resistência à radiação quando foi aplicada a dose de 16 kGy, uma vez que, após irradiados, ainda apresentaram crescimento. No entanto,

o mais resistente de todos foi do gênero *Cladosporium*, que só apresentou ausência de crescimento na dose de 22 kGy.

Os resultados obtidos nesse trabalho estão coerentes com os já apresentados por outros autores que realizaram estudos com a espécie *C.cladosporioides*. De acordo com BONIEK *et al.* (2017), esta foi a única espécie resistente à exposição da radiação gama e esta característica pode estar relacionada ao fato de que algumas cepas têm a capacidade metabólica de produzir uma tinta preta (o biopolímero melanina) que se acumula dentro do micélio e protege contra os raios UV e radiação ionizante. Em outros trabalhos já publicados resultados mostraram que espécies fúngicas radiotróficas usam a melanina para converter a radiação beta e gama à energia química para crescimento. De fato, conforme os resultados apresentados nas Figuras 42 e 43, verificou-se que os fungos tolerantes exibiram uma coloração escura, evidenciando a presença do pigmento melanina que pode estar está associado à este mecanismo de resistência.

A resistência de alguns fungos comuns à radiação gama também foi estudada por SALEH *et al.* (1988). Dez espécies de fungos representando os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium* foram examinadas por sua resistência à radiação gama a partir de uma fonte de ^{137}Cs . Neste estudo, foi constatado que os fungos que possuem hifas com melanina tais como: *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata* e *Curvularia geniculata* sobrevivem a altas doses de radiação gama. Os macroconídios de *Curvularia* e *Alternaria* sp., que são de parede multicelular e grossa e contém pigmento melanina, apresentaram resistência e, essas duas características podem, provavelmente, contribuir para o aumento da resistência dessas espécies.

Em outro trabalho foi verificado que dentre todos os fungos isolados de documentos suportados em amostras de pergaminho, os gêneros mais frequentes (e mais resistentes à radiação gama) foram *Penicillium* e *Aspergillus*. (NUNES *et al.*, 2013). Tais resultados corroboram com os já apresentados nesse trabalho, onde verificou-se uma resistência à radiação do gênero *Penicillium*.

É importante salientar que existe uma preocupação com as consequências das doses de radiação empregadas com relação à integridade do suporte. Apesar de não terem sido feitos estudos nesse trabalho relacionados à essa questão, até porque os fungos isolados foram irradiados em placa de Petri, um levantamento das

doses já utilizadas quando o suporte é papel ou pergaminho, foi realizado. A literatura reporta que a radiação gama já foi usada em outros para descontaminar papel e outros materiais de arquivo, mostrando que doses entre 3 e 10kGy foram efetivas na descontaminação de microfungo, sem causar alterações significativas dos materiais de arquivo. E também que altas doses (em torno de 15kGy) foram aplicadas na desinfecção do papel, sem também causar prejuízo ao suporte. Mesmo assim, não existe quase nada na literatura sobre os efeitos da radiação gama em documentos em pergaminho. Mesmo assim, os autores sugeriram como 5kGy uma dose mínima a ser aplicada para a descontaminação de documentos em pergaminho quando o principal objetivo for o de descontaminar vez de esterilizar. (NUNES *et al.*, 2013).

Um trabalho realizado por RIZZO *et al.* na restauração de pinturas do século XVII, considerou, baseado em estudos anteriores realizados por BELYAKOWA (1961) e TOMAZELLO (1994), que a dose de radiação apropriada para eliminar microrganismos é de 6 kGy e 25 kGy é a dose padrão para a esterilização.

Em outros trabalhos realizados, verificou-se que a dose máxima já utilizada onde o suporte é o pergaminho foi de 30 kGy já que não houve prejuízo ao suporte. Porém o estudo não foi muito conclusivo uma vez que existem muitos tipos de pergaminhos que precisam ser testados (Nunes *et al.*, 2012)

NEGUT *et al.* (2012) realizaram um estudo sobre os defeitos induzidos pela radiação gama com fonte de ^{60}Co , em pigmentos históricos. Os resultados revelaram que as mudanças induzidas pela radiação em 22 pigmentos históricos, 3 meses após a irradiação, não foram expressivas ou porque não houve de fato mudança de cor do pigmento, ou porque as mudanças foram reversíveis. Sendo assim, concluiu-se que a radiação gama apresentou-se como um tratamento de descontaminação confiável.

Técnicas de descontaminação utilizando outras fontes de radiação têm sido estudadas na busca por técnicas de descontaminação que provoquem menos efeitos danosos sobre o objeto de patrimônio cultural a ser desinfetado. VADRUCI *et al.* (2019) estudaram a aplicabilidade da radiação por raio-X utilizando uma fonte de radiação ionizante REX (Removable Electrons to X-rays). A forma de operação do equipamento permitiu a esterilização de objetos do patrimônio cultural e conferiu segundos. A técnica foi testada em pergaminho. Os resultados demonstraram que com esta fonte de radiação foi possível modular as condições de trabalho para

interromper o crescimento de microrganismos biodeteriorantes em pergaminhos, sem causar alteração na cor e na consistência estrutural do substrato nas doses testadas consideradas seguras, ou seja, abaixo de 1kGy. Verificou-se que doses maiores que 10^3 Gy induzem a claros efeitos na estabilidade das fibras de colágeno.

Não restam dúvidas, entretanto, que o uso da radiação gama para a descontaminação dessa obra de Portinari estudada pode ser a técnica mais apropriada uma vez que o desenho foi feito com carvão sobre papel Kraft, o que não permitiria que outras técnicas de descontaminação, que são bastante utilizadas na prática em peças de museus, como banhos com solventes ou aplicação de produtos químicos fossem utilizadas.

A dose de radiação que deve ser adotada ainda é um tema que merece ser bem analisado e estudado, uma vez que não há uma dose padrão recomendada, visto que há muitos fatores a serem levados em consideração. O primeiro deles diz respeito aos fungos presentes já que alguns são mais sensíveis e outros mais tolerantes à radiação gama. O segundo fator relaciona-se à natureza do suporte da obra de arte, ou seja, se ele é de papel, madeira, tecido, pergaminho, etc. E o último diz respeito à finalidade da utilização da irradiação, ou seja, se ela se destina à descontaminação ou à esterilização. Essa decisão deve ser bem analisada e discutida por uma equipe de multiprofissionais ligados à área da restauração. De acordo com as teorias da ética e preservação do patrimônio histórico e cultural, a mínima intervenção na obra deve ser adotada como premissa, salvaguardando sua originalidade e autenticidade visando garantir sua longevidade e seu correto armazenamento.

3.2 PARTE II – Emprego da Fluorescência de Raio-X como técnica não destrutiva de análise

3.2.1 – Fluorescência de Raios-X na análise dos suportes

A Tabela 13 apresenta a composição metálica contida nos suportes utilizados antes da adição das preparações de tinta ferrogálica e, portanto, ainda sem o tratamento com fitato de cálcio.

Tabela 13 - Composição metálica dos papéis (suportes)

Elementos	Papel ácido (%)	Papel alcalino (%)
Ti	75,65	74,82
V	8,50	7,75
Mn	4,42	4,81
Ni	3,24	3,84
Cu	2,24	2,65
Fe	1,86	1,22
Mo	1,46	1,64
Nb	1,03	1,21
Cr	0,85	1,29
W	0,57	0,61
Co	0,07	0,04
Total	100	100

Fonte: A autora, 2020.

Os resultados indicaram uma expressiva concentração de titânio no suporte coerentemente ao uso do dióxido de titânio como aditivo industrial do papel, tanto para papéis ácido quanto alcalino (75,6% e 74,2%, respectivamente). O segundo elemento de maior concentração encontrado foi o vanádio, com uma concentração percentual próxima a 8%. Para os valores de ferro e cobre, o segundo se apresentou um pouco mais alto em ambos os papéis ácido e alcalino, 2,2% e 2,6%

respectivamente, enquanto que os valores de ferro ficaram abaixo de 2%. Vale ressaltar que todos os elementos metálicos detectados pela fluorescência de raio-X e apresentados na Tabela 13 são originários dos processos de produção do papel: branqueamento e aplicação de aditivos. Os resultados corroboram com os processos de produção apontados na literatura. Os aditivos funcionais incluem encolantes (alume em meio ácido ou alume-aluminato em meio neutro), recheios, alvejantes óticos, e agentes consolidantes (gelatina, acetato de celulose, carboximetilcelulose). O branqueamento ocorre com a aplicação de agentes branqueadores, basicamente hidróxido de sódio, cloro e seus compostos (hipoclorito e dióxido de cloro) e ozônio. Já a aplicação no recheio, pós minerais são adicionados com objetivo de melhorar as propriedades óticas e baratear os custos de produção. São elementos metálicos, como o caulim, carbonato de cálcio, dióxido de titânio e de alumínio (CALLOL, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

3.2.2 – FRX na análise do ferro em amostras impregnadas pelas tintas antes do tratamento com fitato de cálcio

A primeira análise feita a partir dos resultados obtidos foi a que conferiu a diferença de detecção do ferro ao se utilizar como suporte papel ácido ou papel alcalino em amostras ainda não tratadas com fitato. Os resultados apresentados na Tabela 14 revelam que em todas as preparações de tinta, as quantidades de ferro detectadas foram maiores ao se utilizar o papel alcalino (Whatman). Isso se deve ao fato de o papel alcalino ser menos permeável fazendo com que uma menor quantidade do metal presente nas diferentes preparações entranhe profundamente nas fibras, tornando-os assim, mais facilmente detectáveis na superfície. Cabe ressaltar que a FRX é uma medição de superfície; logo é entendido que o metal é detectado com maior intensidade na interface papel-tinta, relacionando-se também com a espessura da camada de tinta principalmente na superfície da cobertura. Para a quantificação de metais em regiões mais internas do papel ou da tinta, é recomendada a preparação ou trituração da amostra.

Tabela 14 - Detecção por FRX do metal (%Fe) *antes* do tratamento das amostras com Fitato de Cálcio

Tipos de Taninos		Tanino Hidrolisável		Tanino Condensado	
Tipos de Papel		Ácido	Alcalino	Ácido	Alcalino
Preparações da tinta	Quantidades estequiométricas	1,90	7,26*	2,73	5,39*
	Excesso	13,93	32,63	16,79	33,55

Fonte: A autora, 2020.

O papel ácido é um papel sem tratamento, que propicia a aceleração da hidrólise da celulose. Além disso, a encolagem utilizada em sua produção acaba aumentando essa acidez por formação de subprodutos, tornando-o mais frágil e quebradiço. No entanto, justamente por não ter tratamento, a tinta é melhor absorvida e essa observação foi revelada nitidamente nos resultados apresentados.

BRENER *et al.* (2016) relataram que 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 da 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. 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 seja capaz de oxidar o ferro livre (não complexado ao tanino) presente na preparação da tinta. Sendo assim, ela só é favorável em papéis sem tratamento, já que a encolagem age fazendo com que a tinta não permeie tão profundamente nas fibras do papel (ZHANG *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2014).

A segunda análise feita a partir dos resultados obtidos foi a que conferiu a diferença de detecção do ferro ao se utilizar diferentes fontes de tanino, ou seja tanino hidrolisável (TH) e tanino condensado (TC). Os resultados mostraram que para os papéis ácidos, onde a impregnação da tinta é maior já que exibem uma melhor absorção, as tintas contendo **taninos hidrolisáveis** exibiram uma **menor** detecção do metal frente aos taninos condensados (TH: 1,90 *versus* TC: 2,73 e TH:13,93 *versus* TC:16,79). Isso se deve ao fato de que o metal de transição vai complexar muito mais com o tanino hidrolisável do que com o tanino condensado

como já foi observado em estudos anteriores. O ácido gálico derivado do tanino é proveniente da hidrólise do ácido tânico (nome comercial da mistura de galotaninos que pode ter várias origens dependendo de qual espécie vegetal seja proveniente) (SOUZA, 2009). O ácido gálico, que é então a espécie química responsável pela reação de complexação com o ferro, é produzido a partir da hidrólise do tanino obtendo-se então, facilmente, a tinta ferrogálica a partir dos taninos hidrolisáveis (COSTA *et al.*, 2014). Em contrapartida, taninos condensados são altamente resistentes à hidrólise, não permitindo assim a formação em grande quantidade do ácido gálico o que explica sua natureza não reativa com o ferro. Sendo assim, nas preparações contendo tanino hidrolisável, haverá muito mais ferro complexado, sobrando menos íon metálico livre na superfície. Além disso, o complexo galotanato férrico, que é o produto final no processo de formação da tinta, por ser bem absorvido pelo papel ácido, não permite que uma maior quantidade de ferro seja detectada pelo aparelho na superfície. Considerando-se que os taninos condensados exibem uma baixa capacidade de complexar com o ferro, entende-se que uma maior quantidade da espécie Fe^{2+} pode ser detectada na superfície, na forma livre, não complexada, conforme apresentaram os resultados da Tabela 14. Tendência similar ocorreu no papel alcalino, comparando as preparações em excesso, entre os taninos hidrolisável e condensado. Os resultados mostraram que houve uma detecção ligeiramente maior do metal de transição ao se utilizar a preparação com o tanino condensado, 33,55% (TC) *versus* 32,63% (TH), sobre papel alcalino. Isso se explica pelos mesmos motivos já anteriormente abordados, já que ocorreu menor interação entre o ferro e o tanino condensado favorecendo que bastante ferro livre que não complexou (Fe^{2+}) fosse detectado pelo aparelho, reforçado ainda pelo fato de que no papel alcalino e a tinta não é tão bem absorvida. Essas observações corroboram com outros estudos já realizados por COSTA *et al.* (2014), que fizeram um trabalho bastante analítico a respeito da interação do sulfato de ferro com diferentes fontes de taninos vegetais, a fim de se caracterizar o grau de reatividade desse elemento na formação das tintas ferrogálicas. Neste estudo, verificou a partir de imagens de SEM que os taninos condensados são incapazes de formar moléculas complexas com o ferro. Sendo assim, cristais de óxido podem ser formados durante a oxidação do ferro por conta da falta de moléculas tânicas disponíveis para reagir com o ferro, como observado nas imagens da microscopia. No entanto, nas preparações estequiométricas da tinta, um fato intrigante chamou

atenção*: uma maior quantidade de ferro foi detectada pelo aparelho quando se utilizou a preparação com o tanino hidrolisável (TH: 7,26 *versus* TC: 5,39) sobre papel alcalino, quando poderia se esperar o contrário. Isso pode ser atribuído ao seguinte fato: no caso do tanino condensado, o ferro livre (Fe^{2+}) que não complexou com o ácido gálico do tanino para a formação do galotanato férrico (e portanto da tinta propriamente dita), pode ter entranhado para camadas mais profundas do papel alcalino, e por isso o não foi tão detectado na superfície pelo aparelho FRX, nesse ensaio. Essa hipótese parece justificar os resultados não conclusivos obtidos em algumas determinações analíticas. Já no caso da preparação que utilizou o tanino hidrolisável, a própria camada de tinta muito bem formada acabou criando uma barreira física sobre o papel alcalino e o ferro muito bem complexado na tinta foi detectado pelo aparelho na superfície. Sabe-se que, por capilaridade, a tinta é gradualmente absorvida pelas fibras permanecendo na superfície do papel como pequenos depósitos químicos. O aparelho não diferencia a especiação do metal. Sendo assim, metal acabou sendo muito detectado na superfície, tanto o complexado quanto o pouco livre não complexado. Observação similar também foi concluída no trabalho de ROUCHON e BERNARD (2015), que mapearam a penetração da tinta ferrogálica dentro das fibras do papel usando microscopia por R-X de transmissão e varredura. Em seu estudo, observaram que o ácido gálico, por ser uma molécula grande em comparação aos solutos de ferro, provavelmente migra com menos facilidade para dentro da fibra do papel. Sendo assim, esse transporte limitado controla diretamente a distribuição de precipitados de galotanato de ferro III, que, portanto, só ocorre na parte externa da parede celular secundária. Ao contrário do ferro III, o ferro II livre está presente a forma de fases solúveis e migra para a parte interna da fibra. Com isso, o ácido gálico e os precipitados de galotanato de ferro III penetram menos nas fibras em comparação ao ferro II solúvel. Havendo menos metal livre na superfície, menor pode ter sido sua detecção pelo aparelho.

3.2.3 – FRX na análise do ferro remanescente em amostras após o tratamento com fitato de cálcio

A terceira análise feita a partir dos resultados obtidos foi a que conferiu a quantidade de ferro detectada ao se tratar as amostras com fitato de cálcio para remoção do seu conteúdo não complexado na formação a tinta (Tabela 15). Com isso, foi possível observar a eficiência do tratamento com o fitato de cálcio nas amostras impregnadas com as diferentes preparações de tinta ferrogálica utilizadas (Tabela 16).

O tratamento com ácido fítico tem como objetivo interromper o processo de degradação causado pela presença de ácido sulfúrico e pela presença de íons Fe^{2+} , presentes na composição da tinta, devido seu processo de produção. A presença de íons Fe^{2+} é muito prejudicial ao suporte (papel) visto que esse íon catalisa as reações de Fenton que geram subprodutos de natureza oxidante que interagem com o suporte acelerando os processos de degradação natural do papel (Figura 18). O Fe^{2+} livre catalisa a formação de vários radicais e substâncias oxidantes que irão atacar celulose acelerando a sua degradação.

A oxidação catalisada por íons metálicos ocorre por meio de alguns mecanismos. Um deles ocorre via radical livre e promove a cisão entre os carbonos 1 e 4 da celulose. O outro ocorre via oxidação catalisada por íons metálicos, sendo o principal fator de corrosão pela tinta (SOUZA, 2009).

Sendo assim, remover esses íons significa interromper esse processo de degradação já que o ácido fítico atuará em duas frentes principais. Por ser um forte agente quelante, promove a formação do íon Fe^{3+} de forma que, além de bloquear a reação de Fenton o uso do fitato também oferece proteção contra a oxidação por diminuir a concentração de íons Fe^{2+} livres que reforçariam os processos oxidativos. O ácido fítico acelera a oxidação dos íons Fe^{2+} para íons Fe^{3+} reduzindo seu potencial redox. Assim, os íons de Fe^{3+} não poderão ser novamente transformados em íons Fe^{2+} (NEEVEL, 1995).

Tabela 15 - Detecção por FRX do metal (%Fe) após tratamento das amostras com Fitato de Cálcio

Tipos de Taninos		Tanino Hidrolisável		Tanino Condensado	
Tipos de Papel		Ácido	Alcalino	Ácido	Alcalino
Preparações da tinta	Quantidades estequiométricas	1,85	4,53	1,64	2,95
	Excesso	4,33	16,71	10,33	24,55

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 16 - % de redução do metal após tratamento das amostras com Fitato de Cálcio

Tipos de Taninos		Tanino Hidrolisável		Tanino Condensado	
Tipos de Papel		Ácido	Alcalino	Ácido	Alcalino
Preparações da tinta	Quantidades estequiométricas	2,63	37,60	39,93	45,27
	Excesso	68,92	48,79	38,84 *	26,83 *

Fonte: A autora, 2019.

Além da questão da absorção da tinta ser melhor ao se utilizar o tanino hidrolisável, ainda tem a questão da interação do próprio tanino com o metal. Os resultados da Tabela 15 apresentam os teores de metais detectados por FRX após o tratamento com fitato de cálcio, empregado na remoção de metais. Esses resultados reforçam ainda mais essas observações. Comparando-se os resultados das tabelas 14 e 15, pode-se observar que os teores de Fe detectados nas preparações contendo tanino condensado foram reduzidos mais drasticamente do que nas preparações contendo taninos hidrolisáveis (TH: 1,90 → 1,85, redução de 2,65% *versus* TC: 2,73 → 1,64, redução de 39,93% para o condensado), evidenciando que o metal forma complexos mais estáveis com os taninos hidrolisáveis ficando mais retidos neles o que dificulta a remoção com o fitato de cálcio. Já a preparação em excesso apresentou 13,93% de detecção de ferro sobre o suporte ácido antes do

tratamento e 4,3% após o tratamento com o fitato, o que indicou uma redução de 68% na quantidade de ferro que não reagiu, evidenciando ainda mais que realmente havia excesso de metal que não reagiria mesmo com o tanino e que o fitato é uma ótima ferramenta de remoção de metais por quelação.

Por outro lado, verificou-se que nas preparações em excesso, o comparativo da eficiência de remoção entre as preparações com TH e TC não seguiu a mesma lógica. Pelos dados da Tabela 16, observa-se que no TC o tratamento com fitato apresentou 38,84% de remoção do metal enquanto que no TH apresentou 68% de remoção, quando se esperaria o contrário visto que o metal não complexa bem com o TC. De novo, o que pode ter acontecido nessas preparações em excesso foi que todo o conteúdo de ferro não complexado (Fe^{2+}) acabou penetrando em camadas mais profundas da fibra do papel, conforme discutido anteriormente, e nessas regiões o fitato não apresentou boa eficiência de remoção. Além disso, a própria espessura da camada de tinta formada para o TH acabou impedindo a penetração do Fe^{2+} não complexado para as camadas mais profundas, ficando então mais ferro em excesso livre na superfície passível de remoção pelo fitato. Como no TC não há boa formação da tinta, o Fe^{2+} entranha mais profundamente não sendo eficientemente removido pelo fitato. Isso aconteceu apenas nas preparações em excesso com os taninos condensados, o que reforça mais ainda a argumentação exposta visto que nas preparações estequiométricas, apesar do TC não complexar bem com o ferro, se forma uma camada de tinta o que denota a formação de algum complexo entre o tanino e o ferro. Essa espessura de tinta formada acaba dificultando essa entrada mais profunda do conteúdo de ferro livre não complexado deixando-o mais na superfície para ser removido pelo fitato. Todo esse conteúdo em excesso de ferro que não é removido pelo fitato pode acabar oferecendo risco futuro ao suporte já que vem a ser oxidado durante os processos de envelhecimento natural, gerando fragilidade do papel e consequente corrosão desencadeada por fatores químicos, físicos e biológicos. É muito importante remover o ferro mais superficial por estar interagindo com o oxigênio do ar.

Comparando a eficiência de remoção do ferro pelo fitato entre papel ácido e alcalino, os resultados indicaram que, nas preparações estequiométricas, a percentagem de remoção da quantidade de ferro se apresentou maior nos papeis alcalinos. Podemos associar esse fato à pouca absorção de tintas pelo papel o que

pode aumentar a disponibilidade de ferro livre na superfície, facilitando sua remoção pelo fitato. Já nas preparações em excesso, a eficiência de remoção do fitato se apresentou menor para o papel alcalino no comparativo entre os papéis. Com relação à essa observação pode-se associar ao mesmo motivo já discutido anteriormente, onde o grande excesso de íons Fe^{2+} que não formam complexos com ácido gálico tenha migrado por entre as fibras do papel, em camadas mais profundas, e não foram passíveis de remoção pelo fitato. Deve-se admitir também que os papéis alcalinos são menos permeáveis à água devido ao próprio processo de colagem do papel e, por isso, a solução aquosa de fitato não tenha conseguido alcançar eficientemente regiões onde o teor de ferro não complexado estivesse ali em maior quantidade.

Além dessas observações, sabe-se que a técnica do FRX apresenta algumas limitações e até por esse motivo precisa ser bem estudada. Porém estudos mais aprofundados estariam fora do escopo do trabalho, que tinha, também, outras prioridades de estudo. No entanto, cabe aqui ponderar sobre a eficiência da técnica de fluorescência utilizada por meio de aparelho portátil para análise semiquantitativa. A técnica apresenta algumas fragilidades por conta da portabilidade do aparelho. Essa fragilidade tem sido reportada em estudos anteriores, que citam duas condições que podem interferir nas análises. A primeira relaciona-se com a variabilidade do posicionamento do aparelho portátil devido a restrições no local e a forma complexa de muitos objetos. A segunda fragilidade intrínseca é que o volume analisado será muito diferente em relação ao elemento medido, portanto a profundidade de penetração dos elementos leves está próxima da superfície e está acima de vários μm para elementos mais pesados e vários mm para outros elementos ainda maiores como Sn, Sb. As medidas para elementos de baixo número atômico são, portanto, muito sensíveis a possível corrosão. Uma escolha errada no método de calibração também pode afetar os resultados (ARLI *et al.*, 2020).

Revisões da literatura apontam que essas limitações da técnica se baseiam em baixa sensibilidade, altos limites de detecção, dificuldades de obter resultados reproduzíveis a partir de amostras heterogêneas além de limitações para obter espectros de elementos de baixo número atômico. Outras limitações da técnica estão relacionadas com tamanho, superfície irregular, heterogeneidade e fragilidade das amostras e, no caso de objetos arqueológicos, presença de camadas

modificadas devido a processos de pós-deposição que afetam objetos metálicos, como o bronze (RUBIO-BARBERÁ, 2019).

Em um trabalho realizado por BUDNAR *et al.* (2006), que utilizaram a técnica PIXE (Proton induced X-Ray spectrometry) como ferramenta não destrutiva de análise em tintas ferrogálicas presentes em documentos históricos, os autores verificaram e apontaram alguns possíveis problemas analíticos como limitações da técnica como ferramenta de análise. De acordo com o estudo, eles concluíram como possíveis problemas analíticos: I. o perfil de profundidade da tinta depositada no papel *versus* a faixa de próton emitida pelo aparelho; II. A mudança de composição da matriz devido á presença da tinta; III. Concentração de peso dos elementos no papel; IV. Não homogeneidade na distribuição lateral da tinta no papel; V. rugosidade da superfície do papel; VI. Fluorescência secundária originada a partir da produção de raios X a partir de elementos mais leves devido a presença de elementos mais pesados.

Outros trabalhos, revisados por TROYACK (2020), apontaram alguns interferentes para a análise por pXRF. Estes incluem: os efeitos físicos da matriz (tamnho de partícula, homogeneidade, condição de superfície da amostra); umidade (já que a radiação fluorescente é absorvida pela água, espalhando a radiação primária); posicionamento da amostra em relação a janela de leitura do aparelho (o sinal de raio X diminui conforme a distância da fonte radioativa aumenta); efeitos químicos da matriz, relacionados a interferências entre diferentes elementos químicos presentes na amostra.

Por fim, pode-se afirmar que, apesar de algumas falhas, com certeza a técnica apresenta eficiência para o propósito a que se destina: detectar o ferro em tintas ferrogálicas que possam estar causando corrosão e acelerando processos de degradação. Conservadores e cientistas de materiais concordam que a hidrólise catalisada por ácido e a oxidação catalisada por metal são os dois maiores processos químicos responsáveis pela perda da força mecânica do suporte de papel. No trabalho desenvolvido por LIU *et al.* (2017), documentos reais contendo tinta ferrogálica foram submetidos à degradação acelerada a partir de seis combinações de T e UR nos intervalos de 50-80°C/20 a 80% UR. Os resultados indicaram que a degradação hidrolítica predomina durante a degradação induzida pela tinta. No contexto das amostras históricas usadas no estudo, a presença da tinta acelerou a degradação do papel por um fator constante de 1,59 em

comparação com papel sem tinta. Esse é mais um estudo que mostra a importância em se estudar métodos que retardem a corrosão causada pela tinta nos processos de degradação do papel.

ALBERTIN *et al.* (2016) fizeram uma análise química por fluorescência de raios-x e tomografia de raios-x para decifrar palavras e desenhos de dentro de um livro manuscrito fechado do século XVIII, de 200 páginas. Eles concluíram que a química da tinta é essencial: a leitura tomográfica é viável graças ao ferro presente nas tintas antigas (ferrogálica) ao longo de um milênio - enquanto que as tintas de carbono ou orgânicas não fornecem contraste suficiente de raio-X. Os resultados apresentados são um avanço fundamental para o objetivo final da técnica: leitura não invasiva de documentos frágeis e / ou não abertos.

Como alternativa ao fitato de cálcio para evitar a degradação de documentos histórico-científicos com escrita ferrogálica, POGGI *et al.* (2016) estudaram o efeito da aplicação de nanopartículas de hidróxido de cálcio em soluções de gelatina hidroalcoólica. Utilizando Microscopia eletrônica de varredura equipada com espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (SEM-EDX), eles avaliaram que o tratamento aplicado elevou o pH a um valor apropriado e foi distribuído homogeneamente sobre as superfícies tratadas. Isso indica a necessidade do emprego de técnicas complementares para a completa compreensão dos fenômenos que envolvem os processos de corrosão química em documentos redigidos com tintas ferrogálicas.

Concluindo, a utilização do espectrofotômetro portátil de fluorescência de raios-X mostrou-se um instrumento relevante para a disposição de documentos em grupos, com diferentes níveis de deterioração por oxidação de tintas metaloácidas, com o intuito de classificá-los por prioridades e prosseguir com o tratamento adequado para a sua preservação, desde uma remoção mecânica à lavagem com fitato de cálcio.

Em relação aos resultados observados após a lavagem das amostras, comprovou-se a eficiência desse tratamento, que reduziu significativamente o ferro em excesso da superfície dos papéis, evitando, assim, o processo de oxidação do suporte por esse metal.

Este estudo, em conjunto com outras ferramentas, permite responder questões sobre diversos parâmetros (tipo de tanino, tipo de papel, interação dos

metais, tratamento, etc.) que contribuem para a identificação dos fatores que alteram a permanência de documentos escritos com tintas metaloácidas.

CONCLUSÕES

Os processos de biodeterioração estão intimamente relacionados com a presença de bactérias e fungos em materiais celulósicos. Os microrganismos identificados apresentam uma relação muito coerente com o tipo de ambiente já que os gêneros e espécies fúngicas encontrados são muito comuns em museus. No entanto, representam ameaça para a saúde e para a conservação do patrimônio. A falta de controle de UR, T, luminosidade e intervalo de limpeza: podem ter agravado a contaminação e a proliferação desses agentes microbianos.

No estudo de biodeterioração do Trono Imperial verificou-se a ocorrência maior de fungos do que de bactérias. Após os procedimentos de higienização e restauro observou-se uma redução percentual de 47% para os fungos e de 85% para as bactérias evidenciando maior resistência fúngica. A reincidência do gênero fúngico *Cladosporium* (celulolítico) após restauro também alertou quanto à necessidade de maior atenção quanto a esse grupo microbiano. O ambiente onde a obra estava salvaguardada deve ser controlado e monitorado já que os resultados revelaram que a contaminação do ar pode ter sido o principal veículo da contaminação bacteriana do objeto de patrimônio. A reincidência de algumas bactérias além de contaminação por “novas” bactérias após restauro podem estar associadas a ações de manuseio. Tais resultados mostram o risco potencial que esse grupo microbiano representa à biodegradação por conta da sua persistência e reincidência no ambiente e facilidade de disseminação tanto quanto os fungos filamentosos. É importante ressaltar que o ambiente de restauração consta de diversas peças sendo restauradas simultaneamente, possibilitando tanto recontaminação quanto novas contaminações. Além disso, nos ambientes onde as peças ficam expostas para visitação no museu, muitas vezes são ambientes sem controle climático e ambiental, onde verifica-se presença de portas e janelas abertas o que interfere diretamente na questão da grande amplitude em termos de UR, possibilitando o crescimento descontrolado de microrganismos oportunistas.

Espécies de *Penicillium* e *Cladosporium* foram predominantes na contaminação e proliferação fúngica. Os esporos dos fungos suspensos no ar foram o principal veículo para a disseminação e a co-ocorrência da mesma espécie na obra de arte e no ar revela a existência de contaminação cruzada.

Dentro desse contexto, o uso da radiação gama revelou ser a técnica mais apropriada de descontaminação para a obra estudada, por se tratar de um desenho feito com carvão, onde não se poderia utilizar nenhuma outra técnica de tratamento. No caso da obra de Portinari, a dose de radiação testada apresentou eficácia para a eliminação dos isolados fúngicos resistentes. Apesar de não haver uma dose padrão recomendada na literatura, visto que há muitos fatores a serem considerados, o presente estudo ponderou o fato de se tratar de objeto de patrimônio histórico e cultural, sendo relevante o máximo respeito à originalidade da obra e princípio da mínima intervenção. Dentro desses princípios, reflexões quanto à finalidade da utilização da radiação, a natureza do suporte e os fungos presentes na obra foram os aspectos que nortearam o desenvolvimento do trabalho e os critérios utilizados no estudo.

A técnica da fluorescência de raio-X por meio do aparelho portátil (p-FRX) na análise da composição da tinta ferrogálica apresentou grande utilidade para análise de papéis em processo de oxidação agravado pela presença de tintas ferrogálicas. A portabilidade do instrumento associada à sua eficiência ao que se propõem foram de grande utilidade visto que o manuseio dos documentos históricos são difíceis e devem ser ao máximo evitados.

O tratamento dos documentos contendo tinta ferrogálica com o fitato reduziu bastante o ferro em excesso, evitando assim novas corrosões do papel causadas pela presença de íon metálico na superfície que interage com o oxigênio do ar.

Apesar da técnica da Fluorescência por Raio-X (pFRX) apresentar algumas fragilidades relacionadas à variabilidade do posicionamento do aparelho portátil, à heterogeneidade das amostras e principalmente ao fato de se limitar à superfície, a associação com outras ferramentas permite responder questões sobre diversos parâmetros que contribuem para a identificação dos fatores que alteram a permanência de documentos escritos com tintas metaloácidas.

Por fim, o presente estudo certamente vem a agregar conhecimento científico na área de preservação e conservação de patrimônio histórico e cultural, uma vez que cada vez mais a interdisciplinaridade entre as diversas áreas do conhecimento se torna relevante nas escolhas das técnicas e tratamentos de intervenção e controle nos grandes museus e salas de armazenamento das obras e documentos de valor histórico e cultural.

Como sugestões para continuidade dos estudos realizados no presente trabalho, seguem alguns pontos: com relação aos processos de biodeterioração, deve-se explorar de maneira mais contundente os procedimentos de microbiologia clássica quanto ao cultivo, isolamento e identificação dos microrganismos cultiváveis visto que estes microrganismos são os que, efetivamente, mais causam danos às obras que estão salvaguardadas nos museus e salas de armazenamento sem controle ambiental adequado. Nesse sentido, conhecendo as características dos isolados microbianos, será possível direcionar de maneira mais assertiva os procedimentos de desinfecção, buscando interromper definitivamente os processos biodeteriorantes que estão causando danos aos patrimônios em questão.

Buscar no Instituto Portinari obras que possuem as mesmas características estruturais (suporte, meio de impressão do desenho, condições de armazenamento, tempo de vida e processo de envelhecimento natural), para serem estudadas e submetidas ao tratamento de desinfecção por radiação gama, a fim de verificar a eficácia da técnica para o que se propõe.

Outro ponto importante que merece atenção para futuros estudos é a submissão do suporte aos testes de resistência antes e após o tratamento de irradiação para fins de desinfecção, a fim de se verificar os efeitos da irradiação sobre a estrutura da celulose verificando assim a relação custo benefício na abordagem do tratamento adotado.

No que diz respeito ao estudo da FRX, é importante aplicar a técnica em documentos reais e originais, que passaram por processo de envelhecimento natural, a fim de se avaliar também a influência de outros elementos metálicos nos processos oxidativos e corrosivos dos suportes.

REFERÊNCIAS

ADAMO, M.; BRIZZI, M.; MAGAUDDA, G.; MARTINELLI, G.; PLOSSI-ZAPPALÀ, M.; ROCHETTI, F. SAVAGNONE, F. Gamma radiation treatment of paper in different environmental conditions. **Restaurator**. v. 22. p. 107-131. 2001.

ADAMO, M.; GIOVANNOTTI, M.; MAGAUDDA, G.; PLOSSI-ZAPPALÀ, M.; ROCHETTI, 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. p. 41-59. 1998.

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

ALLSOPP, D., Seal, K., Gaylarde, C. **Introduction to biodeterioration**, 2. ed., Cambridge University Press, 2004.

AREA, M. C.; CHERADAME, H. Paper aging and degradation: recent findings and research methods. **BioResources** , v.6, n. 4, p. 5307-5337, 2011.

ARLI, B. D.; FRANCI, G. S.; KAYA, S.; ARLI, H.; COLOMBAN, P. Portable X-ray fluorescence (p-XRF) uncertainty estimation for glazed ceramic analysis: case of iznik tiles. **Heritage**. v. 3. p. 1302-1329. 2020.

ASFORA, Viviane Khoury. **Fluorescência de raios-X por dispersão de energia aplicada à caracterização de tijolos de sítios históricos de Pernambuco**. 105p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco. 2010.

BONIEK, D.; MENDES, I. C., SANTOS, A. F.; STOIANOFF, M. A. Biocidal Effect of Gamma Radiation on the Ecology of Filamentous Fungal Populations Associated with Stone Deterioration. **Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 6, p. 252-259, 2017.

CALLOL, M. V. **Biodeterioração de Patrimônio Histórico Documental: Alternativas para sua Erradicação e Controle**. Rio de Janeiro: Museu de Astronomia e Ciências Afins; Fundação Casa de Rui Barbosa, 2013, 139p.

CAMPOS, P. H. O. V.; KAJIYA, E. A. M.; RIZZUTTO, M. A.; NEIVA, A. C. X-ray fluorescence and imaging analyses of paintings by the Brazilian artist Oscar Pereira da Silva. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 95. p. 362-367. 2014.

CARVALHO, H. R. ; MESQUITA, N.; TROVÃO, J.; RODRIGUEZ, S. F.; PINHEIRO, A. C.; GOMES, V.; ALCOFORADO, A.; GIL, F.; PORTUGAL, A. Fungal contamination of paintings and wooden sculptures inside the storage room of a museum: Are current norms and reference values adequate? **Journal of Cultural Heritage**, v. 34, p. 268-276, 2018.

CASANOVA, C.; PINHEIRO, A. C. Portuguese Archives and Libraries: a Century of Preservation and Conservation Practices for the Control of Biodeterioration. **Conservar Património** (2020) <<http://doi.org/10.14568/cp202004>> Acesso em: 15 mar. 2022.

CASTRO, H. F. PAPEL E CELULOSE. Curso de Processos Químicos Industriais II. 2009. Apostila 4. Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia – Lorena.

CIGLANSKÁ, M.; JANCOVICOVÁ, V.; HAVLINOVA, B.; MACHATOVÁ, Z.; BREZOVÁ, V. The influence on accelerated ageing of parchmente with iron gall inks. **Journal of Cultural Heritage**, v. 15, p. 373-381, 2014.

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.

COSTA, A. C. A.; LINO, L. A. S.; HANNESCH, O.; GRATTAN, D. W. P. Applications of Sebera's Isoperms for Estimating the Impact on Permanence of the Transfer of Important Archival Documents to More Suitable Storage Conditions. **Restaurator**, Vol. 33, p. 156–178, 2012.

COSTA, A.C.A.; ARBCH, M.N.; FERREIRA, A. C. M.; LUTTERBACH, M. T. S.; CHAVES, A. L. O.; Gamma radiation (¹³⁷Cs) for the treatment against resistant fungi in two Brazilian libraries. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v.9, p. 408-420, 2022.

COSTA, A.C.A.; CORREA, 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, 2014.

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. <<https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0227>> Acesso em: 20 fev. 2020.

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.

COUTINHO, M. L.; MILLER, A. Z.; MACEDO, M. F., Biological colonization and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview. **Journal of Cultural Heritage**. v. 16, p. 759-777, 2015.

DADACHOVA E, BRYAN R.A., HOWELL R.C., SCHWEITZER A.D.; AISEN P.; NOSANCHUK J.D.; CASADEVAL, A.; Radioprotective properties of melanin are a function of its chemical composition, free stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment cell melanoma Res**, v. 21, p. 192-199, 2008.

DADACHOVA, E., BRYAN, R.A., HUANG, X., MOADEL, T., SCHWEITZER, A.D., AISEN, P., NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. **Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi**. v.5 p. 1-13, 2007. Disponível em: <www.plosone.org> Acesso em: 22 jan. 2020.

DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A.; Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, p. 525-531, 2008.

DOCAMPO, S.; TRIGO, M. M.; RECIO, M.; MELGAR, M.; GARCÍA-SANCHEZ, J.; CABEZUDO, B. Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): diversity and origin, **Science of the Total Environment**. v. 409, p. 835-843, 2011.

ERENOGLU, R. C.; AKCAY, O.; ERENOGLU, O. An UAS-assisted multi-sensor approach for 3D modeling and reconstruction of cultural heritage site. **Journal of Cultural Heritage**, v. 26, p. 79-90, 2017.

FAROOQ, M.; HASSAN, M.; GULL, F. Mycobial deterioration of stone monuments of Dharmarajika, Taxila. **Journal of Microbiology&Experimentation**. v. 2, n.1, p. 29-33, 2015.

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**, v. 62, p. 669-676. 2007.

FELLER, R.L. Accelerated Aging – Photochemical and Thermal Aspects. **Research in Conservation, The Getty Conservation Institute**. ISBN: 0-89236-125-5. 1995

FIGUEIRA, F.; MATOS, M.; NUNES, A.; AFONSO, M.; ROCHA, A. C.; CAMPELO, J.; FERREIRA, T. **Considerations about foxing stains in three paper collections ranging from the 16th to the 20th century**. *Conservar Património* (2020). <<http://doi.org/10.14568cp2019022>> Acesso em: 18 jun.2021.

FILHO, Virgílio F. Nascimento. Técnicas Analíticas Nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF). Departamento de Ciências Exatas/ESALQ. Lab. De Instrumentação Nuclear/CENA. Julho/1999.

FRAHM, E.; DOONAN, R. C. P. The technological versus methodological revolution of portable XRF in archaeology. **Journal of Archaeological Science**. v. 40, p. 1425-1434. 2013.

FRANÇA, C. L.; BARBOZA, K. M. Uso da radiação gama com fonte de cobalto 60 na desinfestação de acervos documentais. **Revista Brasileira de Arqueometria, Restauração e Conservação**. v. 3, Edição especial, 2010.

FRITOLI, C. L.; KRÜGER, E.; CARVALHO, S. K. P. História do papel: panorama evolutivo das técnicas de produção e implicações para sua preservação. **Revista Ibero-Americana de Ciência da Informação**. v. 9, n. 2, p. 475-502, 2016.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.14, p. 12-16, 2000.

FUNKE, G.; FALSEN, E.; BARREAU, C. Primary Identification of Microbacterium spp. Encountered in Clinical Specimens as CDC Coryneform Group A-4 and A-5 Bacteria, **Journal of Clinical Microbiology** v. 33, n. 1, p. 188-192, 1995.

GONZÁLEZ, J. M.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. Biodeterioro. p. 183-190. In: **La Ciencia y el Arte. Instituto Del Patrimonio Histórico Español**. Ministerio de Cultura, 2008.

GOODELL, B., Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. Wood deterioration and preservation, *Advances in Our Changing World*. ACS Symposium, (2003). <<http://doi.org/10.1021/bk-2003-845ch006>> Acesso em: 30 ago. 2019.

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.

HAJJI, L.; BOUKIR, A.; ASSOUIK, J.; PESSANHA, S.; FIGEURINHAS, J.L.; CARVALHO, M.L. Artificial aging paper to assess long-term effects of conservative treatment. Monitoring by infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-Ray diffraction (XRD), and energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF). **Microchemical Journal**, v. 124, p. 646-656, 2016.

HANNESCH, O.; GARCIA, A. O. C.; AZEVEDO, F. C.; DA COSTA, A. C. A.; CORREA, F. N.; TEIXEIRA, L. A.L.; LUTTERBACH, M. T. S. Formulário Médico, Estudo da materialidade do manuscrito e sua preservação: informações subjacentes . In: Heloisa Meireles Gesteira; João E. F. Leal; Maria Claudia Santiago. (Org.). **Formulário Médico – Manuscrito atribuído aos jesuítas e encontrado em uma área da Igreja de São Francisco de Curitiba**. Rio de Janeiro : Editora Fiocruz, 2019, v. 1, p. 111 – 146.

HATAKKA, A.; HAMMEL, K.E. **Fungal biodegradation of lignocelluloses, Industrial Applications**. [S.l.]: Springer, p. 319 – 340.

HEYRMAN, J.; SWINGS, J. '16S rDNA Sequence Analysis of Bacterial Isolates from Biodeteriorated Mural Paintings in the Servilia Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain)', **Systematic and applied microbiology**. v. 24, n. 3, p. 417-422, 2001.

HUECK, H.J. **The biodeterioration of materials as part of hylobiology material and organisms**, n.1, p-5-34, 1965.

JUNIOR, Sérgio Matias Pereira. **Determinação de cobre, cromo e arsênio em madeira preservada (*Eucalyptus* sp.) pelas espectrometrias de fluorescência de raios X**. 53p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014.

KAKAKHEL, M.A.; WU, F.; GU, J-D.; HUYUAN, F.; SHAH, K.; WANG, W. Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.143, p. 1-7, 2019.

KIM, M. J.; SHIN, H. K.; CHOI, Y. S.; KIM, G. C.; KIM, G. H. An aeromycological study of various wooden cultural heritages in Korea. **Journal of Cultural Heritage**. v.17, p. 123-130, 2016.

KLOCK, U. Lignina - **Disciplina Química da Madeira**. UFPR/DETF. Disponível em: <<http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/lignina20132.pdf>> Acesso em: 31 jan. 2020.

LACLAVETINE, AGER, K.; F. J.; ARQUILLO, J.; RESPALDIZA, M. Á.; SCRIVANO, S. Characterization of the new mobile confocal micro X-ray fluorescence (CXRF) system for in situ non-destructive cultural heritage analysis at the CNA: μ XRF-CONCHA. **Microchemical Journal**, v. 125, p. 62-68, 2016.

LACLAVETINE, K.; BOUST, C.; CLIVET, L.; LE HÔ, A. S.; LAVAL, E.; MATHIS, R.; MENU, M.; PAGLIANO, E.; SALMON, X.; SELBACH, V.; VRAND, C.; LEPAPE, S. Non-invasive study of 16th century Northern European chiaroscuro woodcuts: First insights. **Microchemical Journal**, v. 144, p. 419-430, 2019.

LAVIN, P.; SARAIVA, S. G.; GUIAMET, P. *Scopulariopsis* sp. and *Fusarium* sp. in the Documentary Heritage: Evaluation of Their Biodeterioration Ability and Antifungal Effect of Two Essential Oils. **Microbial Ecology**, v. 71, p. 628–633, 2016.

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.

LIU, X. MENG, H.; WANG, Y.; KATAYAMA, Y.; GU, J.D. Water is a critical factor in evaluating and assessing microbial colonization and destruction of Angkor sandstone monuments. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 133, p. 9-16, 2018.

LIU, Y.; CIGIC, I. K.; STRLIČ, M. Kinetics of accelerated degradation of historic iron gall ink-containing paper. **Polymer Degradation and Stability**. v. 142. p. 255-262. 2017.

LUTTEROTTI, L.; DELL'AMORE, F.; ANGELUCCI, D. E.; CARRER, F.; GIALANELLA, S. Combined X-ray diffraction and fluorescence analysis in the cultural heritage field. **Microchemical Journal**, v. 126, p. 423-430, 2016.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004.

MAGAUDDA, G. The recovery of biodeteriorated books and archive documents through gamma radiation: some considerations on the results achieved. **Journal of Cultural Heritage**, v. 5, p. 113-118, 2004.

MAITLAND C. **AIC 37th Annual Meeting**. Los Angeles: 2009.

MAITLAND, C. Where Archival and Fine Art Conservation Meet: Applying iron gall ink antioxidant and deacidification treatments to corrosive copper watercolors. **Paper Conservator**, AIC 37th Annual Meeting. Los Angeles, California, 2009, 37.

MANSO, M.; PESSANHA, S.; CARVALHO, M.L. Artificial aging process in modern papers: X-ray spectrometry studies. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 922-928, 2006.

MARTÍNEZ-GARRIDO, M. I.; FORT, R.; GÓMEZ-HERAS, M.; VALLES-IRISO, J.; VARAS-MURIEL, M. J. An overview of non-destructive and minimally invasive techniques for moisture control in the cultural heritage. **Journal of Applied Geophysics**, 2018.

MARTIN-SANCHEZ, P. M.; BASTIAN, F.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENEZ, C.O. Real-time PCR detection of *Ochroconis lascauxensis* involved in the formation of black stains in the Lascaux Cave, France. **Science of the total environment**, v. 443, p. 478-484, 2013.

MARUŠIĆ, K.; KLARIĆ, M.S.; SINČIĆ, I.; PUČIĆ, I.; MIHALJEVIĆ, B. Combined effects of gamma-irradiation, dose rate and mycobiota activity on cultural heritage – study on model paper. **Radiation Physics and Chemistry**, 2019.

MARVASI, M.; VEDOVATO, E.; BALSAMO, C.; MACHERELLI, A.; DEI, L.; MASTROMEI, G.; PERITO, B. Bacterial community analysis on the Mediaeval stained glass window "Natività" in the Florence Cathedral, **Journal of Cultural Heritage**. v. 10, n. 1, p. 124-133, 2009.

McNAMARA, N.P.; BLACK, H.I.J.; BERESFORD, N.A.; PAREKH, N.R. Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. **Applied Soil Ecology**, v. 24, p. 117-132, 2003.

MELO, D.; SEQUEIRA, S.O.; LOPES, J.A.; MACEDO, M.F. Stains *versus* colourants produced by fungi colonising paper cultural heritage: A review. **Journal of Cultural Heritage**, v.35, p.161-182, 2019.

MICHAELSEN, A.; PIÑAR, G.; PINZARI, F. Molecular Studies of Microbial Community Structure on Stained Pages of Leonardo da Vinci's Atlantic Molecular and Microscopical Investigation of the Microflora Inhabiting a Deteriorated Italian Manuscript Dated from the Thirteenth Century, **Microbial Ecology**. v. 60, n.1, p. 69-80, 2010.

MOISE, I. V.; VIRGOLICI, M.; NEGUT, C. D.; MANEA, M.; ALEXANDRU, M.; TRANDAFIR, L.; ZORILA, F.L.; TALASMAN, C. M.; MANEA, D.; NISIPEANU, S.; HAIDUCU, M.; BALAN, Z. Establishing the radiation dose for paper descontaminantion. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 1045-1050, 2012.

MUSÍLEK, L.; ČECHÁK, T.; TROJEK, T. X-ray fluorescence in investigations of cultural relics and archaeological finds. **Applied Radiation and Isotopes**, v.70, n. 7, p. 1193-1202, 2012.

NEEVEL, J.G., REISSLAND, B. **Papier Restauring** v.6, n.28, 2005.

NEGUT, C; BERCU, V. DULIU, O. Defects induced by gamma radiation in historical pigments. **Journal of Cultural Heritage**, v. 13, p. 397-403, 2012.

NEVES, M.C.M.S.; DE MENEZES, L.C. **Compilações de diversas cartas do século XVIII relativas à Capitania do Espírito Santo**. 2017. Disponível em: <<https://www.google.com/search?q=cartas+compiladas+estacao+capixaba&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b>>. Acesso em: 22 jan 2020

NIELSEN, A.V.F.; TETENS, I.; MEYER, A.S. Potential of phytase - mediated iron release from cereal - based foods: a quantitative view. **Nutrients**. v.5, p.3074 -3098, 2013.

NUNES, I.; MESQUITA N., VERDE S. C.; TRIGO, M. J.; FERREIRA, A.; CAROLINO, M. M.; PORTUGAL, A.; BOTELHO, M. L. Gamma radiation effects on physical properties of parchment documents. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p.1943-1946, 2012.

NUNES, I.; MESQUITA, N.; VERDE, S. C., CAROLINO, M. M.; PORTUGAL, A. Bioburden assessment and gamma radiation inactivation patterns in parchment documents. **Radiation Physics and Chemistry** , v. 88, p. 82-89, 2013.

ORTIZ, R.; PÁRRAGA, M.; NAVARRETE, J.; CARRASCO, I.; DE LA VEGA, E.; ORTIZ, M.; HERRERA, P.; JURGENS, J. A.; HELD, B. W.; BLANCHETTE, R. A. Investigations of Biodeterioration by Fungi in Historic Wooden Churches of Chiloé, Chile. **Microbial Ecology**. v. 67, p. 568–575, 2014.

PIÑAR, G.; STERFLINGER, K.; ETTENAUER, J.; QUANDT, A.; PINZARI, F. A Combined Approach to Assess the Microbial Contamination of the Archimedes Palimpsest. **Microbial Ecology** v. 69, p. 118-134, 2015.

PONTA, C. C. Irradiation Conservation of Cultural Heritage. **Nuclear Physics News**, v.18, n. 1, p.22-24, 2008.

PORCA, E.; JURADO, V.; MARTIN-SANCHEZ, P. M.; HERMOSÍN, B.; BASTIAN, F.; ALABOUVETTE, C.; SÁIZ-JIMÉNEZ, C. Aerobiology: an ecological indicator for early detection and control of fungal outbreaks in caves. **Ecological Indicators**. v. 11, n.6, p. 1594-1598, 2011.

PORTAL PORTINARI - **Candido Portinari - Apresentação**. Disponível em <www.portinari.org.br>. Acesso em: 8 fev. 2019.

PORTAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. **Taninos**. Apostila de aula prática UEL. Disponível em: <<http://www.sbfgnosia.org/Ensino/taninos.html>>. Acesso em: 30 jan. 2020.

PRINCIPI, P.; VILLA, F.; SORLINI, C.; CAPPITELLI, F. Community Structure on Stained Pages of Leonardo da Vinci's Atlantic Codex. **Microbial Ecology**. v. 61, p. 214–222, 2011.

PRONIEWICZ, L.M.; PALUSZKIEWICZ, C.; WESELUCHA-BIRCZYŃSKA, A.; BARAŃSKI, A.; DUTKA, D. FT-IR and Raman study of hydrothermally degraded groundwood containing paper. **Journal of Molecular Structure**, v. 614, p. 345-353, 2002.

QUIRRENBACH, H.R.; KANUMFRE, F.; ROSSO, N.D.; CARVALHO FILHO, M. A. Behaviour of phytic acid in the presence of iron(II) and iron(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 24-32, 2009 ISSN 0101-2061

REHÁKOVÁ, M.; GÁL, L.; BELOVICOVÁ, M.; ORAVEC, M.; DRONKA, V.; STOJKOVICOVÁ, D.; CEPPAN, M. Identification of iron-gall inks in historical drawings by Fibre Optics Reflection Spectroscopy – Extension to the NIR spectral range. **Journal of Cultural Heritage**, v. 27, p. 137-142, 2017

RELA, P. R.; GOMES, F. F.; THOMÉ, L. E.; KODAMA, Y. Recuperação de um acervo: uso da Radiação Gama (Cobalto 60) na descontaminação de objetos do acervo do Instituto de Estudos Brasileiros - USP. **Revista do Instituto de Estudos Brasileiros**, n.45, p.285-272, 2007.

RIZZO, M. M.; MACHADO, L. D. B.; BORRELY, S. I.; SAMPA, M. H. O.; RELA, P. R.; FARAH, J. P. S.; SCHUMACHER, R. I. Effects of gamma rays on a restored painting from the XVIIth century. **Radiation Physics and Chemistry**, n. 63, p. 259-262, 2002. *apud* BELYAKOVA, L.A. Gamma-radiation as a disinfecting agent for books infected with mould spores. **Microbiology**, v. 29, p. 548-550, 1961.

ROUCHON, V.; BERNARD S. Mapping iron gall ink penetration within paper fibres using scanning transmission X-ray microscopy. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 30. p. 635-641. 2015.

RUBIO-BARBERÁ, S.; FRAGOSO, J.; GALLELLO, G.; ARASA, F.; LEZZERINI, M.; HERNÁNDEZ, E.; PASTOR, A.; DE LA GUARDIA, M. Analysis of Sagunto Ibero-Roman votive bronze statuettes by portable X-ray fluorescence. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 159. p. 17-24. 2019.

RUGA, L.; ORLANDI, F.; ROMANO, B.; FORNACIARI, M. The assessment of fungal bioaerosols in the crypt of St. Peter in Perugia (Italy). **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 98, p. 121-130, 2015.

SAARELA, M.; ALAKOMI, H. L.; SUIHKO, M. L.; MAUNUKSELA, L.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T. Heterotrophic microorganisms in air and biofilm samples from Roman catacombs, with special emphasis on actinobacteria and fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 54, n. 1, p. 27-37, 2004.

SALEH, Y. G.; MAYO, M. S.; AHEARN, D. G. Resistance of Some Common Fungi to Gamma Irradiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 2134-2135, 1988.

SANCHES, F. A. C. R. A.; RAYSA, C. N.; FILHO, DOS SANTOS, R. S.; DE ARAÚJO, O. M. O.; MACHADO, A. S.; CALGAM, T.; BUENO, R.; CANELLAS, C.; GONÇALVES, E. A. S.; ASSIS, J. T.; FREITAS, R. P.; DE OLIVEIRA, D. F.; LOPES, R. T.; DOS ANJOS, M. J. Characterization of a sacred statuette replica of “Nossa Senhora da Conceição Aparecida” using X-ray spectrometry techniques. **Radiation Physics and Chemistry**. v. 167. 2020.

SANMARTÍN, P.; DE ARAUJO, A.; VASANTHAKUMAR, A. Melding the Old with the New: Trends in Methods Used to Identify, Monitor, and Control Microorganisms on Cultural Heritage Materials. **Microbial Ecology**. v. 76, p. 64–80, 2018.

SANTINI, L. J.; RODRIGUEZ, D. R. O.; QUINTILHAN, M.T.; BRAZOLIN, S.; FILHO, M. T. Evidence to Wood biodeterioration of tropical species revealed by non-destructive techniques. **Science of the total environment**, v.672, p. 357-369, 2019.

SANTOS, A.; CERRADA, A.; GARCIA, S.; ANDRÉS, M. S.; ABRUSCI, C.; MARQUINA, D. Application of Molecular Techniques to the Elucidation of the Microbial Community Structure of Antique Paintings. **Microbial Ecology**. v. 58, n. 4, p. 692-702, 2009.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, 1004-1010, 2012.

SCLOCCHI, M. C.; KRAKOVÁ, L.; PINZARI, F.; COLAIZZI, P.; BICCHIERI, M.; ŠAKOVÁ, N.; PANGALLO, D. Microbial Life and Death in a Foxing Stain: a Suggested Mechanism of Photographic Prints Defacement. **Microbial Ecology**. v. 73, p. 815-826, 2017.

SHAHANI, C. J. , In: J. Kolar, M. Strlic, J.B.G.A. Havermans (Eds.), Proceedings of the International Conference “Durability of paper and writing”, p. 16-19, 2004, Ljubljana, Slovenia (EC 5th. **Framework Programme Projects MIP**, Papyrus and InkCor), ISBN 961-6162-98-5

SHATHELE, M. S. Effects of gamma irradiation on fungal growth and associated pathogens. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 3, n. 2, p. 94-100, 2009.

SILBERMAN, A. **Enzimas e sua importância para a indústria de alimentos**. Institute of Life Sciences. Disponível em: <https://www.researchgate.net/figure/Figura-11-Esquema-representando-fibrilas-microfibrilas-e-celulose-na-parede-celular-Scientific-Figure-on-ResearchGate-de_fig10_316884106> Acesso em: 9 de abr. 2020.

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

SOUZA, Alexandre Vilela Oliveira de. **Desenvolvimento de uma fita identificadora de Fe²⁺ em documentos escritos com tinta ferrogálica**. 69p. Dissertação (Mestrado). PUC-RIO – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 2009. Disponível em: <<https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/colecao.php?>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

STERFLINGER, K. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. **Fungal Biology Reviews**. v. 24, p. 47-55, 2010.

STERFLINGER, K.; PIÑAR, G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art – tilting at windmills? **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97, p. 9637-9646, 2013.

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, 2011.

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

SUIHKO, M. L.; ALAKOMI, H. L.; GORBUSHINA, A.; FORTUNE, I.; MARQUARDT, J.; SAARELA, M. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. **Systematic and Applied Microbiology**. V. 30, n. 6, p. 494-508, 2007.

SZCZEPANOWSKA, H.; CAVALIERE, A.R. Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: a case study of the Tilghman Family Collection. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v.46, p. 245-249. 2000.

TEIXEIRA, M. B. D.; OLIVEIRA, R. A.; GATTI, T. H.; SUAREZ, P. A. Z. O papel: uma breve revisão histórica, descrição da tecnologia industrial de produção e experimentos para obtenção de folhas artesanais. **Revista Virtual de Química**. v. 9(3). p. 1364-1380. 2017.

THERMOFISHER SCIENTIFIC - **The Power Behind the Analyzer**: X-ray Tubes Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/blog/metals/the-power-behind-the-analyzer-x-ray-tubes/>>. Acesso em: 10 de jun. 2022.

TIANO, P. **Biodegradation of Cultural Heritage: Decay, Mechanisms and Control Methods**. Seminar. Article, New University of Lisbon, Department of Conservation and Restoration, January 2002.

TOMAZELLO, Maria Guiomar Carneiro. **A aplicabilidade da radiação gama no controle de fungos que afetam papéis**. 1994. 185 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1994. Disponível em: <http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Maria%20Guiomar%20Carneiro%20Tomazello_D.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2019

TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R.; Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi, In: ____ **Advances in Microbial physiology**, Poole, R. K. (Ed.) pp 1-81, London: Academic Press, 1995, p. 1 – 81. ISBN 0-12-027737-9.

TROJEK, T.; MUSÍLEK, L.; ČECHÁK, T. X-Ray fluorescence analysis of cultural artefacts. Applications to Czech heritage. **Radiation Physics and Chemistry**, v.95, p. 381-384, 2014.

TROYACK, Isabela Birnfeld. **Avaliação dos teores de prata em amostras de solo utilizando a técnica de fluorescência de raios X (pXRF)**: estudo de caso em Resende – RJ. 178p. Dissertação (Mestrado). Centro de Engenharia e Ciências. Faculdade de Engenharia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2020.

TUGAY, T.; ZHDANOVA, N.N.; ZHELTONOZHISKY, V.; SADOVNIKOV, L.; DIGHTON, J. The influence of ionizing radiation on spore germination and emergent hyphal growth response reactions of microfungi. **Mycologia**, v.98, n.4, p.521-527, 2006.

URŠIČ, M.; BUDNAR, M.; SIMČIČ, J.; PELICON, P. The influence of matrix composition and ink layer thickness on iron gall ink determination by the PIXE method, **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 247, p. 342-348, 2006.

VADRUCI, M.; BORGOGNONI, C.; CICERO, N.; PERINI, N.; MIGLIORE, L.; MERCURI, F.; ORAZI, N. Parchment processing and analysis: Ionizing radiation treatment by the REX source and multiciplinary approach characterization. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 149, p. 159-164, 2019.

VALENTÍN, N. Biodeterioro. p. 190-195. In: **La Ciencia y el Arte**. Instituto Del Patrimonio Historico Español. Ministerio de Cultura, 2012.

WANG, W.; MA, Y.; MA, X.; WU, F.; MA, X.; AN, L.; FENG, H. 'Diversity and seasonal dynamics of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China', **Aerobiologia**. v.28, n.1, p. 27-38, 2012.

WEST, M.; ELLIS, A. T.; POTTS, P. J.; STRELI, C.; VANHOOF, C.; WOBRAUSCHEK, P. 2016 Atomic Spectrometry Update – a review of advances in X-ray fluorescence spectrometry and its applications. **J. Anal. At. Spectrom.** v. 31. P. 1706-1755. 2016

ZAMORANO, G. M. C. The presence of iron in inks used in Valencian manuscripts from the 13th to 17th century. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 484-492, 2018.

ZHANG, G.; GONG, C.; GU, J.; KATAYAMA, Y.; SOMEYA, T.; GU, J-D. Biochemical reactions and mechanisms involved in the biodeterioration of Stone world cultural heritage under the tropical climate conditions. International **Biodeterioration & Biodegradation**, v. 143, p. 1-7, 2019.

ZHDANOVA, N.N.; LASHKO, T.N.; VASILIVESKAVA, A.I.; BOSISYUK, L.G.; SINVAVSKAYA, O.I.; GAVRILYUK, V.I.; MUZALEV, P.N. Interactions os soil micromicetes with 'hot'particles in the model system. **Microbiology Z**, v.53; p. 9-17; 1991.

ZHDANOVA, N.N.; TUGAY, T.; DIGHTON, J.; ZHEITONozHsky, V.; McDERMOTT, P. Ionizing radiation attracts soil fungi. **Mycological Research**, v.8, n.9, p. 1089-1096, 2004.

APÊNDICE – Produções científicas

Capítulo de livro

Agentes microbiológicos e patrimônio cultural:
Monitoramento, diagnóstico e tratamento

Antonio Carlos Augusto da Costa , Márcia Teresa Soares Lutterbach e Renata Nascimento Cardoso

Capítulo de livro, In: Preservação de Acervos Científicos e Culturais, Museu de Astronomia e Ciências Afins, 29 pp., 2022 (no prelo).

Artigo publicado



CONSERVAR
PATRIMÔNIO

ARTIGO / ARTICLE

Diversidade microbiana no ambiente e em partes do trono imperial de D. Pedro II - Caracterização por microbiologia clássica e biologia molecular antes e após intervenções de conservação e restauro

Microbial diversity in the surroundings and selected parts of the imperial throne of D. Pedro II - Characterization by classical microbiology and molecular biology, before and after restoration interventions

Antonio Carlos Augusto da Costa^{1*}, Eliane Marchesini Zanatta², Fernanda do Nascimento Corrêa³, Renata Nascimento Cardoso¹, Ana Lucia Chaves de Oliveira⁴, Márcia Teresa Soares Lutterbach⁴

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro, PPG-EQ, R. S. Fco. Xavier 524, Maracanã, 20550-900, Rio de Janeiro, Brasil

² Museu Imperial, Rua da Imperatriz 220, Petrópolis, 25610-320, Rio de Janeiro, Brasil

³ Museu de Astronomia e Ciências Afins, R. General Bruce 586, São Cristóvão, 20921-030, Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Instituto Nacional de Tecnologia, LABIO, Avenida Venezuela 82, Saúde, 20081-312, Rio de Janeiro, Brasil

*Autor correspondente: acosta@uerj.br