

CAPITULO 4 - Resultados e Discussão

4.1 Diagnóstico da patologia do substrato

A principal patologia da pedra calcária da Igreja pode ser descrita como uma coloração rosa presente em várias das suas paredes interiores. Esta coloração tem vindo a aumentar progressivamente com o tempo, o que nos fez colocar a hipótese de a sua origem ser biológica.

Embora a coloração seja sempre rosa, a sua intensidade não é constante, sendo mais clara em certas zonas e mais escura noutras (Fig. 5). Por vezes, numa mesma área da Igreja, surgem-nos ambas as situações.



Fig.5: As fotos ilustram diferentes intensidades da coloração rosa presente nas paredes da Igreja.

Acresce que a coloração não se desenvolve de modo uniforme. Na maior parte dos casos parece ter um movimento ascendente, ou seja, desenvolve-se de baixo para cima. Contudo, em certas situações este tipo de crescimento é descontínuo, apresentando zonas de interrupção ao longo de uma mesma parede, como se apresenta na Figura 6.



Fig.6: Crescimento descontínuo da coloração rosa nas paredes da Igreja; movimento ascendente da coloração rosa nas paredes da Igreja.

Uma situação distinta consiste no crescimento localizado da coloração rosa, como acontece em algumas zonas da cornija e dos frisos da parede Oeste e ainda junto à janela na zona da capela-mor e por baixo dos púlpitos da parede Este.

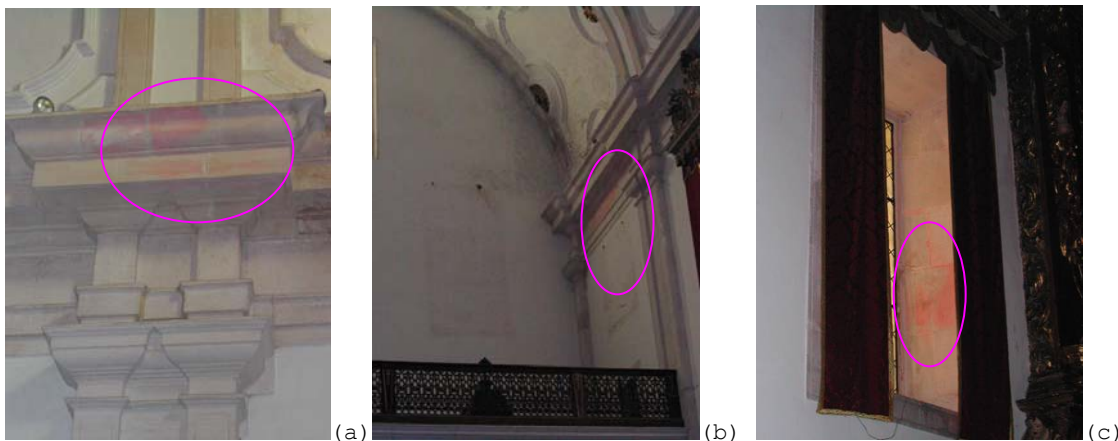


Fig.7: Crescimento localizado da coloração rosa em algumas zonas da cornija e dos frisos da parede Oeste e junto à janelas na zona da capela-mor na Igreja.

O diagnóstico da patologia do substrato permitiu-nos efectuar uma avaliação correcta da contribuição biológica para a deterioração da pedra da Igreja. De acordo com Warscheid (2000), essa avaliação pressupõe o conhecimento da história do edifício e dos tratamentos a que ele foi sujeito, bem como uma descrição do tipo de pedra usado. Relativamente à história do edifício, descrita de forma sumária em 1.4, não se encontraram aspectos significativos que possam ter contribuído para a biodeterioração.

4.2. Parâmetros ambientais da Igreja

Apresentam-se nas figuras 8 e 9 as variações mensais da H.R.e da T. do ar na Igreja, no período de 1 de Janeiro a 30 de Novembro de 2003.

Figura 8: Variação mensal (valor médio \pm desvio padrão) da H.R. na Igreja de S.J.A. entre 1 Janeiro e 30 de Novembro de 2003.

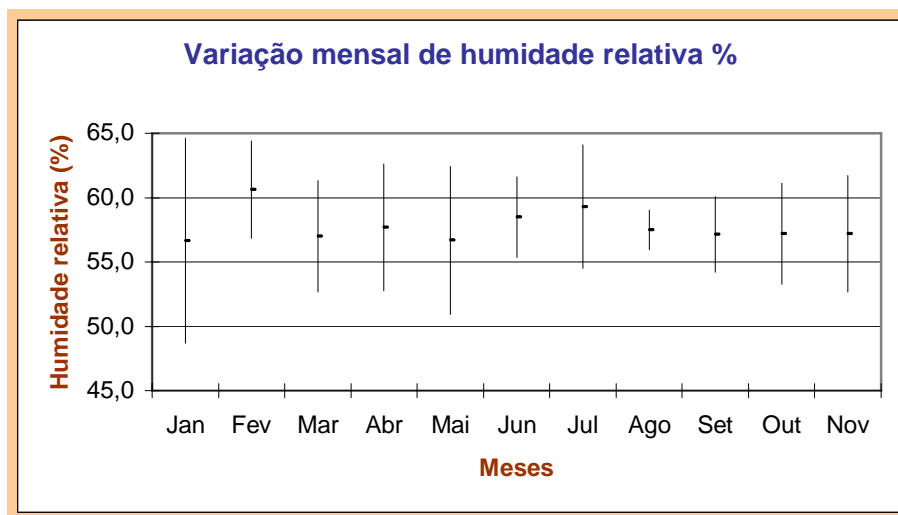
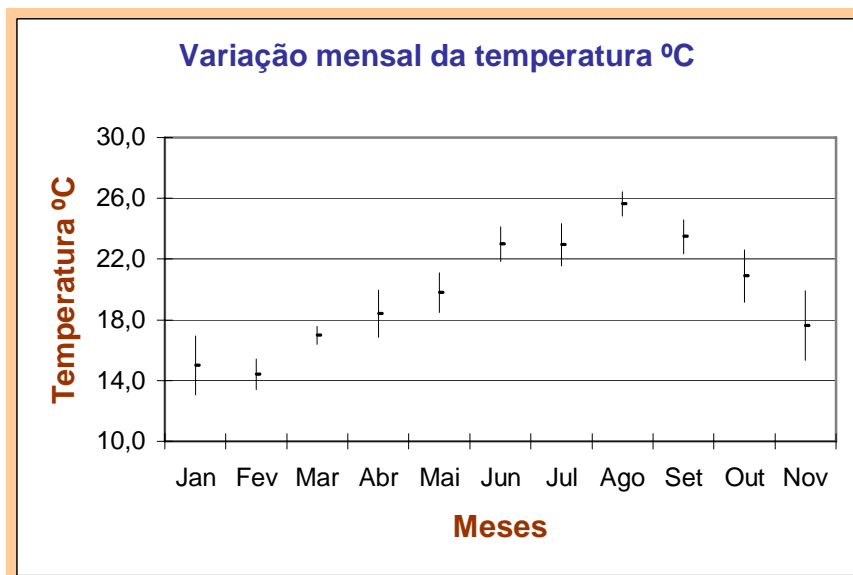


Figura 9: Variação mensal (valor médio \pm desvio padrão) da T. do ar na Igreja de S.J.A. entre 1 Janeiro e 30 de Novembro de 2003.



Verifica-se que, em média, os valores de HR variam num intervalo estreito entre os 56.6% e 60.6%, com pequenas oscilações ao longo do ano. O desvio padrão oscila entre 1.5 e 7.9, mas não parece fácil encontrar uma tendência ou

orientação ao longo dos meses (ver anexo, tabela 5). Assim sendo, pode talvez admitir-se que tal variação nos resultados derive de erros aleatórios.

Relativamente à temperatura verifica-se que, em média, há uma progressão ascendente até ao mês de Agosto, a partir do qual a progressão é descendente. O desvio padrão oscilou entre 0.5 e 2.2, denotando maior robustez nas determinações efectuadas ao longo do ano comparativamente com os dados coligidos de humidade relativa (ver anexo, tabela 6)

O conhecimento dos parâmetros ambientais procurava aferir a bio-susceptibilidade do local em apreço, dado que a T. e a H.R. são factores determinantes para a evolução da biodeterioração. Podemos considerar que os valores determinados não são, em média, demasiadamente elevados para propiciar o crescimento biológico. De qualquer modo, e dado que, por exemplo, a T. atinge, nos meses de Verão, os 25° C, seria aconselhável que no futuro esses valores fossem ligeiramente inferiores. Segundo Warscheid (s/d) a temperatura óptima para a maior parte dos microrganismos envolvidos na biodeterioração situa-se entre os 16° e os 35°C, pelo que, valores inferiores a 16°C seriam os recomendados. Relativamente à H.R. o mesmo autor aconselha valores inferiores a 55%.

4.3 Áreas de amostragem

O levantamento cuidadoso das áreas com coloração rosa em toda a Igreja permitiu-nos efectuar uma avaliação preliminar da situação, com vista a uma selecção correcta das áreas de amostragem (0, A, B) para a análise microbiológica posterior.

As observações macroscópicas realizadas nas áreas de amostragem (0, A e B) permitiram-nos caracterizar a patologia do substrato do seguinte modo:

- A área 0 parece manter a cor original da pedra.
- Na área A a coloração rosa assemelha-se a uma película

muito fina, relativamente uniforme, que cobre vastas áreas da superfície pétreo. Esta película é facilmente removida com um cotonete, deixando a superfície com a coloração original e, macroscopicamente, não deteriorada.



Fig.10: Aspecto da coloração rosa na área de amostragem A na Igreja.

- Na área B a coloração rosa não se apresenta como uma película uniforme, mostrando intensidades de cor diferentes. Assemelha-se a uma massa pulverulenta que, em algumas zonas, tem uma certa adesão ao substrato, não sendo tão facilmente removível com o cotonete como a película da zona A.



Fig.11: Aspecto da coloração rosa na área de amostragem B na Igreja.

Apresenta-se nas figuras 12 e 13 a localização da coloração rosa nas áreas de amostragem A e B.

As informações recolhidas e a observação macroscópica permitiram-nos apresentar os seguintes resultados relativos às áreas de amostragem:

- A coloração rosa deverá ter uma origem biológica, dado o seu crescimento com o tempo;
- A intensidade da coloração não é constante;
- A coloração não é uniforme no modo de crescimento
- Macroscopicamente, a pedra parece não estar intensamente deteriorada pelo crescimento da coloração, embora na zona B se encontre com alguma pulverulência.

4.4. Parâmetros colorimétricos das áreas de amostragem 0, A e B

Na tabela 4 apresentam-se os valores da média, do desvio padrão e dos valores máximo e mínimo dos parâmetros colorimétricos L^* , a^* e b^* para as áreas de amostragem (0, A, B) (ver anexo, tabela 7).

Tabela 4: Média, desvio padrão, mínimo e máximo dos parâmetros L^* a^* e b^* das áreas de amostragem 0, A e B.

	Área 0			Área A			Área B		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
Média	86,18	1,75	10,70	72,15	10,63	13,80	69,2	9,24	13,34
D. Padrão	1,95	0,58	2,52	3,91	2,4	2,1	2,49	2,04	1,42
Mínimo	84,09	1,08	7,52	63,62	6,41	10,56	63,94	6,76	11,53
Máximo	88,63	2,77	14,8	76,52	13,4	17,46	71,39	13,02	15,95

Com base nos valores apresentados na tabela 5 podem apresentar-se os seguintes resultados:

- Relativamente ao parâmetro L^* , a área A e a área B não são significativamente diferentes entre si, mas são significativamente diferentes da área 0. O valor obtido para a área 0 mostra que esta é mais clara que as às áreas A e B.
- Relativamente ao parâmetro a^* , a área A e a área B não são significativamente diferentes entre si, mas são

significativamente diferentes da área 0.

- Relativamente ao parâmetro b^* , apesar de os valores obtidos para as três áreas serem muito semelhantes, pode observar-se que entre as áreas A e B a diferença é quase nula.

Apresentam-se na tabela 6 os valores de ΔL^* , Δa^* , Δb^* e de ΔE^* calculados para as três áreas de amostragem a partir dos resultados apresentados na tabela 4.

Tabela 5 valores de ΔL^* , Δa^* , Δb^* e ΔE^* calculados para as três áreas de amostragem a partir dos resultados apresentados na tabela 4

	<i>A-0</i>	<i>A-B</i>	<i>B-0</i>
ΔL^*	-14,03	2,95	-16,98
Δa^*	8,88	1,39	7,49
Δb^*	3,1	0,46	2,64
ΔE^*	16,89	3,29	18,74

Estes resultados estão de acordo com as observações macroscópicas realizadas nas diferentes áreas de amostragem (4.3) dado que:

- Os valores negativos de ΔL^* obtidos para as áreas A e B quando comparadas com a área 0 estão de acordo com o maior escurecimento das áreas com coloração rosa relativamente à área com a cor original da pedra;
- Os valores positivos de Δa^* para as áreas A e B são da mesma ordem de grandeza, o que está conforme com o maior enriquecimento destas áreas em vermelho. A variação do parâmetro a^* entre as áreas com coloração rosa não é significativamente diferente;
- Os valores positivos de Δb^* obtidos para todas as áreas estão de acordo com a cor original da pedra ligeiramente amarelada;
- O valor de ΔE^* (diferença total de cor) entre a área A e B é muito pequeno (3.29) quando comparado com a diferença de cor total entre a área A e 0 (16.89) e a área B e 0

(18.74). Estes resultados indicam que as áreas A e B não são significativamente diferentes na cor, mas ambas são diferentes da área 0;

- A diferença total de cor entre as paredes com coloração rosa (A e B) e as paredes sem coloração rosa (0) é bastante superior a três, limite a partir do qual o olho humano detecta variações (Boutin et al., 2000), como seria de esperar dado o discernimento visual prévio.

4.5. Amostragem biológica

4.5.1. Amostragem preliminar

Após dois meses de incubação em laboratório verificou-se que apenas ocorreu o crescimento de organismos heterotróficos. Conclui-se assim que a coloração rosa deveria ser devida à presença deste tipo de microrganismos. Por conseguinte, os meios de cultura a utilizar na amostragem deveriam ser os adequados para microrganismos heterotróficos.

4.5.2. Amostragem

As tabelas 6, 7 e 8 apresentam os resultados da amostragem biológica nas zonas de amostragem 0, A e B. Indicam-se as placas petri que não apresentaram crescimento significativo, aquelas em que não foi possível identificar os microrganismos presentes e aquelas em que essa identificação foi feita, apresentando-se o nome do microrganismo identificado.

Substrato	Ref.	M.cultura	Recolha	Isola. Suc.	M.cultura	Aspecto	Espécie
Pedra calcária	CAT 0 (1)	PDA	18-03-2003	27/03/2003	PDA	Massa uniforme de cor branca arrosada e aspecto leitoso	Levedura
Pedra calcária	CAT 0 (2)	PDA	18-03-2003			Sem crescimento significativo	
Pedra calcária	CAT 0 (3)	PDA	18-03-2003	27-03-2003 16-04-2003	PDA PDA	Cultura branca pulverulenta	Não identificada
Pedra calcária	CAT 0 1	NUT	18-03-2003	16-05-2003	NUT	Sem crescimento significativo;	
Pedra calcária	CAT 0 2	NUT	18-03-2003			Pequenos pontos amarelos	Bactérias
Pedra calcária	CAT 0 3	NUT	18-03-2003	27-03-2003 11-04-2003	NUT NUT	Sem crescimento significativo. Massa branca arrosada (semelhante a levedura) mas junto aos bordos (possível contaminação)	Não identificada

Tabela 6 Resultados da amostragem na zona 0: meios de cultura, datas de isolamentos, aspecto das culturas, identificação do microrganismo.

Substrato	Ref.	M.cultura	Recolha	Isola.Suc.	M. cultura	Aspecto	Espécie			
Pedra calcária	CAT A (1)	PDA	18-03-2003	27-03-2003		Massa branca amarelada de aspecto leitoso	Bactérias em forma de bastonete			
				11-04-2003						
				14-04-2003						
							16-04-2003		Massa pulverulenta branca, ligeiramente arrosada nos bordos e com uma pequena zona amarela ao centro	Fusarium
					PDA	24-04-2003	PDA			
					PDA	02-05-2003	PDA			
Pedra calcária	CAT A (2)	PDA	18-03-2003	27-03-2003	NUT	Massa branca amarelada de aspecto leitoso	Bactérias em forma de bastonete			
				10-04-2003	PDA					
				16-04-2003	PDA					
Pedra calcária	CAT A (3)	PDA	18-03-2003	14-04-2003	BG 11	Pontos brancos Cultura verde azulada. Agar colorido de rosa. Cultura castanha acinzentada.	Prototheca			
				14-04-2003	PDA		Penicillium (verde)			
				16-04-2003	PDA					
				16-04-2003	NUT					
					NUT					
Pedra calcária	CAT A (1)	NUT	18-03-2003	27-03-2003	NUT	Cultura verde azeitona	Cladosporium			
				16-04-2003	NUT					
Pedra calcária	CAT A (2)	NUT	18-03-2003	27-0-2003	NUT	Cultura pulverulenta preta-acastanhada	Penicilium (castanho)			
				16-04-2003						
Pedra calcária	CAT A (3)	NUT	18-03-2003	27-03-2003	NUT	Pontos brancos Massa pulverulenta branca acastanhada	Não identificada			
				16-05-2003	NUT					

Tabela 7: Resultados da amostragem na zona A: meios de cultura, datas de isolamentos, aspecto das culturas, identificação do microrganismo.

Substrato	Ref.	M. cultura	Recolha	Isola. Suc.	M. cultura	Aspecto	Espécie
Pedra calcária	CAT B (1)	PDA	18-03-2003	10-04-2003 16-05-2003 16-05-2003	PDA PDA PDA	Cultura rosa salmão, alaranjada Massa leitosa esbranquiçada (1) Pontos brancos (2) Cultura amarela-esverdeada	<i>Leothalium</i> <i>Não identificada</i> <i>Aspergillus</i>
Pedra calcária	CAT B (2)	PDA	18-03-2003	27-03-2003 09-05-2003	PDA PDA	Cultura castanha acinzentada Massa verde-azulada	<i>Chrysosporium</i> <i>Penicillium (verde)</i>
Pedra calcária	CAT B (3)	PDA	18-03-2003	10-04-2003 16-04-2003	PDA PDA	Massa uniforme de cor branca arrosada e aspecto leitoso Massa acastanhada	<i>Leveduras</i>
Pedra calcária	CAT B (1)	NUT	18-03-2003			Sem crescimento significativo	
Pedra calcária	CAT B (2)	NUT	18-03-2003	16-05-2003	NUT	Massa esbranquiçada uniforme	<i>Prototheca</i> <i>Leveduras</i>
Pedra calcária	CAT B (3)	NUT	18-03-2003	16-05-2003	NUT	Massa amarelada (1) Massa leitos arrosada (2) Massa leitosa esbranquiçada (3) Pequenos pontos brancos (4)	<i>Não identificada</i>

Tabela 8: Resultados da amostragem na zona 0: meios de cultura, datas de isolamentos, aspecto das culturas, identificação do microrganismo.

4.5.3 Observação microscópica

Apresenta-se na tabela 9 a correlação entre os diferentes microrganismos identificados e as áreas de amostragem onde surgem.

Tabela 9 Relação entre os principais microrganismos identificados e as áreas de amostragem 0, A e B.

Área	Microrganismos
0	Leveduras Bactérias amarelas
A	Bactérias em forma de bastonete <i>Fusarium</i> Prototheca <i>Penicillium</i> (de cor verde) <i>Penicillium</i> (de cor castanha) <i>Cladosporium</i>
B	<i>Leothalium</i> <i>Chrysosporium</i> Leveduras Prototheca <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> (de cor verde)

Com base nos resultados apresentados na tabela observa-se que:

- As áreas de amostragem com coloração rosa, as áreas A e B, apresentam uma maior biodiversidade que a área 0;
- As leveduras surgem simultaneamente nas áreas 0 e B;
- Apenas a Prototheca e o *Penicillium* (de cor verde) surgem simultaneamente nas áreas de coloração rosa, A e B. Coloca-se por isso a hipótese de serem estes microrganismos, ou produtos do seu metabolismo, os responsáveis pela coloração rosa;
- Os restantes microrganismos identificados - *Fusarium*,

Cladosporium, *Penicillium* (de cor castanha), *Leothalium*, *Chrysosporium*, *Aspergillus* e bactérias em forma de bastonete - nunca surgem simultaneamente nas áreas com coloração rosa.

Descrevem-se seguidamente todos os microrganismos identificados nas áreas de amostragem 0, A e B.

Bactérias em forma de bastonete

Macroscopicamente, as culturas são brancas, ligeiramente amareladas, e têm um aspecto leitoso. Não há alteração da cor do meio de cultura.

Ao microscópio óptico, com ampliações de 500x, observaram-se as bactérias em forma de bastonete, formando cadeias.



Fig.14: Cultura à superfície do agar (a); colónias de bactérias em forma de bastonete (b e c).

Bactérias que formam colónias amarelas

Macroscopicamente, as culturas são superficiais, de cor amarelo-torrado. Não há alteração da cor do meio de cultura.

Não foi possível a identificação ao microscópio óptico.



Fig.15: Cultura à superfície do agar.

Aspergillus

Macroscopicamente a cultura é amarela-esverdeada à superfície do agar e tem um crescimento radial. No interior do agar é esbranquiçada. Não há alteração da cor do meio de cultura.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, observou-se que os conídios são unicelulares e possuem uma forma globular. Os conidióforos são altos e terminam numa espécie de vesícula da qual saem as fiálides, em forma de garrafa. Na extremidade das fiálides observam-se longas cadeias de conídios.

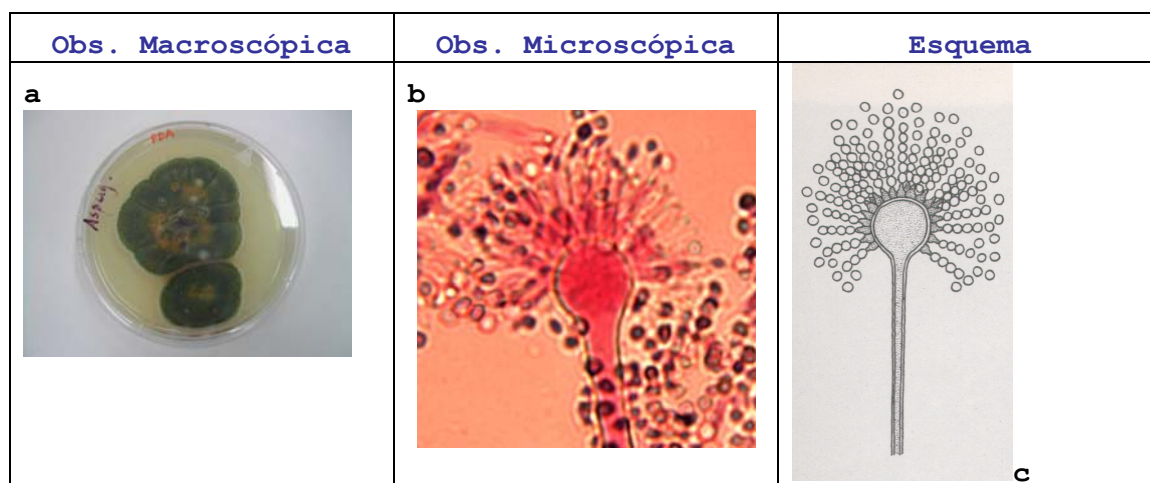


Fig.16: Cultura à superfície do agar (a); conidiogênese e conidióforo do *Aspergillus* (b, c).

Chrysosporium

Macroscopicamente a cultura apresenta uma cor castanha-acinzentada à superfície do agar, sendo castanha escura no seu interior. Tem crescimento radial. Não há alteração da cor do meio de cultura.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, observou-se que as hifas são septadas e têm gotículas no interior. Os conídios têm uma parede dupla e são produzidos ao longo das hifas como se fossem uma expansão da sua parede, sendo

posteriormente isolados por uma "cross-wall". A conidiogénese não é sempre apical, ou seja, os conídios formam-se na extremidade da hifa e em várias zonas ao longo do seu comprimento total.



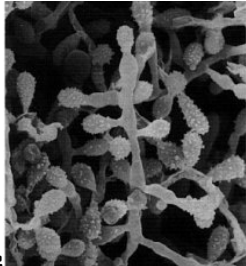
Obs. Macroscópica	Obs. Microscópica	Esquema
<p>a</p> 	<p>b</p> 	<p>c</p> 

Fig.17: Cultura à superfície do agar (a); conidiogénese não apical do *Chrysosporium* (b).

Cladosporium

Macroscopicamente a cultura apresenta à superfície do agar uma cor que varia do verde musgo ao verde azeitona, sendo preta no seu interior. Não há alteração da cor do meio de cultura. A cultura cresce radialmente.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, observou-se que as hifas são septadas e que é possível observar a marca de saída dos conídios, muito característica deste género - espécie de cicatriz que se identifica por ser uma zona mais escura e saliente que cada conidióforo apresenta. Os conídios apresentam tamanho e forma irregulares (limão, azeitona ou cilíndrica). Alguns são septados numa única direcção, enquanto outros não são septados. Os conídios são produzidos em cadeias ramificadas longas, estando o conídio mais jovem na parte inferior da cadeia, junto à hifa. Apresentam uma das extremidades apertadas, designada por "swollen apex".

Obs. Macroscópica	Obs. Microscópica	Esquema
-------------------	-------------------	---------



Fig.18: Cultura à superfície do agar (a); conidiogênese do *Cladosporium* (b e c).

Fusarium

À superfície do agar a cultura apresenta-se como uma massa pulverulenta branca-arrosada, com uma pequena zona amarelada ao centro. No interior tem cor avermelhada. O meio de cultura ficou com uma cor vermelho forte.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, observou-se que os conídios são fusiformes. Enquanto alguns não são septados, outros apresentam vários septos.

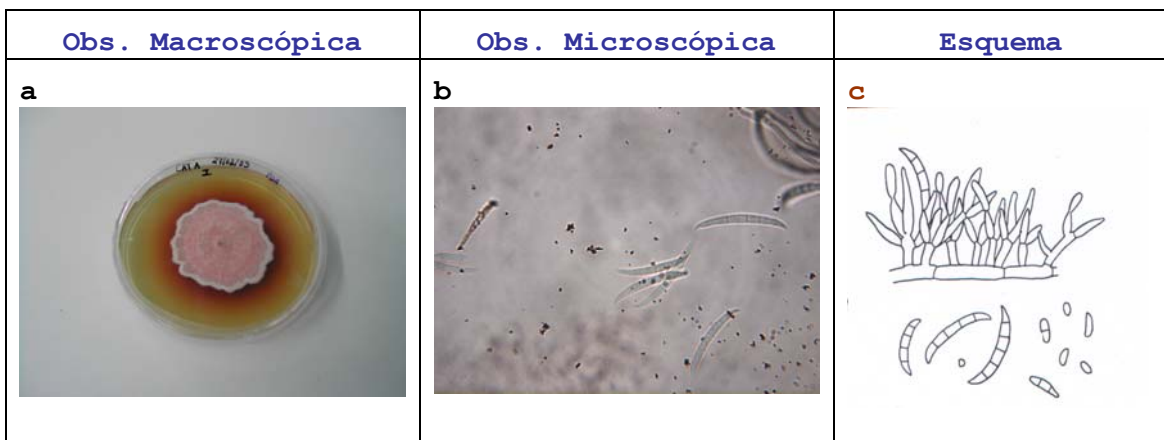


Fig.19: Cultura à superfície do agar (a); conídio fusiforme não apical do *Fusarium* (b); esquema da conidiogênese do *Fusarium* (c).

Leothalium

Macroscopicamente a cultura apresenta à superfície do meio de cultura uma cor que varia entre o salmão e o laranja, sempre em tonalidades vivas. A zona central assemelha-se a uma massa pastosa e plástica de cores branca e rosa. No interior do agar a cor é rosa alaranjado. Embora não haja alteração da cor do meio de cultura, este ficou

ligeiramente baço.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, observou-se um grande número de conídios, semelhantes a leveduras, com uma forma semelhante à de um limão ou de uma azeitona. Têm parede dupla e parecem sair directamente das hifas. As hifas são septadas e aparecem em número muito reduzido.

Obs. Macroscópica	Obs. Microscópica	Esquema
 a	 b	

Fig.20: Cultura à superfície do agar (a); conídios semelhantes a leveduras e hifas em numero reduzido (b).

Leveduras

Macroscopicamente as culturas apresentam uma cor branca-arrosada, tanto no interior como à superfície do agar. Têm um aspecto leitoso e plástico. Não há alteração da cor do meio de cultura.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, apresentam-se como pequenos pontos, na sua maioria de forma arredondada. As células apresentam gemulação.


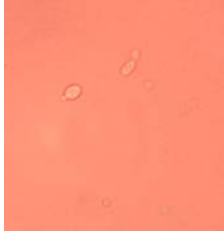

Obs. Macroscópica	Obs. Microscópica	Esquema
 a	 b	 c

Fig.21: Cultura à superfície do agar (a); aspecto das leveduras (b).

Penicillium (cor verde)

Macroscopicamente a cor da cultura, à superfície do meio de cultura, é verde-azulada, mais intensa na zona central. No interior é castanha-amarelada. Houve alteração da cor do meio de cultura (agar) para uma coloração rosa clara. O crescimento da cultura é radial.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, observou-se que os conídios têm forma circular. Os conidióforos são altos e ramificados e apresentam na extremidade grupos de fiálides, em forma de garrafa, a partir das quais são produzidos os conídios em cadeia. O conídio mais jovem encontra-se na base da cadeia, ou seja, junto à extremidade das fiálides. As hifas são septadas.

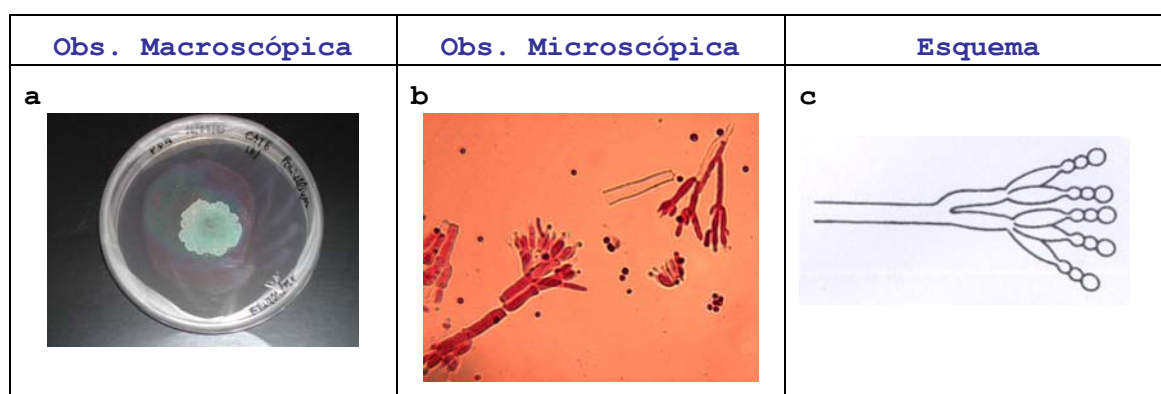


Fig. 22 Cultura à superfície do agar (a); conidiogénese do *Penicillium* (b e c).

Penicillium (cor castanha)

Macroscopicamente observa-se que a cor da cultura, à superfície do meio de cultura (nut) e no seu interior é castanha-acinzentada. O crescimento da cultura é radial. Não há alteração da cor do meio de cultura.

Ao microscópio óptico, com ampliação de 500x, é possível observar as hifas longas. Os conídios são esféricos e de uma célula e saem, em cadeia, de fiálides de forma cilíndrica. As fiálides são antecedidas de uma célula, recortada no topo, que existe na extremidade do conidióforo. De uma mesma célula saem várias fiálides.

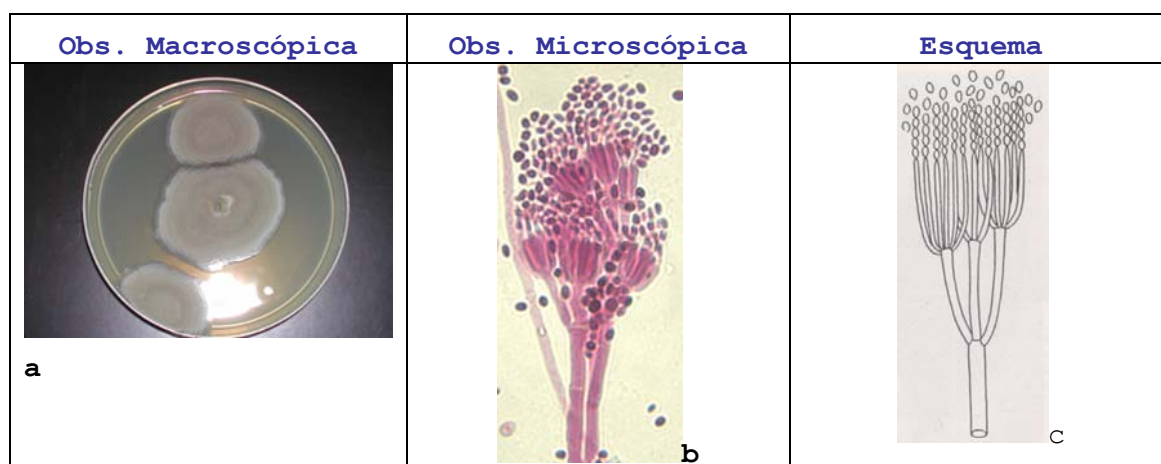


Fig. 23: Cultura à superfície do agar (a); conidiogênese do *Penicillium* (b e c).

Prototheca

Macroscopicamente a cultura apresenta pequenos pontos brancos de aspecto leitoso e forma e dimensão variadas, assemelhando-se às culturas de leveduras, não havendo gemulação. Não há alteração da cor do meio de cultura.

Ao microscópio, com ampliação de 500x, os conídios são também semelhantes a leveduras e não se observam hifas.



Fig.24: Cultura à superfície do agar (a); aspecto da Prototheca semelhante a levedura (b); esquema da reprodução da Prototheca (c).

Os fungos identificados são todos Deuteromicetas, também denominados de fungos imperfeitos. A presença de alguns destes fungos em materiais pétreos é referida por vários autores. Warscheid (2000) refere a presença de *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus* e Mitchell (2000) e Tiano (1998) acrescentam, aos dois primeiros, o *Fusarium*.

Observou-se ainda o crescimento de bactérias, leveduras e Prototheca. As bactérias são organismos unicelulares, sem núcleo individualizado e com reprodução assexuada. As leveduras são fungos unicelulares, de forma arredondada, que se reproduzem assexuadamente por gemulação (Ingraham et al., 2000). *Prototheca* é um organismo unicelular esférico, transparente e estruturalmente semelhante a uma alga verde, mas que consome carbono orgânico dissolvido (não realiza fotossíntese). Reproduz-se através da formação de vários esporos (2-16 ou mais) dentro de um saco denominado esporângio. Estes esporos são libertados quando a parede do esporângio se rompe.

Dado que o *Penicillium*, de cor verde, que surge nas duas áreas com coloração rosa, alterou a cor do meio de cultura para rosa claro coloca-se a hipótese de ser este o microrganismo responsável pela coloração rosa das paredes da Igreja.

4.6. Inoculação das amostras de pedra

Ao fim de um mês as amostras de pedra inoculadas com os microrganismos não apresentavam nenhum tipo de coloração. O facto de não ter sido possível obter uma coloração semelhante à observada nas paredes da Igreja pode ser o resultado de:

- Tempo insuficiente de inoculação;
- Condições de inoculação diferentes das condições ambientais determinadas na Igreja;
- Ausência de quantidade suficiente de nutrientes para o crescimento de seres heterotróficos.

Resultados positivos com inoculações de substratos foram obtidos por Gorbushina et al. (2003) ao fim de 3-6 meses, o que revela a morosidade deste processo. Por conseguinte, um mês de inoculação pode não ter sido suficiente para atingir

o objectivo desejado - a coloração rosa das amostras de pedra.

As condições em que a coloração rosa se desenvolveu não são exactamente as mesmas em que as amostras de pedra se encontraram. Na Igreja ocorre deposição e acumulação de partículas à superfície da pedra. No entanto, optou-se por adoptar este procedimento dado ser o único método de assegurar a não contaminação previa das amostras de pedra.

4.7. Seleção dos biocidas e da metodologia de aplicação

Os quatro biocidas seleccionados reúnem, tanto quanto possível, os requisitos indicados em 3.7. Dado a Igreja ser actualmente um local de trabalho, a baixa toxicidade dos produtos, para o ambiente e para o operador, foi tida em conta, como preconiza Warscheid (2000).

O facto de, em situações anteriores, não se terem obtido resultados satisfatórios com os métodos mecânicos, deverá resultar de estes não implicarem uma acção biocida directa, destinando-se apenas a remover a biomassa presente (Normal 30/89). Como refere Nugari *et al.* (2003), a sua eficácia raramente é total, dado que as estruturas microbiológicas penetram frequentemente no substrato, o que impede a sua remoção completa.

Tendo sido confirmada a presença de microrganismos nas áreas de amostragem, e não se tendo obtido resultados satisfatórios com os métodos mecânicos, recorreu-se, seguindo Caneva *et al.* (1996), a produtos com uma actividade biocida (devida a um princípio activo).

Como metodologia de aplicação dos biocidas, escolheu-se a pincelagem, dado ser aquela que:

- Mais se adequa à orientação vertical das zonas de teste;
- Mais se adequa à área (100 cm²) das zonas de teste;
- Melhor permite aplicar a pequena quantidade seleccionada de biocida (10 ml);
- Oferece melhor garantia duma aplicação homogénea das soluções líquidas de biocida.

Apresentam-se na tabela 10 os resultados da aplicação dos biocidas nas paredes da Igreja, imediatamente após a sua aplicação e passados sete dias.

Tabela 10: Observação macroscópica do substrato imediatamente após a aplicação dos produtos e após uma semana de aplicação. Designa-se por A (Antifungos), B (Rhodax), C (Horizon), D (Q-80) e S (água).

<i>Produtos</i>	<i>Alteração macroscópica cor</i>		<i>Absorção do biocida</i>	
	Após aplicação	Após 7 dias	Após aplicação	Após 7 dias
A	+	□	●	●●
B	+	□	●	●●
C	+	□	●	●●
D	+	□	●	●●
S	+	■	○	○○

Legenda:

- + Alteração de coloração rosa para cor substrato
- Manteve cor do substrato
- Readquiriu ligeira coloração rosa
- Absorção média
- Absorção lenta
- Superfície seca
- Superfície ligeiramente húmida
- A Antifungos CIN
- B Rhodax (Bayer)
- C Horizon (Bayer)
- D Q-80 (Quimidroga)
- S H₂O

Com base nos dados apresentados na tabela 12 podemos

verificar os aspectos seguidamente referidos.

Na altura de aplicação:

- Todos os biocidas aplicados, bem como a água, provocaram alteração macroscópica da coloração rosa do substrato para a cor original da pedra.
- Os biocidas foram medianamente absorvidos pelo substrato, enquanto a água foi de difícil absorção.
-

Após 7 dias da aplicação:

- Todas as zonas de teste dos biocidas mantêm a cor original do substrato.
- As zonas de teste do solvente readquiriram uma ligeira coloração rosa.
- As zonas de teste dos biocidas encontram-se secas, o que indica a absorção completa dos biocidas.
- As zonas de teste do solvente estão húmidas, significando que ele não foi totalmente absorvido.

Com base nas observações feitas podemos referir o seguinte:

- Relativamente a eficiência macroscópica dos biocidas na remoção da coloração rosa verifica-se que com todos os produtos se obtiveram resultados positivos. Esta eficiência será, provavelmente, devida à contribuição positiva do princípio activo dos biocidas. A alteração da cor devida à aplicação dos biocidas corrobora a origem biológica da coloração rosa;
- O solvente (H₂O) mostrou-se ineficaz na remoção da coloração, provavelmente por não possuir nenhum princípio activo capaz de eliminar os microrganismos presentes. Embora no imediato ele se tenha revelado igualmente eficaz, após sete dias a coloração reapareceu;

- O facto de as zonas de aplicação do biocida estarem secas pressupõe a total absorção dos produtos, o que está conforme o desejado com um produto biocida, ou seja, a sua rápida absorção pelo substrato contaminado. Este aspecto pode dever-se à presença de substâncias coadjuvantes que, como refere Caneva *et al.* (1996), favorecem a aplicação do produto, melhorando a sua penetração e persistência;
- O solvente (H₂O), para além de não possuir as substâncias supra-referidas, tem uma elevada tensão superficial, que poderá dificultar a sua absorção pelo substrato, justificando, de algum modo, a humidade superficial das zonas de teste.

Em regra, as observações visuais dos microrganismos no substrato pétreo são o método de avaliação dos biocidas mais comumente usado a longo prazo.

Os dados aqui apresentados revelam-se insuficientes para escolher um biocida. Aparentemente, todos eliminaram a coloração rosa e não alteraram a cor do substrato pelo que poderíamos concluir que todos são eficientes a curto prazo. No entanto, é difícil discriminar o melhor produto com um único parâmetro - modificações visuais reconhecíveis a olho nu. Por conseguinte, a avaliação feita presentemente deverá ser complementada com análises, qualitativas e quantitativas, de modo a confirmar a eficácia dos biocidas no substrato a longo prazo.

A determinação dos parâmetros colorimétricos das zonas de teste de aplicação dos biocidas é um dos métodos que futuramente deverá ser usado para aferir o melhor desempenho dos biocidas. Uma possível modificação de cor induzida às zonas de teste, não identificável a olho nu, constituirá um aspecto significativo para a escolha do biocida a utilizar na eliminação da coloração rosa das

paredes da Igreja.

Importa referir, na mesma linha de pensamento de Nugari *et al.* (2003), que os métodos químicos, embora possam matar todos os organismos e microrganismos presentes nas superfícies deterioradas, não impedem recolonizações futuras. Por conseguinte, simultaneamente, revelam-se necessárias estratégias de prevenção que limitem e restrinjam as condições favoráveis a um novo crescimento biológico.

é