

CAPITULO 5 - CONCLUSÕES

Com o presente trabalho foi possível caracterizar cientificamente a coloração rosa presente nas paredes interiores em pedra calcária da Igreja de S.J.A.. A determinação dos parâmetros colorimétricos, L^* , a^* e b^* , de cada uma das áreas de amostragem permitiu distinguir áreas com e sem coloração rosa. Com estes parâmetros é agora possível comparar esta coloração rosa com outras colorações, macroscopicamente semelhantes.

A identificação de microrganismos nas áreas de amostragem permitiu-nos atribuir à coloração rosa uma origem biológica. Por conseguinte, de acordo com as Normas 1/88, podemos classificar a coloração rosa da Igreja como uma patina biológica. Neste contexto deve ser descrita como um estrato fino, macio e homogêneo, de natureza biológica, aderente à superfície da pedra e de cor rosa.

Esta origem biológica foi corroborada com os efeitos dos biocidas sobre a superfície pétreo, nomeadamente com a alteração da cor rosa do substrato para a cor original da pedra.

Não foi possível identificar qual, ou quais, os microrganismos responsáveis pela coloração rosa. A coloração rosa do meio de cultura pelo *Penicillium*, de cor verde, poderá significar que este microrganismo, ou algum produto do seu metabolismo, estejam na sua origem da coloração das paredes da Igreja.

A aplicação do biocida resolveu, aparentemente e a curto prazo, o problema de biodeterioração. Contudo, os métodos químicos, embora possam matar os microrganismos identificados, não impedem recolonizações futuras. São, por isso, necessárias medidas de prevenção, ao nível dos factores abióticos, tais como um plano de monitorização ambiental e de inspecção periódica.

CAPITULO 6 - NOVAS LINHAS DE INVESTIGAÇÃO

Em Portugal, os problemas de biodeterioração em bens culturais não têm sido minuciosamente analisados, sendo frequentemente controlados através dos tratamentos com biocidas. Nesse sentido, revela-se fundamental o estudo da bio-susceptibilidade dos materiais, dos factores ambientais em que estes se encontram, e ainda dos microrganismos que os colonizam. Apenas um conhecimento assim abrangente permitirá que se levem a cabo intervenções mais específicas e adequadas no controlo da biodeterioração.

Com vista a um melhor conhecimento dos aspectos supra-referidos, seria importante dar continuidade aos estudos aqui apresentados referentes à biodeterioração das paredes da Igreja de S.J.A., nomeadamente:

- Caracterização mineralógica e petrográfica do substrato pétreo;
- Recolha de microrganismos em outras áreas da Igreja.
- Nova inoculação utilizando amostras de amostras igual à da Igreja de S.J.A.;
- Realização de testes em laboratório, para determinar qual o biocida mais eficiente na eliminação da coloração rosa e qual a concentração a usar;
- Quantificação, em laboratório e *in situ*, da eficiência do tratamento biocida.

No contexto português uma linha de investigação centrada na identificação e comparação das diversas colorações rosa que, como referimos em 1.5, se observam em vários monumentos e esculturas em pedra, permitiria traçar linhas de orientação para o controlo futuro dos processos de biodeterioração.

Anexo

Tabela 1: Composição do meio de cultura BG 11

Composição	Quantidade/Litro
NaNO ₃	1, 5 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1, 5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0075 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036 g
Acido cítrico	0,006 g
Ferroamónio citrato	0,006 g
EDTA (sal bisodico)	0,001 g
Na ₂ CO ₃	0,02 g
Solução de microelementos	1 ml
H ₃ BO ₃	2,86 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,222 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,049 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,81 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,079 g
H ₂ O	0,391 g
pH =7,1	1000 ml

Tabela 2: Composição do meio de cultura PDA¹

Composição	Quantidade /Litro
<i>D-Glucose</i>	20,0 g
Infusão de batata	4,0 g
Agar	15,0 g
PH = 5, 6 +/- 0,2	

Tabela 3: Composição do meio de cultura Nutrient Agar²

Composição	Quantidade/Litro
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
pH = 6,8 +/- 0,2	

¹ A preparação do PDA (*Potato Dextrose Agar*) é feita dissolvendo 39 gramas do produto em 1 litro de água destilada.

² A preparação é feita dissolvendo 23 gramas do produto em 1 litro de água destilada.

Tabela 4: Principais características dos biocidas usados na Igreja

N.comercial (Marca)	Composição química	pH (20° C)	Aspecto	Toxicidade	Espectro acção	Dose aplicada
Biocida A Antifungos Concentrado 89-260.0000 (CIN)	2-(2-butoxiethoxi) etanol (25-50%) ♦2-propanol (10-25%) ♦nafetanato de tributylestanho (2,5-10%) ♦cloreto de didecildimetilamónio (2.5-10%)	8,5	Líquido transparente amarelado		Algicida Fungicida	Aplicaram-se 10 ml (numa diluição de 1:5) de biocida nas áreas A.
Biocida B Rhodax® (Bayer)	25%(p/p) folpete ♦50%(p/p) fosetil de aluminio	3-5	Pó branco	Irritante DL50: 8.000 mg/kg sem toxicidade aguda significativa	Fungicida sistémico e contacto.	Aplicaram-se 10 ml de uma solução com a concentração de 300g/100 L
Biocida C Horizon	Emulsão óleo em água com 250g/l de tebuconazol (25%)	5-8	Líquido incolor	Nocivo	Fungicida sistémico e contacto	Aplicaram-se 10 ml de uma solução com a concentração de 40 ml (ml/100l).
Biocida D Cloruro benzalconio Q-80 (Quimidroga)	♦cloreto de N-alquil, N-dimetilbenzilamónio (% em peso 75-85) ♦isopropanol (2-propanol) (% em peso 8-13)	7	Líquido transparente amarelado	DL50: 550 mg/kg sem toxicidade aguda significativa	Bactericida Algicida Fungicida	Aplicaram-se 10 ml de uma solução na mesma concentração do biocida C

Tabela 5: Valores média e desvio padrão das determinações de HR no interior da Igreja

Mes	Valor médio	Desvio padrão	Determinações
<i>Jan</i>	56,6	7,9	31
<i>Fev</i>	60,6	3,8	32
<i>Mar</i>	57,0	4,3	32
<i>Abr</i>	57,7	4,9	20
<i>Mai</i>	56,7	5,8	26
<i>Jun</i>	58,5	3,1	25
<i>Jul</i>	59,3	4,8	26
<i>Ago</i>	57,5	1,5	25
<i>Set</i>	57,1	2,9	12
<i>Out</i>	57,2	3,9	12
<i>Nov</i>	57,2	4,5	16

Tabela 6: Valores média e desvio padrão das determinações de T. no interior da Igreja

Mes	Valor médio	Desvio padrão	Determinações
Jan	15,0	1,9	31
Fev	14,4	1,0	32
Mar	17,0	0,5	32
Abr	18,4	1,5	20
Mai	19,8	1,3	27
Jun	23,0	1,1	25
Jul	23,0	1,3	26
Ago	25,6	0,8	25
Set	23,5	1,1	12
Out	20,9	1,7	12
Nov	17,6	2,2	16

Tabela 7: Valores dos parâmetros colorimétricos L* a* e b* obtidos com as análises colorimétricas nas diferentes áreas de amostragem

Área 0			Área A			Área B		
L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
84,36	2,46	12,11	69,04	13,22	15,13	63,94	12,43	14,29
84,38	2,09	13,20	76,52	6,88	11,22	66,23	13,02	14,36
84,09	2,77	14,80	63,62	10,29	14,62	71,32	10,44	11,57
85,30	1,72	11,41	73,70	13,40	15,02	67,59	8,46	13,38
88,14	1,29	8,29	69,95	11,90	17,46	69,81	8,5	14,03
88,49	1,15	7,94	72,09	9,66	13,92	69,75	6,76	15,95
88,29	1,28	8,28	75,71	12,14	14,62	70,38	7,96	13,26
84,78	1,96	11,97	71,29	10,96	13,76	70,59	8,48	13,28
85,31	1,70	11,50	73,87	11,47	11,64	71,39	8,23	11,76
88,63	1,08	7,52	75,69	6,41	10,56	71,01	8,12	11,53

$$\Delta L^* (A-0) = 72,15 - 86,18 = -14,03$$

$$\Delta L^* (A-B) = 72,15 - 69,201 = 2,95$$

$$\Delta L^* (B-0) = 69,201 - 86,18 = -16,98$$

$$\Delta a^* (A-0) = 10,63 - 1,75 = 8,88$$

$$\Delta a^* (A-B) = 10,63 - 9,24 = 1,39$$

$$\Delta a^* (B-0) = 9,24 - 1,75 = 7,49$$

$$\Delta b^* (A-0) = 13,8 - 10,7 = 3,1$$

$$\Delta b^* (A-B) = 13,8 - 13,34 = 0,46$$

$$\Delta b^* (B-0) = 13,34 - 10,7 = 2,64$$

$$\Delta E^* (A-0) = 16,8909828$$

$$\Delta E^* (A-B) = 3,29335695$$

$$\Delta E^* (B-0) = 18,7454021$$

Glossário:

Agar - Substância gelatinosa produzida por algumas macroalgas (como por exemplo a alga vermelha *Gellidium*), utilizada para solidificar meios de cultura.

Anamorfo - Fase reprodutiva assexuada de um fungo que produz, geralmente, conídios.

Autoclavar - Esterilização por vapor conseguida a temperaturas elevadas (121 ° C), sob pressão.

Bactéria - Procariontes microscópicos, unicelulares.

Biocida - Termo genérico para indicar qualquer que seja o agente químico capaz de matar os organismos vivos.

Biodeterioração - Qualquer alteração indesejável causada pela actividade dos organismos vivos (factores bióticos) nas propriedades dos materiais de importância histórica, económica e cultural.

Biofilme - Camada superficial constituída por células e por substâncias por elas produzidas.

Biomassa - Massa total (quantidade) de organismos vivos numa dada área, ou volume.

Bio-susceptibilidade (bio-receptividade) - Aptidão de um material para ser colonizado por um, ou vários, grupos de organismos, ou seja, a susceptibilidade que um composto apresenta para sofrer biodeterioração.

Pode ser devida ao potencial do substrato (primária) ou resultar da acumulação de partículas sobre o substrato (extrínseca). Se a colonização ocorre ao longo do tempo, como resultado das condições ambientais, ou após um tratamento, diz-se que a biosusceptibilidade é secundária e terciária, respectivamente.

Conidiogénese - Processo através do qual se desenvolvem os conídios.

Conidióforo - Hifa especializada, simples ou ramificada, onde se formam os conídios.

Conídio - Esporo assexuado, produzido na superfície externa do micélio.

DL 50 - Quantidade de produto assimilado por via oral e cutânea que provoca a morte de 50% dos organismos testados. É expressa em mg de produto/ Kg peso vivo.

Esporângio - Saco que contém os esporos.

Esporângiósporos - Esporos assexuados originados dentro do esporângio.

Esporo - Estrutura de propagação especializada, geralmente agente de dispersão, existente em fungos. Tem a capacidade de se transformar em organismo adulto, não sendo necessária a fusão com outra célula. Pode ser unicelular ou composto de duas ou mais células.

Eucariontes - Organismos que possuem núcleo, delimitado por membrana nuclear, cromossomas e organelos (mitocôndrias, aparelho de Golgi e ribossomas).

Factores abióticos - Factores ambientais de natureza física (temperatura, vento e luz) ou química (humidade relativa, pH e poluentes).

Fungicida - Agente químico, ou biológico, que inibe o crescimento fúngico.

Fungos - Eucariontes não-fotosintéticos que produzem exoenzimas e que absorvem os seus nutrientes. Produzem, em regra, uma rede de tubos ramificados designados por hifas.

Hifa - Estrutura tubular presente em quase todos os fungos, que constitui a unidade de crescimento do micélio.

Inoculação - Colocação de um microrganismo dentro de um organismo ou substrato.

Levedura - Fungo unicelular, embora algumas possam produzir hifas. De um modo geral, é anamorfo e as suas células assemelham-se a conídios, que se multiplicam por vários tipos de conidiogénese.

Metabolismo - Conjunto de todos os processos químicos que ocorrem dentro de uma célula ou de um organismo vivo.

Meio - Preparação usada para as culturas de fungos e de outros microrganismos. Em regra, consiste em nutrientes específicos dissolvidos em água, usados tanto no estado líquido como sob a

forma de gel, com agar.

Micélio - Massa filamentosa de hifas que compõe a maior parte do fungo.

Microrganismos - Organismos que apenas se visualizam individualmente com um microscópio (fungos, leveduras, bactérias, actinomicetas, cianobactérias).

Organismos autotróficos - Organismos que sintetizam os materiais orgânicos de que necessitam a partir de substâncias inorgânicas.

Organismos Heterotróficos - Organismos cujo processo biosintético necessita de compostos orgânicos, isto é, que utilizam carbono orgânico como fonte de energia.

Placas de contacto Petri - Placas redondas transparentes utilizadas para as culturas de fungos e de outros microrganismos.

Bibliografia

- AIRES-BARROS, L., BASTO, M., DIONISIO, A., e CHAROLA, A. (2001) - "Orange coloured surface deposits on stones from the monastery of Batalha (Portugal) and from nearby history quarries: Characteristics and origins", in *Internationale Zeitschrift fur Bauinstandsetzen und Baudenkmalpflege*, pp. 491-506.
- ALLSOPP, D. e GAYLARD, C. (2002) - *Heritage biocare - training course notes in biodeterioration for museum, library, archive and cultural property staff*, Archetype Publications, United Kingdom.
- ASCASO, C., WIERZCHOS, J., SOUSA-EGIPSY, V., RIOS, A., RODRIGUES, J. (2002) - "In site evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jeronimos Monastery (Lisbon)", in *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49, Elsevier Publications, pp. 1-12.
- BARNETT, H., (1997) - *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4ª edição, Burgess Publishing Company, Minneapolis
- BERNS, R. (2001), *Principles of Color Technology*, Third edition, Wiley-Interscience Publication, New York.
- BOUTIN e LEROUX (2000) - "Color and weight evolution of limestones protected by water repellents after a three-year ageing period in urban conditions", in *9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, vol.2, Elsevier Publications, Venice, pp. 197-205.
- CANEVA, G., NUGARI, M., SALVADORI, O. (1991) - *Biology in the conservation of works of art*, ICROM, Rome.
- CANEVA, G., NUGARI, M., SALVADORI, O. (1994) - *La biologia nel restauro*, Nardini Editore, Firenze.
- CANEVA, G., NUGARI, M., PINNA, D., SALVADORI, O. (1996) - *Il controllo del degrado biologico - I biocidi nel restauro dei materiali lapidei*, Nardini Editore, Fiesole.
- CIFERRI, O. (2002) - "The role of microorganisms in the

- degradation of cultural heritage", in *Reviews in Conservation*, Number 3, pp. 35-45.
- CORREIA, V. (1941) - *Secções de Arte e Arqueologia. Catálogo Guia*, Museu Nacional de Machado de Castro, Coimbra Editora.
- CORREIA, V., GONÇALVES, A. (1947) - *Inventário Artístico de Portugal. Cidade de Coimbra*, Academia Nacional de Belas Artes, Lisboa.
- DE LEO, F., URZI, C. (2003) - "Fungal colonization on treated and untreated stone surfaces" in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Saiz-Jeminez (ed.), Lisse, pp. 213-218.
- GÓDYOVÁ, M. (2002) - "The biocorrosive action of soil microscopic fungi in atypical biotopes and ecotopes", in *Ekológia*, vol. 21., n°4, Bratislava, pp. 397-402.
- GORBUSHINA, A., DIAKUMAKU, E., MULLER, L., KRUMBEIN, W., (2003) - "Biocide treatment of rock and mural paintings: problems of application, molecular techniques of control and environment hazards", in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Saiz-Jimenez (ed.), Lisse, pp. 61-71.
- GURTNER, C., PINAR, G., VYBIRAL, D., LUBITZ, W., ROLLEKE, S. (2001), - "Rubrobacter-related bacteria associated with rosy discoloration of masonry and lime wall paintings", in *Arch Microbiol*, n° 176, Institute of Microbiology and Genetics, Vienna, pp. 347-354.
- INGRAHAM, J., INGRAHAM, C. (2000) - *Introduction to Microbiology*, Brooks/Cole, USA.
- MARTINEZ, M., GAYLARD, C., e OTALORA, A. (2003) - "Preliminary microbiological analysis of some monuments in Villa de Leyva, Colombia", in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Saiz-Jeminez (ed.), Lisse, pp. 277-280.
- MITCHELL, R., (2000) - "Changes in the biofilm microflora of limestone caused by atmospheric pollutants", in *International Biodeterioration & Biodegradation*, n° 46, pp. 299-303.
- MONTE, M. (2003), "Oxalate film formation on marble specimens caused by fungus", in *Journal of Cultural Heritage* 4,

Elsevier Publications, pp. 255-258.

NUGARI, M., SALVADORI, O. (2003) - "Biodeterioration control of cultural heritage", in *Molecular Biology and Cultural Heritage*, Saiz-Jimenez, Lisse, pp. 233-242.

PINAR, G., LUBITZ, W. (s/d.) - *Molecular Techniques: application to the analysis of microbial communities colonising art works and to the monitoring of changes. Case study: Wall paintings of the Castle of Herberstein*, Institute of Microbiology and Genetics, University of Vienna.

Raccomandazioni Normal, Centri di studio di Milano e Roma sulle cause di deperimento e sui metodi di conservazione delle opere d'arte, Istituto Centrale per il Restauro, Roma.

Normal 1/88 - *Alterazione macroscopiche dei materiali lapidei*

Normal 9/88 - *Microflora autotrofica ed eterotrofica: tecniche di isolamento in coltura*

Normal 30/89 - *Metodi di controllo del biodeterioramento*

Normal 38/93 - *Metodi per la valutazione sperimentale dell'efficacia dei biocidi in laboratorio e in situ.*

RASCHLE, P. (2001) - "Microbiology for our cultural heritage", in *Chimia*, n° 55, Schweizerische Chemische Gesellschaft, pp. 990-995.

TIANO, P., TOSINI, I., RIZZI, M. (1997) - "Antimould action of some biocides mixed with glues used in paintings conservation", in *Science and Technology for Cultural Heritage*, 6 (2), CNR, Firenze, pp. 129-134.

TIANO, P., (1998) - "Biodeterioration of monumental rocks: decay mechanisms and control methods", in *Science and Technology for Cultural Heritage*, 7 (2), CNR, Firenze, pp. 19-38.

URZÌ, C., LEO, F., GALLETTA, M., SALAMONE, P. (2000) - "Efficiency of biocida in 'in situ' and 'in vitro' treatment. Study case of the 'Templete de nudejar', Guadalupe, Spain", in *9th International Congress on Deterioration and Conservation of stone*, Venice, pp. 531-

539.

WAKEFIELD, R., JONES, M. (1998) - "An introduction to stone colonizing micro-organisms and biodeterioration of building stone", in *Quarterly Journal of Engineering Geology*, n° 31, pp. 301-313.

WARSCHEID, Th., BRAAMS, J. (2000) - "Biodeterioration of stone: a review", in *International Biodeterioration & Biodegradation*, n° 46, pp. 343-368.

WARSCHEID, Th. (s/d) - "Integrated concepts for the protection of cultural artefacts against biodeterioration", in *Of Microbes and Art: The role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 185-201.

ZANARDINI, E., ABBRUSCATO, P., SCARAMELLI, L., ONELLI, E., SORLINI, C. (2002), Red stains on Carrara marble: a study of the Certosa of Pavia, Italia (no prelo).

Fontes Manuscritas

A.U.C.

Fundos Notariais de Coimbra, Tab. Manuel Francisco Santos
Dep. V, Sec. 1^a, Est. 8, tab. 5, n°80.