A berlinda de aparato do imperador D. Pedro II: identificação de fungos em partes selecionadas e sua relação com biodeterioração e aerobiologia

Márcia Teresa Soares Lutterbach¹

Ana Lucia Chaves de Oliveira¹

Eliane Marchesini Zanatta²

Antonio Carlos Augusto da Costa^{3,*}

¹Instituto Nacional de Tecnologia, Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação, Rio de Janeiro, Brasil

²Museu Imperial, Petrópolis, Brasil

³Museu de Astronomia e Ciências Afins e Universidade do Estado do Rio de Janeiro/IQ, Rio de Janeiro, Brasil

* antoniocosta@mast.br

Resumo

A berlinda de aparato do imperador D. Pedro II foi construída pela companhia britânica Pearce & Countz, responsável pela construção das carruagens da monarquia britânica, para sua cerimônia de coroação, em 1841. Seus materiais componentes são de diferentes naturezas, com distintas resistências mecânicas e algumas incompatibilidades com padrões ambientais de sua área de guarda. Partes específicas, tais como tecidos de algodão, ornamentos e crinas de cavalo foram investigadas, bem como a microbiota presente no interior e no exterior da berlinda imperial. A partir deste monitoramento, 37 colônias de fungos filamentosos, 6 leveduras e 4 bactérias foram isoladas (sequenciamento do DNA). A maioria dos micro-organismos pode danificar os materiais constituintes.

Palavras-chave

Berlinda
Biodeterioração
Biologia molecular

The imperial coach of D. Pedro II: DNA fungal identification in selected materials and its relation to biodeterioration and aerobiology

Abstract

The imperial coach of emperor D. Pedro II was built by Pearce & Countz British Company, responsible for the coaches from the British Monarchy, for his crowning ceremony, in 1841. Its component materials are of several natures, with distinct mechanical strength and some incompatibilities with environmental patterns in its place of storage. Specific parts, such as corduroy fabrics, ornaments and horse manes were investigated for microorganisms present both in the interior and exterior of the Imperial Coach. From this monitoring, 37 filamentous fungi, 6 yeasts and 4 bacterial strains were isolated (DNA sequencing). Some of them are known for their toxic and pathogenic nature. Most microbes found can damage its constituting materials.

Keywords

Coach
Biodeterioration
Molecular biology

ISSN 2182-9942

Introdução

A berlinda de aparato do imperador D. Pedro II foi construída pela firma britânica Pearce & Countz, fornecedora da Casa Real Inglesa, especialmente para a cerimônia de sagração e coroação de D. Pedro II, em 1841. Era utilizada pelo imperador em ocasiões solenes, como os casamentos de suas duas filhas, a abertura e o fechamento da Assembléia Geral. A carruagem foi confeccionada em madeira e ferro e elementos decorativos em prata, madeira entalhada com folha de ouro e pintura que remete à cana de açúcar, couro, janelas em cristal, bordados e galões em fios dourados, estofamentos e revestimentos em veludo de algodão e crina de cavalo. Puxada a oito cavalos, era conhecida pela população como “Monte de prata”, devido ao material predominante, ou “Carro cor de cana”, em razão de sua coloração.

A berlinda de aparato de D. Pedro II é um objeto museológico com implicações históricas de grande relevância por ser representativa do Segundo Reinado e de um sistema de governo monárquico, além de uma importante personalidade histórica como D. Pedro II. Sua representatividade é potencializada pelo fato de ser revestida de uma carga simbólica muito marcante – verdadeira “insígnia” nacional e imperial – tendo servido ao longo de todo o governo desse imperador e estando presente nas ocasiões mais solenes da história brasileira. Dessa forma, acaba por associar-se emblematicamente ao próprio Estado Monárquico brasileiro.

No entanto, a despeito de seu caráter histórico e simbólico, não se pode descartar o fato de ter sido um objeto utilitário, ou seja, tinha uma função prática que repercutiu em alguns desgastes e deteriorações diretamente ligadas ao uso.

Essas características são essenciais para determinar uma metodologia de intervenção fundamentada em conceitos éticos internacionalmente aceitos, tendo como base a Carta do Restauro de 1972 [1] e a *Teoria del Restauro de Cesari Brandi* [2], baseada no trabalho deste importante teórico da ciência da restauração.

Sendo assim, o principal critério norteador de todas as intervenções foi o da instância histórica, procurando-se respeitar ao máximo a integridade e a legibilidade do objeto, bem como as marcas do uso. Os danos mais acentuados foram sanados, buscando-se resgatar a leitura visual sem, no entanto, incorrer em possíveis interpretações fantasiosas. O projeto de restauração envolveu várias etapas, visando preservar a berlinda de aparato de D. Pedro II como bem cultural representativo e evocativo da memória e do patrimônio nacional [3]. As Figuras 1a e 1b apresentam uma visão geral da berlinda e as Figuras 1c a 1h mostram vários pormenores da mesma. Em todos os casos observa-se a situação antes e após a restauração.

A berlinda e a sua restauração

Características físicas e materiais

A berlinda de D. Pedro II é composta por uma grande variedade de materiais, com diferentes graus de resistência, sendo muitos materiais com certas incompatibilidades em relação às condições ambientais. Apesar dessa diversidade, houve uma preocupação na seleção dos melhores materiais: madeiramento em pinho-de-riga, aço e ferro de excelente têmpera, couros adequadamente tratados, sem contar a prata. As qualidades destes materiais aliadas à maestria da fabricação contribuíram para o razoável estado de conservação em que a peça se encontra atualmente, mesmo após todas as vicissitudes pelas quais passou, tais como transposição de local de guarda, variações climáticas abruptas. Além disso, um objeto que era funcional (viatura), atravessou o oceano por vezes (Inglaterra/Brasil, Brasil/França, França/Brasil), permaneceu nas cocheiras do Barão do Catete por mais de uma década após a Proclamação da República, depois foi para as cocheiras do Palacete D’Eu onde ficou até a década de 40 quando foi doada ao Museu Imperial. No seu período museal, sofreu algumas intervenções que não foram tão satisfatórias, como o caso da desinfestação com phostoxin que provocou uma grande alteração cromática, principalmente nas partes com revestimentos têxteis.

As peças em madeira, ferro e aço da estrutura, encontravam-se em estado de conservação mais favorável se comparadas às que são constituídas de materiais têxteis. Estes, apesar da alta qualidade, não possuem a mesma resistência aos agentes agressores e constituem a parte mais afetada pela deterioração. No entanto, apesar dos danos, foram confeccionados com extrema habilidade, recorrendo-se, inclusive, a materiais de qualidade comprovada, como os fios metálicos de bordados, franjas, canutões e borlas. O fato de essas peças encontrarem-se danificadas deve-se à fragilidade em relação a ações mecânicas inadequadas. As alterações cromáticas dos tecidos – aspecto bastante delicado e de difícil solução – referem-se à sensibilidade face aos agentes agressores ambientais, bem como a intervenções restaurativas impróprias.

Procedimentos de desmonte, higienização mecânica e química

Foi feita a desmontagem das partes têxteis, revestimentos, escadas de armar, soleiras e do forro do tejadilho, incluindo-se a numeração minuciosa de todas as peças, elaboração de desenhos elucidativos e registros fotográficos, além do acondicionamento provisório e a análise minuciosa de fragmentos para encaminhamento a testes laboratoriais.

Os tratamentos de higienização foram pautados por critérios diferenciados de acordo com as particularidades técnicas, materiais e visuais das áreas tratadas, tendo

Figura 1. Berlinda de aparato do imperador D. Pedro II: visão geral (a, b), detalhes internos (c, d), roda (e, f) e detalhes externos (g, h). Antes da restauração (a, c, e, g) e após restauração (b, d, f, h).

em vista a busca de sua leitura com a preocupação de resguardar, sempre que possível, as marcas do tempo. Foi feita a higienização de cada elemento têxtil, dos bordados em fios metálicos e da estrutura em madeira que compõe a berlinda de aparato de D. Pedro II, como representado na Figura 2.

A policromia cor de cana dos elementos em madeira das rodas, suspensão, alçados e timão apresentou uma crosta acentuada de poeira e sujidades que comprometem visualmente seu aspecto, uma vez que os filetes ficam praticamente encobertos. A limpeza tem o objetivo de resgatar sua aparência visual, deixando à mostra os filetes, importantes para a questão da legibilidade.

Os ornatos dourados em madeira e metal foram limpos com a finalidade de remover as sujidades e retirar partes degradadas de verniz, uma vez que comprometem visualmente o aspecto dourado que também é importante no contexto da peça. O verniz não é original, tendo sido aplicado em uma intervenção realizada em 1975. No entanto, a limpeza foi controlada mantendo-se, nas reentrâncias, vestígios de pátina de modo a evidenciar o ouro sem dar o aspecto de novo.

A limpeza dos ferros dourados busca retirar partes oxidadas e impermeabilização, realizadas pontualmente, uma vez que várias partes estavam oxidadas e com perda de douramento.

Figura 2. Desmonte de partes da berlinda (a) e higienização mecânica (b)

O verniz aplicado sobre as armas imperiais pintadas nos flancos da caixa, intervenção datada de 1975, foi removido porque se encontrava degradado alterando cromaticamente os elementos representados, sobretudo os mantos verdes, que se tornaram muito escuros, quase pretos.

Reintegração de partes da berlinda, descolamentos, escoriações e desgastes

A parte mais comprometida e delicada dos tecidos referia-se aos veludos, cuja cor original, verde, é fortemente associada à simbologia heráldica do imperador e da nação, motivo pelo qual se torna premente sua reintegração.

Os galões largos e estreitos foram tratados com a fixação dos fios metálicos com fios de seda, de forma a favorecer a visualização simbólica e a reintegração cromática e de volume localizada, com pó de veludo, justificada novamente pelo critério histórico, favorecendo a visualização simbólica.

Os descolamentos generalizados das partes em madeira, pintada e dourada, sobretudo das rodas, da suspensão e do timão, foram decorrentes do uso, apresentando-se, quase sempre, associados a escoriações e desgastes. Foram mantidos tais registros, em sua maioria restritos a uma consolidação, fixando-se os descolamentos, reintegrando e obturando, somente as perdas mais acentuadas que estiveram interferindo nas características históricas e funcionais.

Remoção de pinturas sobre pinturas originais perdidas e tingimentos

Outras partes como os couros das correias, dos estribos e da tábua de armar, bem como de duas hastes de sustentação dos estribos superiores da dianteira, também originalmente verdes, foram repintadas de tinta preta. Ao contrário das repinturas anteriores estas foram aplicadas sobre o couro já muito desgastado, tornando-se impossível resgatar a sua cor original. Neste caso optou-se por fazer uma reintegração total, cuja cor fosse a mais próxima possível dos vestígios encontrados. Este critério apoia-se no fato de tratar-se de uma pintura plana, objetivando a proteção dos revestimentos de couro e sem nenhuma conotação artística. Sua reintegração contribuiu igualmente para o resgate de sua legibilidade original. O trabalho em pespontado com linha amarela encoberta pela nova pintura preta, também foi removido, não só pela estética, mas porque seus ornatos referem-se à simbologia heráldica. O tratamento foi muito cuidadoso conjugando-se remoção mecânica com bisturi, e química, utilizando-se um solvente à base de ácido sulfônico e soda cáustica, de maneira pontual para evitar a migração para o couro e recorrendo-se a aquarela para situações pontuais.

As franjas da capa da boléia, completamente esmaecidas, foram tingidas por imersão por serem

Figura 3. Peças metálicas reconstituídas pelo Museu Imperial.

totalmente verdes. Esta coloração, visivelmente nas partes resguardadas da luz, entre as dobras.

Este tratamento foi recomendado com o intuito de resgatar a legibilidade e também pelo estado de conservação das fibras, relativamente favorável, permitindo uma intervenção deste porte.

Reconstituições possíveis e reinserções

Tal procedimento refere-se às peças que se perderam, mas que possuem réplicas por serem elementos pares ou simétricos. Sendo assim, as peças perdidas deixaram referências óbvias de sua aparência formal e material e incluem: maçaneta de prata da portinhola esquerda; extremidade posterior do ornato do timão em prata; pequeno detalhe, em prata, do friso que arremata a caixa, próximo da portinhola direita; arremates de prata dos pinos das dobradiças das portinholas; coroa imperial, em metal dourado, do pavilhão das armas da lateral esquerda da capa da boléia; píttons, em metal, das hastes inferiores dos estores; pináculos do tejadilho.

As perdas implicaram em situações divergentes que indicam critérios e propostas opostas, pró ou contra intervenções reconstituíntes. De qualquer forma, todas as reconstituições realizadas têm a marca do artesão, com a referência de “Museu Imperial/Restauração 2012”, evidenciando não ser uma peça original, e sim uma intervenção restaurativa. Isto foi válido tanto para as peças metálicas, quanto as que foram reproduzidas em couro e tecido. As peças foram reproduzidas obedecendo ao mesmo aspecto formal e dimensões, mas em material diferente; no entanto, visualmente semelhante à prata e ao metal dourado. Detalhes dessas peças podem ser vistos na Figura 3. O único caso de reinserção aplicou-se às quatro lanternas de prata, dos ângulos da caixa, retiradas antes da doação da berlinda ao Museu Imperial e que pertencem atualmente, a colecionadores particulares. Até o momento não foi possível viabilizar a aquisição, ou, recorrermos à confecção de réplicas, de aspecto formal idêntico, mas com características próprias diferenciadas, conforme anteriormente citado.

Não foram encontrados na literatura publicada, trabalhos científicos de monitoramento microbiológico, envolvendo uma peça da envergadura da berlinda de aparato. No entanto, a literatura reporta a ocorrência de fungos associados à biodeterioração do patrimônio cultural numa série de objetos de importância e museológica ou edificações de alto valor histórico [4,5]. O que pode ser observado nos exemplos abaixo é que a ocorrência de micro-organismos nestas peças ou ambientes tem concordância com algumas espécies encontradas no presente trabalho, mostrando que, inequivocamente, a contaminação cruzada se dá do ambiente para as peças/construções, alertando claramente para a necessidade de controle das condições ambientais, quando possível, visando a conservação preventiva para evitar a biodeterioração.

Sabe-se da importância das ferramentas biotecnológicas para a preservação e restauração do patrimônio cultural, mas parece que estas ferramentas não são suficientemente utilizadas neste contexto, devido à uma separação que naturalmente existe entre arte e ciência. Nesse contexto, Rakotonirainy et al. [6] isolaram e fizeram a caracterização biomolecular de fungos associados ao aparecimento de foxing num livro do século XIX. O emprego da biologia molecular nesse aspecto permitiu o sequenciamento de 145 clones, basicamente dos gêneros: *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chaetomium*, *Gloeotinia*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Saccharicola*, *Trichoderma* e *Ulocladium*. Os autores reforçam que muitas dos gêneros isolados são celulolíticos, o que reforça o potencial biodeteriorador.

Gómez-Alarcón et al. [7] identificaram a presença de fungos na Igreja de Carrascosa del Campo (Espanha), os quais apresentavam alta atividade produtora de ácidos orgânicos. Os fungos identificados pertenciam aos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*, os quais exerciam efeitos corrosivos sobre as paredes do monumento, devido à produção de ácidos oxálico, fumárico e succínico.

Herrera e Videla [8] enfatizam que os fatores mais importantes na deterioração de monumentos e construções pertencentes ao patrimônio cultural incluem os processos de biodeterioração, a deterioração atmosférica e a poluição antropogênica. Os autores orientam, assim, que o meio ambiente tem papel decisivo no tipo e extensão dos processos de deterioração a que se sujeita o patrimônio cultural. Os autores informam que os resultados do monitoramento microbiológico foram relacionados com a concentração de poluentes, a fim de se buscar relações sinérgicas entre efeitos atmosféricos e biodeterioração.

Milanesi et al. [9] estudaram a deterioração de natureza fúngica sobre um afresco medieval da *Cappella del Sacro Chiodo*, na cidade de Siena, Itália. Os autores observaram que a identificação genética levou à caracterização do *Penicillium chrysogenum*, provavelmente responsável pelo decréscimo na concentração de carbono, observada pelos autores como sendo de 26 para 13 %. Os autores reportam uma diminuição na concentração de bactérias, provavelmente devido ao aparecimento de cobre sobre o afresco.

Fazio et al. [10] observaram a presença do fungo *Nigrospora* numa escultura de madeira jesuítica, exposta no Museu de Ciências Naturais, indicando que pouco se conhece sua ação sobre a madeira. Esta observação é indicativa da importância de se investigar a biodegradação da madeira/celulose em relação a novas espécies isoladas. O fato da literatura não reportar sua ocorrência como usual nesse tipo de material, não significa que, eventualmente, não tenham ação biodeterioradora.

Konkol et al. [11] alertam para a importância da detecção do crescimento fúngico em peças do patrimônio histórico, em estágios iniciais. Isso servirá de alerta para o emprego de tratamentos de remediação não invasivos, não requerendo intervenções de restauração.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi investigar a população microbiana presente em partes selecionadas da berlinda de aparato do imperador D. Pedro II, durante sua restauração no ano de 2012. Especificamente, pretendeu-se identificar a microbiota presente, por técnicas tradicionais e de biologia molecular, relacionando-a com a encontrada no ambiente de guarda do aparato, subsidiando informações sobre a biodegradabilidade dos seus materiais componentes.

Metodologia

Monitoramento microbiológico do ar

A análise microbiológica do ar do ambiente em torno da berlinda e no seu interior foi realizada através da exposição de placas de Petri com agar Sabouraud contendo cloranfenicol para detecção de fungos e agar Plate Count para detecção de bactérias, após sedimentação espontânea do material em suspensão neste ambiente.

Foram feitas coletas em diversos materiais que compõem a Berlinda através de *swabs*. Em seguida este material foi acondicionado em tubos de ensaios contendo 9 mL de solução salina e conduzidos ao Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO) do Instituto Nacional de Tecnologia. No laboratório foram realizadas seis diluições decimais sendo inoculados 0,1 mL em placa de Petri com agar Sabouraud por meio da técnica de semeadura por espalhamento. Essas placas foram incubadas em BOD a 25 °C por um período máximo de 21 dias. As placas utilizadas no monitoramento do ar também foram incubadas em idênticas condições. Os fungos filamentosos, leveduras e bactérias que cresceram nas placas, foram isolados em meios de cultura seletivos específicos aos micro-organismos alvo. Após seus isolamentos os fungos filamentosos e leveduras foram preservados em óleo mineral e as bactérias foram congeladas a -80 °C.

Identificação de fungos

A identificação dos fungos filamentosos foi realizada através da observação macroscópica e microscópica de sua morfologia. A identificação filogenética foi realizada por biologia molecular, onde a lise celular foi realizada por três ciclos de choque térmico e o DNA extraído com o *kit* comercial Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO, California).

O gene que codifica a região ITS foi amplificado utilizando o conjunto de *primers* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', senso) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', anti-senso). Os produtos de PCR foram purificados utilizando um *kit* específico para este objetivo e depois sequenciados.

As bactérias, após isolamento, foram observadas em microscópio ótico utilizando-se o método de coloração de Gram.

Identificação de bactérias e leveduras

A identificação bacteriana foi realizada por meio de biologia molecular. A partir das linhagens puras, o DNA foi extraído utilizando *kit* comercial para extração de DNA. Após a extração, o gene bacteriano rRNA 16S foi amplificado por PCR utilizando o “primer” universal Sadir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3', senso) e S17 (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3', anti-senso). A identificação das leveduras foi realizada por meio de biologia molecular. A partir das linhagens puras, o DNA foi extraído utilizando *kit* comercial para extração de DNA. O gene que codifica a região ITS foi amplificado utilizando o conjunto de *primers* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3', senso) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', anti-senso). Os produtos de PCR foram purificados utilizando um *kit* específico para este objetivo e depois sequenciados.

Extração de DNA dos fungos

Cada fungo crescido foi retirado por meio de raspagem da placa de Petri, onde se encontrava em crescimento em meio específico para cada espécie, e transferido para um tubo cônico Falcon de 15 mL. O tubo foi colocado em um cilindro contendo nitrogênio líquido por 5 minutos, levado para um banho-maria a 60 °C por 10 minutos e macerado com auxílio de um pistilo. Este procedimento foi repetido por três vezes.

Posteriormente, a extração do DNA foi realizada com *kit* Ultra Clean Soil Isolation (MO BIO Laboratories) e os procedimentos foram realizados de acordo com a especificação do fabricante. O DNA foi eluído em 30 µL da solução fornecida pelo *kit* e quantificado através da leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

Extração de DNA das leveduras e bactérias

As amostras de bactérias e fungos foram retiradas de seus meios específicos por meio de centrifugação durante 10 minutos em 10.000 g de rotação. O *pellet* foi transferido para *eppendorf* de 1,5 mL contendo 400 µL de solução de lise celular contida no *kit* DNA IQ Casework Pro Kit for Maxwell (Promega), posteriormente os tubos foram colocados em banho seco em temperatura de 95 °C por 10 minutos e por fim centrifugado por 2 minutos em 15.000 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para a primeira coluna do *kit* extração mencionado e levado para o extrator automático Maxwell 16 (Promega). O DNA foi eluído ressuspenso em 50 µL da solução fornecida pelo *kit* e quantificado através da leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

Amplificação da região ITS por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit Top Taq Master Mix (Qiagen) num volume final de 50 µL, contendo 0,5 µM de cada iniciador. Os iniciadores utilizados foram: ITS-5 (senso, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS-4 (anti-senso, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para fungos e leveduras e Sadir (senso, 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') e S17 (anti-senso, 5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') para bactérias. As reações de PCR foram realizadas no termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems). O produto da amplificação foi visualizado através de uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1 % em tampão TE 1X.

Sequenciamento do DNA

O DNA dos fungos isolados foi submetido a sequenciamento utilizando o *kit* Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems) com 4 capilares de 50 cm. Os iniciadores ITS-5 (senso) e ITS-4 (anti-senso) foram utilizados para sequenciar a região ($\pm$ 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 produtos da extensão foram purificados através do Kit Big Dye XTerminator Purification, para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Após a purificação, os produtos foram eletroinjetados no sequenciador.

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 [12] para a análise da similaridade através da ferramenta *BLASTn* (*Basic Alignment Search Tool*), disponível no próprio site do NCBI, sendo que apenas os fragmentos com similaridade acima de 98 % são consideradas confiáveis e anotadas. O procedimento adotado para a identificação de fungos contaminantes do ambiente e da berlinda de aparato do imperador D. Pedro II encontra-se apresentado na Figura 4. Já com relação à identificação filogenética dos fungos contaminantes o procedimento seguiu o protocolo apresentado na Figura 5. A Figura 6 apresenta um exemplo de aplicação das técnicas para observação microscópica e filogenética de fungos contaminantes, utilizando o couro da escada da berlinda de aparato como peça de estudo.

Resultados e discussão

Os resultados do monitoramento microbiológico feito encontram-se apresentados na Tabela 1.

O monitoramento microbiológico permitiu concluir pela predominância de contaminação fúngica das partes selecionadas, em detrimento das bactérias e leveduras. Apenas uma levedura foi isolada, *Candida atlantica*, a qual não apresenta muita informação relacionada à sua ocorrência na literatura publicada, ficando-se restrito a informações relacionadas à taxonomia e classificação [15]. Com relação às bactérias, foram isoladas quatro espécies: *Microbacterium oleivorans*, *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* e

Figura 4. Representação esquemática dos procedimentos genéricos adotados para identificação dos fungos contaminantes do ambiente e da berlinda.

Figura 5. Procedimentos para identificação filogenética de fungos contaminantes do ambiente e da berlinda.

Bacillus pumilus. Com exceção da espécie *M. oleivorans*, tipicamente encontrada em óleos crus, todas as demais espécies são típicas do solo, facilmente explicando sua presença num objeto da natureza da berlinda. A distribuição das várias espécies pelas diferentes zonas da berlinda está registada na Tabela 1, que dá conta de uma grande diversidade.

A parte mais difícil da investigação foi relacionar as espécies encontradas com as partes de onde foram isoladas

e sua correlação com seus *habitats* típicos, explicando, assim, as possíveis contaminações cruzadas e ocorrências.

A espécie *Aspergillus caesiellus*, por exemplo, foi isolada do acabamento dos puxadores da berlinda, sendo, entretanto, sua ocorrência típica em solos quentes e cereais; essa espécie é tipicamente associada à deterioração de vegetação, o que pode ser facilmente correlacionado com sua ocorrência em peças de madeira. Cabe, no entanto, indicar como essa espécie foi isolada do puxador da peça,

Figura 6. Exemplo de aplicação das técnicas para observação microscópica e filogenética de fungos contaminantes do couro da escada da berlinda.

Tabela 1

Espécies fúngicas isoladas de partes da berlinda, do ar interior e do ambiente externo da área de guarda

Espécie	Quantidade	Local
<i>Aspergillus caesiellus</i>	1	Acabamento dos puxadores
<i>Aspergillus flavus</i>	2	Ar (40 min dentro da berlinda)
<i>Aspergillus sp.</i>	1	Ar (1 h fora da berlinda)
<i>Bipolaris sp.*</i>	1	Ar (1 h fora da berlinda)
<i>Cerebella andropogonis*</i>	2	Ar (1 h fora da berlinda) Ar (1 h dentro da berlinda)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4	Ar (1 h dentro da berlinda) Ar (40 min fora da berlinda) Couro da escada da berlinda Crina do encosto (lavada)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1	Couro da escada
<i>Cladosporium sp.</i>	3	Ar (40 min fora da berlinda) Crina do encosto (não lavada) Veludo
<i>Epicoccum nigrum*</i>	1	Ar (1h dentro da berlinda)
<i>Hamigera fusca*</i>	4	Teto Crina do encosto (não lavada) Tecido em contato com a crina Botão do capitonê
<i>Leptosphaeria sp.*</i>	1	Ar (1 h dentro da berlinda)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	Crina do encosto (lavada)
<i>Penicillium citrinum</i>	1	Ar (40 min fora da berlinda)
<i>Penicillium copticola</i>	1	Crina do encosto (não lavada)
<i>Penicillium italicum</i>	1	Couro da escada
<i>Penicillium olsoni</i>	1	Vidro da frente da berlinda
<i>Penicillium sp.</i>	2	Ar (40 min fora da berlinda) Veludo
<i>Penicillium steckii</i>	1	Ar (1 h fora da berlinda)
<i>Pestalotiopsis neglecta*</i>	1	Ar (1 h dentro da berlinda)
<i>Pestalotiopsis maculiformans*</i>	1	Ar (1 h dentro da berlinda)
<i>Phoma sp.</i>	1	Ar (40 min fora da berlinda)
<i>Pseudocercospora norchiensis*</i>	1	Ar (40 min dentro da berlinda)
<i>Trichoderma atroviride</i>	1	Ar (40 min fora da berlinda)
<i>Trichoderma viride</i>	1	Ar (40 min fora da berlinda)
<i>Xylaria sp.*</i>	1	Ar (1 h dentro da berlinda)

*Espécies não relacionadas na base de dados do Centre de Recherche sur la Conservation des Collections como espécies típicas de contaminação do patrimônio cultural [14]

uma vez que apresenta ocorrência típica tão diversa da peça de onde foi isolada [16]. Já a espécie *Aspergillus flavus*, isolada do ar interior da berlinda, é de ocorrência comum em madeira, couro, papel e poeira atmosférica,

sendo, portanto, uma espécie de ocorrência previsível no ambiente de guarda da berlinda, assim como o *Aspergillus sp.* encontrado no ambiente externo da berlinda [17].

O gênero *Bipolaris*, isolado do ar exterior da berlinda, foi identificado por van Tieghem em 1876, sendo um fungo cosmopolita, filamentosos e de ocorrência típica no solo e em resíduos de plantas. Algumas espécies são patogênicas: *Bipolaris spicifera*, *Bipolaris australiensis* e *Bipolaris hawaiiensis*, apresentando um amplo espectro de ações, incluindo alergias e infecções de várias naturezas [18].

A espécie *Cladosporium cladosporioides* foi isolada do ar interior e exterior à berlinda, além do couro da escada e da crina de cavalo que compõe o encosto da berlinda. Essa espécie é cosmopolita, sendo muito comum em todo o mundo, tendo sido isolada do ar, solo, produtos têxteis, alimentos e sementes. Mesmo nos ambientes domésticos é de ocorrência usual. É uma espécie associada à decomposição de material vegetal, ninhos de aves e penas, papel, madeira e poeira atmosférica, indicando, dessa forma um potencial de degradação das peças onde coloniza. Strzelczyk et al. [19] confirmam a fácil contaminação fúngica de couros não tratados, conforme observado no presente trabalho. O mesmo comentário pode ser feito para a espécie *Cladosporium sphaerospermum* e para o *Cladosporium* sp.. A espécie *Epicoccum nigrum* constitui-se num saprófita cosmopolita, de distribuição mundial, tendo sido isolado do ar interior da berlinda.

O que se observa, em linhas gerais, é que os fungos isolados do ar e de partes selecionadas da berlinda têm, na sua maioria, ocorrência cosmopolita, o que os torna comuns do ponto de vista da aerobiologia. No entanto, cabe investigar aqueles que não são de ocorrência comum, a fim de se verificar o potencial biodeteriorante que possam apresentar em contato com a berlinda de aparato.

Seves et al. [20] reportam a dificuldade de crescimento de espécies fúngicas e bacterianas em telas para pintura. Os autores reportam que materiais têxteis não se mostram, a princípio, como um substrato fácil para crescimento microbiano. No entanto, os micro-organismos permanecem viáveis por um tempo muito longo, desenvolvendo, posteriormente atividade hidrolítica sobre a celulose e proteínas.

A fim de facilitar este tipo de avaliação dos resultados e para que a discussão das espécies isoladas não se torne enfadonha, procurou-se utilizar como referência a base de dados do Centre de Recherche sur la Conservation des Collections [14], que relaciona os fungos típicos das contaminações do patrimônio cultural com suas possíveis ocorrências. Dessa forma, torna-se mais fácil buscar uma associação entre contaminação ambiental e ocorrência de espécies em partes selecionadas da berlinda e potenciais ocorrências de natureza biodeteriorante.

As espécies que foram isoladas do ar e que não constam como típicas de contaminações do patrimônio cultural foram: *Bipolaris* sp., *Cerebella andropogonis*, *Epicoccum nigrum*, *Leptosphaeria* sp., *Pestalotiopsis neglecta*, *Pestalotiopsis maculiformans*, *Pseudocercospora norchiensis* e *Xylaria* sp.. Além disso, a espécie *Hamigera fusca* foi isolada do teto da berlinda, da crina não lavada

do encosto da berlinda e do botão do capitonê. Em termos gerais, pode-se dizer que praticamente todos os fungos atípicos de contaminação do patrimônio cultural foram encontrados no ar. No entanto, apresentam uma particularidade: foram isolados do ar interior da berlinda, indicando uma colonização preferencial no interior da peça, independente da possibilidade de terem vindo do ar exterior para o interior da berlinda. Cabe avaliar, em relação a essas espécies (ou mesmo gêneros), as informações disponíveis sobre suas ocorrências e conteúdos enzimáticos com potencial biodeteriorante.

Os fungos do gênero *Bipolaris* causam danos em plantas, particularmente dália (planta típica da região serrana, onde se localiza a berlinda), em regiões tropicais, muito embora estes fungos sejam cosmopolitas. A dispersão destes fungos ocorre prioritariamente devido à ação do vento e através de sementes e mudas infectadas. Além disso, em pequenas distâncias, gotas de chuva e/ou irrigação podem servir como meio de transporte aos esporos, sendo as condições favoráveis ao desenvolvimento destes fungos temperaturas amenas associadas à alta umidade relativa do ar e molhamento frequentes [21]. Embora haja uma grande diversidade dentro do gênero, as espécies típicas são produtoras de celulase e protease, o que sinaliza para a possibilidade de ataque à berlinda, sob condições adequadas.

A espécie *Cerebella andropogonis*, encontrada no ar interior e exterior à berlinda, apresenta-se como uma espécie cosmopolita de ocorrência comum na América do Sul [22]. Não foram encontrados relatos sobre sua ação na biodeterioração do patrimônio cultural, sendo, fundamentalmente de natureza patogênica para as plantas que coloniza. Dessa forma, pode-se inferir sobre o fato de apresentar atividade celulolítica, o que seria, a princípio, potencialmente perigoso caso as condições ambientais favorecessem sua infestação em partes da berlinda contendo celulose.

Araújo et al. [23] estudaram a caracterização morfológica e enzimática de fungos do gênero *Epicoccum* e observaram que este gênero é produtor de pectinase e quitinase, o que indica a possibilidade de ataque, por exemplo, à crina de cavalo que compõe o encosto da berlinda.

O gênero *Leptosphaeria* é um colonizador típico de plantas, onde produz toxinas e enzimas degradativas, caracterizando sua ação parasítico-necrotrófica. Caracteriza-se por um elevado nível de plasticidade em termos de aquisição de nutrientes, o que o torna um potencial agente biodeteriorante [24].

No Brasil as espécies do gênero *Pestalotiopsis* se acham registradas em quase todos os estados. Considerado um fungo cosmopolita, o gênero *Pestalotiopsis* pode ser encontrado como fitopatógeno e endofítico. Seus esporos são de fácil disseminação, e penetram nos tecidos vegetais por ferimentos ou aberturas naturais, infectando os mais diversos hospedeiros botânicos [25].

Rosa e Menezes [26] caracterizaram espécies de *Pseudocercospora* objetivando sua diferenciação. Os autores indicam a ocorrência das espécies em bananeiras, pelo desenvolvimento de cercosporiose da bananeira, doença típica desta planta. Mais uma vez, um fungo isolado no interior da berlinda apresenta-se com uma espécie de potencial celulolítico em função da sua colonização típica.

Já o fungo *Xylaria* é tipicamente um degradador da madeira, requerendo particular atenção no que diz respeito à sua presença no ar e possível contaminação cruzada na berlinda [27].

Por último, o gênero *Hamigera* é tipicamente encontrado em solos e em componentes têxteis, sendo muitas vezes confundido morfológicamente com o gênero *Penicillium*. Tendo sido encontrado no teto da berlinda, na crina não lavada do encosto da berlinda e no botão do capitonê, sua diversidade de colonização sinaliza para seu potencial biodegradador de partes da peça [28]. Sánchez-Piñero et al. [29] confirmam a necessidade de se investigar espécies atípicas em peças e obras do patrimônio histórico, por se tratarem estes de substratos de natureza não-convencional, portanto, de potencial desconhecido.

Ranalli et al. [30] publicaram uma extensa revisão sobre a biodeterioração do patrimônio cultural sobre matrizes inorgânicas, orgânicas e compostas, concluindo que informações básicas sobre os organismos associados deve ser investigada a fim de direcionar o problema da biodeterioração para o estabelecimento de práticas ideais de preservação.

Conclusão

Pode-se concluir que a ciência, em particular nas áreas multidisciplinares, deve ter um papel chave na proteção e conservação do patrimônio cultural da humanidade, usualmente de natureza frágil, para as gerações futuras. Essa meta é particularmente difícil de ser atingida devido ao tamanho e diversidade de objetos envolvidos, bem como à enorme variedade de materiais constitutivos. Cabe ressaltar, que o patrimônio cultural muitas vezes está intrinsecamente relacionado à ocorrência de materiais vegetais e de natureza animal.

Para finalizar, Capodicasa et al. [31] alertam para uma questão crucial na conservação de obras do patrimônio cultural: as condições ambientais têm que ser rigorosamente monitoradas e corrigidas, uma vez que são elas as responsáveis pela transformação de um estado de dormência microbiana para um estado de intensa atividade metabólica.

Conclui-se, do presente trabalho, que a biologia molecular associada às técnicas clássicas de identificação microbiológica permitiram identificar uma vasta população fúngica em partes selecionadas da berlinda do imperador D. Pedro II. Apesar de suas naturezas cosmopolitas, praticamente todos os fungos (e potencialmente algumas bactérias) apresentam elevado potencial biodeteriorador,

devido à presença de enzimas celulolíticas e proteolíticas, as quais, embora não quantificadas no presente trabalho, são reportadas na literatura como produzidas por essas espécies ou gêneros microbianos. Dessa forma, os estudos conduzidos no âmbito da Aerobiologia permitiram direcionar o procedimento de restauração de um importante objeto museológico, em particular com claras orientações para a avaliação do espaço de guarda da berlinda, o qual deve ser, tanto quanto possível, isolado dessas espécies microbianas.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer pelo suporte dado pela GE Celma para a restauração da berlinda de aparato, bem como ao CNPq e à FAPERJ pelo suporte à pesquisa.

Referências

- 1 Ministério de Instrução Pública, Governo da Itália, Carta do Restauro, Circular 117 de 6 de abril de 1972.
- 2 Brandi, C., *Teoria del Restauro*, Einaudi, Turim (2000).
- 3 Museu Imperial de Petrópolis, <http://www.museuimperial.gov.br/conservacao-restauracao.html> (acesso em 20-2-2013).
- 4 Sterflinger, K., 'Fungi: their role in deterioration of cultural heritage', *Fungal Biology Reviews* **24** (2010) 47-55. [crossref](#)
- 5 Szaeapanowska, H.; Cavaliere A. R., 'Fungal deterioration of 18th and 19th century documents: A case study of the Tilghman Family Collection, Wye House, Easton. Maryland', *International Biodeterioration & Biodegradation* **46** (2000) 245-249. [crossref](#)
- 6 Rakotonirainy, M. S.; Heude, E.; Lavédrine, B., 'Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book', *Journal of Cultural Heritage* **8** (2010) 126-133. [crossref](#)
- 7 Gómez-Alarcón, G.; Muñoz, M. L.; Flores, M., 'Excretion of organic acids by fungal strains isolated from decayed sandstone', *International Biodeterioration & Biodegradation* **34** (1994) 169-180. [crossref](#)
- 8 Herrera, L. K.; Videla, H. A., 'The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials', *International Biodeterioration & Biodegradation* **54** (2004) 125-134. [crossref](#)
- 9 Milanesi, C.; Baldi, F.; Vignani, R.; Ciampolini, F.; Falieri, C.; Cresti, M., 'Fungal deterioration of medieval wall fresco determined by analysing small fragments containing copper', *International Biodeterioration & Biodegradation* **57** (2006) 7-13. [crossref](#)
- 10 Fazio, A. T.; Papinutti, L.; Gómez, B. A.; Parera, S.D.; Romero, A. R.; Siracusano, G.; Maier, M. S., 'Fungal deterioration of a Jesuit South American polychrome wood sculpture', *International Biodeterioration & Biodegradation* **64** (2010) 694-701. [crossref](#)
- 11 Konkol, N.; McNamara, C. J.; Mitchell, R., 'Fluorometric detection and estimation of fungal biomass on cultural heritage materials', *Journal of Microbiological Methods* **80** (2010) 178-182. [crossref](#)
- 12 Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (acesso em 12-1-2013).
- 13 Lutterbach, M. T. S.; Galvão, M. M., 'Fuel for the future biodiesel', in *Applied Microbiology and Molecular Biology*

in *Oilfield Systems*, ed. E. Whitby e T. L. Skovhus, Springer, Heidelberg (2011) 229-235. **crossref**

- 14 *Mycota – Fungal contaminants of cultural heritage*, <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/resultRechEspece.php?mots=penicillium&lang=eng> (acesso em 12-02-2013).
- 15 Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, <http://www.cbs.knaw.nl> (acesso em 2-5-2013).
- 16 Caltex Mold Services, http://www.caltexmoldservices.com/section/mold_library/aspergillus/aspergillus_caesiellus/ (acesso em 4-5-2013).
- 17 *Mycota – Fungal contaminants of cultural heritage*, <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/accueil.php?lang=eng> (acesso em 4-5-2013).
- 18 Doctor Fungus, <http://www.doctorfungus.org/thefungi/bipolaris.php> (acesso em 9-5-2013).
- 19 Strzelczyk, A. B.; Bannach, L.; Kurowska, A., 'Biodeterioration of archeological leather', *International Biodeterioration & Biodegradation* **39** (1997) 301-309. **crossref**
- 20 Seves, A. M.; Sora, S.; Ciferri, O., 'The microbial colonization of oil paintings. A laboratory investigation', *International Biodeterioration & Biodegradation* **37** (1996) 215-224. **crossref**
- 21 Instituto Federal Goiano, *Aspectos gerais e morfológicos de bipolaris sp.*, http://fitopatologia1.blogspot.com.br/2010/11/descricao-micologica-aspectos-gerais-e_09.html (acesso em 4-3-2013)
- 22 Rodríguez Hernández, M., Minter, D. W., Castañeda Ruíz, R. F., *Cerebella andropogonis*, Descriptions of Fungi and Bacteria, CABI Bioscience, <http://www.cabi.org/dfb/?loadmodule=review&page=4048&reviewid=10591&site=159> (acesso em 4-4-2013).
- 23 Araújo, L. G.; Sena, A. P. A.; Chaibub, A. A.; Côrtes, M. V. C. B.; Filippi, M. C. C., 45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia - Manaus, AM, *Tropical Plant Pathology* **38** (Suplemento) (2012).
- 24 Genoscope – Centre National de Séquençage, *Leptosphaeria maculans*, <http://www.cns.fr/spip/-Leptosphaeria-maculans-.html> (acesso em 4-4-2013).
- 25 Kruschewsky, M. C., 'Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a mata atlântica do sul da Bahia', dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz (2010).
- 26 Rosa, R. C. T.; Menezes, M., 'Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*', *Fitopatologia Brasileira* **26**(2) (2001) 141-147. **crossref**
- 27 Fonseca, M. D. P., 'Produção de enzimas oxidativas por fungos amazônicos degradadores de madeira', dissertação de mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Universidade do Estado do Amazonas (2009).
- 28 Peterson, S. W.; Jurjevic, Z.; Bills, G.F.; Stchigel, A. M.; Guarro, J.; Vega, F. E., 'Genus *Hamigera*, six new species and multilocus DNA sequence based phylogeny', *Mycologia*, **102**(4) (2010) 847-864. **crossref**
- 29 Sánchez-Piñero, F.; Bolívar, F. C., 'Indirect effects of a non-target species, *Pyrrhalta luteola* (Chrysomelidae) on the biodeterioration of Brussels tapestries', *International Biodeterioration & Biodegradation* **54** (2004) 297-302. **crossref**
- 30 Ranalli, G., Zanardini, E., Sorlini, C., 'Biodeterioration – Including cultural heritage', in *Encyclopedia of Microbiology*, ed. M. Schaechter, 3rd ed., Academic Press, New York (2009), 191-205. **crossref**
- 31 Capodicasa, S.; Fedi, S.; Porcelli, A. M.; Zannoni, D., 'The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting', *International Biodeterioration & Biodegradation* **64** (2010) 727-733. **crossref**

Recebido: 27 de Maio de 2013

Revisto: 12 de Julho de 2013

Aceite: 12 de Julho de 2013

Online: 22 de Julho de 2013