

Biodeterioração de pinturas de cavalete: desenvolvimento de novas estratégias de mitigação

Cátia Salvador¹

Mara Silva^{1,2}

Tânia Rosado¹

Rita Vaz Freire¹

Rui Bordalo¹

António Candeias^{1,2}

Ana Teresa Caldeira^{1,2,*}

¹ Laboratório HERCULES, Universidade de Évora, Évora, Portugal

² Departamento Química, Escola de Ciências e Tecnologia; Universidade de Évora, Évora, Portugal

* atc@uevora.pt

Resumo

As pinturas de cavalete têm sido alvo de biodeterioração devido à proliferação de agentes microbiológicos, em particular a propagação de estirpes fúngicas, estando estas associadas à formação de biofilmes e desintegração da microestrutura destas obras de arte, atendendo à enorme diversidade de nutrientes aí presentes. Assim, estratégias de mitigação, utilizando biocidas ecológicos e não tóxicos, que eliminem e previnam a contaminação microbiológica destes bens patrimoniais encontram-se em desenvolvimento.

Palavras-chave

Biodeterioração
Pintura de cavalete
Estratégias de mitigação
Biocidas naturais

Biodeterioration of easel paintings: development of new mitigation strategies

Abstract

Easel paintings have undergone biodeterioration processes due to microbiological agents proliferation, particularly by development of fungal strains that are associated to biofilms formation and microstructure disintegration of these artworks, due to a wide diversity of available nutrients. Thus, mitigation strategies, using green and non-toxic biocides, which eliminate and prevent the microbiological contamination of these cultural assets are in progress.

Keywords

Biodeterioration
Easel painting
Mitigation strategies
Natural biocides

Introdução

A ação dos microrganismos sobre algumas obras de arte tem desencadeado inúmeros estudos para identificação dos principais agentes biodeteriogénicos [1-8]. Nos últimos anos, o estudo dos fenómenos de biodeterioração tem revolucionado o conhecimento dos agentes que provocam a destruição de bens patrimoniais, dando-se especial destaque aos agentes biológicos face aos fenómenos físicos e químicos, até então mais explorados [8]. Relativamente aos microrganismos associados ao fenómeno da biodeterioração, bactérias, leveduras, algas e fungos filamentosos são os principais agentes biológicos associados à alteração de obras de arte, cujo desenvolvimento e atividade metabólica estão intimamente correlacionados com o seu estado de alteração [4, 9]. Desta forma, o papel dos microrganismos tem-se mostrado uma questão relevante para a conservação e preservação do património cultural, sendo necessárias respostas urgentes que promovam a sua reabilitação.

De forma a encontrar soluções efetivas para o controlo da proliferação microbiológica em bens patrimoniais, processos remediativos baseados na utilização de biocidas têm sido aplicados, no entanto o cariz tóxico de alguns compostos comerciais inviabiliza a sua aplicação [10]. Assim, algumas soluções inovadoras e alternativas têm sido testadas pelo nosso grupo de investigação, baseadas na produção e desenvolvimento de biocidas, obtidos por via biotecnológica, usando estirpes de *Bacillus* sp. com capacidade para produzir metabolitos secundários que apresentam propriedades antimicrobianas, podendo ser utilizados contra fungos filamentosos biodeteriogénicos presentes em bens patrimoniais [11-13].

As pinturas de cavalete possuem uma variedade de componentes orgânicos, nomeadamente compostos proteicos, utilizados como aditivos (aglutinantes e ligantes) e materiais de suporte (madeira, tela, pergaminho), que estão facilmente sujeitos a proliferação de diversos microrganismos, induzindo a biodeterioração destas obras de arte. Esta interação pode promover danos estéticos e estruturais como, descoloração, formação de biofilmes ou manchas na superfície da pintura, degradação dos materiais de suporte e polímeros utilizados como ligantes, resultando na formação de fissuras e/ou destacamento das camadas superficiais [14].

Para este estudo foram selecionadas pinturas de cavalete com sinais evidentes de biodeterioração por fungos filamentosos. Estas pinturas foram produzidas por Giorgio Marini (1836-1905), pintor Italiano de Florença que se fixou em Portugal no final da sua vida, sendo reconhecido como retratista de excelência, bem como pela pintura de paisagens, cenas históricas e religiosas, e produção de daguerreótipos, sendo por isso pertinente a preservação das suas obras.

O principal objetivo do estudo foi detetar, identificar e caracterizar morfológicamente os agentes microbiológicos envolvidos na alteração destas pinturas, bem como o

desenvolvimento de estratégias de mitigação para uma possível aplicação *in situ*, a conjugar na intervenção de conservação e restauro.

Metodologia

Amostragem

Foram recolhidos biofilmes fúngicos de quatro obras do pintor Giorgio Marini (século XIX, décadas de 80-90) com evidentes sinais de degradação. Uma das obras pertence ao Museu de Évora e as outras três são de coleções particulares.

O processo de amostragem (Figura 1) obedeceu aos requisitos de conservação e minimização do impacto estrutural e estético da obra de arte, recolhendo-se a quantidade mínima necessária para os ensaios. Foram usados métodos não-invasivos utilizando zaragatoas estéreis, para a caracterização da população fúngica cultivável (28 amostras da frente e do verso dos quadros) e métodos semi-invasivos, recolhendo oito microfragmentos para microtubos estéreis, para avaliação direta dos biofilmes superficiais. As amostras foram transportadas e conservadas em MRD (*Maximum Recovery Diluent*) a 4 °C.

Deteção de contaminação microbiológica

Os microfragmentos recolhidos de locais biodeteriorados, foram analisados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) com espectrómetro de raios X acoplado (SEM-EDS). As amostras foram colocadas sobre uma fita de carbono, e metalizadas com plasma de ouro (Balzers Union SCD030), durante 30 s. As amostras foram observadas no microscópio eletrónico de varrimento (Hitachi 3700N), em alto vácuo, com uma voltagem de aceleração de 10-20 kV. A análise química foi efetuada usando o mesmo microscópio e sem qualquer preparação prévia das amostras.

Isolamento e caracterização da população cultivável

As amostras recolhidas através de zaragatoa foram inoculadas asépticamente em diferentes meios de cultura, específicos para diversos nichos ecológicos: NA (*Nutrient Agar*), MEA (*Malt Extract Agar*) e CRB (*Cook Rose Bengal*). As culturas foram incubadas a 30 °C durante 24-48 h, e, durante 5-7 dias a 28 °C para crescimento de bactérias e fungos, respetivamente. Repicagens sucessivas das diferentes colónias desenvolvidas foram efetuadas até obtenção de culturas puras. A identificação dos isolados microbiológicos baseou-se nas características macroscópicas e microscópicas, tais como, textura e coloração das colónias, morfologia das hifas e estruturas reprodutoras [15]. Preparações temporárias foram coradas com azul de metileno e observadas no microscópio ótico



Figura 1. Pinturas de cavalete de Giorgio Marini com evidentes sinais de proliferação microbológica.

(Motic BA410E) e as imagens adquiridas com câmara fotográfica MoticamPro 282B.

Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos diferentes isolados das pinturas foi efetuada em ensaios de difusão em meio sólido [16-17].

Utilizaram-se dois biocidas comerciais (NEW DES, 4-(2-feniletóxi)-quinazolina, e Panacide, diclorofeno), como controlo positivo, e compostos bioativos naturais

Conservar Património **23** (2016)

(CB), produzidos por via biotecnológica [12-13], a partir de culturas em meio líquido de estirpes de *Bacillus amyloliquefaciens* CCM 11051 (GenBank: AY785773) previamente selecionadas.

Resultados e discussão

O estudo microbiológico das pinturas de cavalete de Giorgio Marini teve como objetivo detetar a presença dos agentes fúngicos biodeteriogénicos e definir estratégias

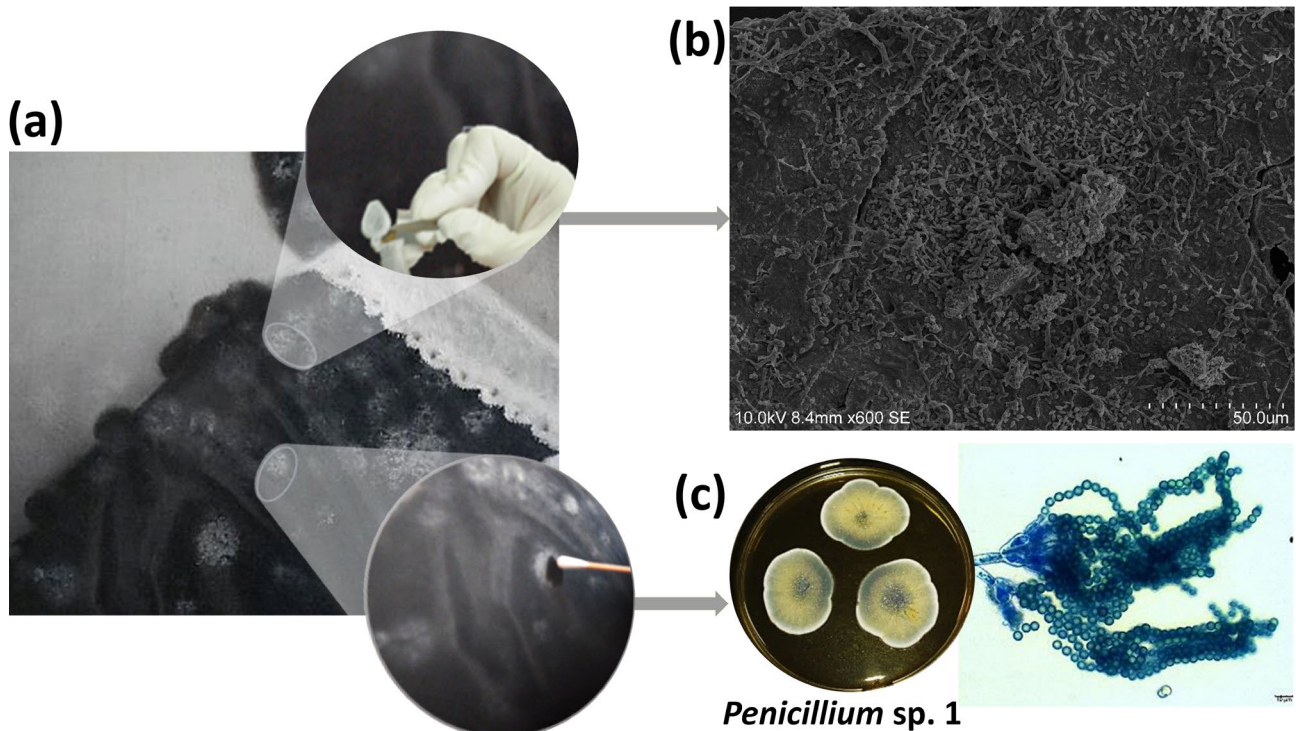


Figura 2. Zona de pintura de cavalete de Giorgio Marini evidenciando o processo de amostragem (a), que permitiu a deteção de proliferação fúngica por análise SEM-EDS (b) e a identificação das estirpes fúngicas que colonizam estas pinturas, maioritariamente fungos do género *Penicillium* (c).

efetivas e ecológicas para mitigar as estirpes responsáveis pelas alterações encontradas nestas pinturas.

As pinturas em estudo apresentavam visíveis sinais de alteração, sendo o desenvolvimento de biofilmes à superfície bastante evidente, parecendo estar relacionado com as alterações estéticas (Figura 2a) observadas. A análise por SEM-EDS de microfragmentos provenientes dessas zonas permitiu visualizar a proliferação de hifas e esporos fúngicos sobre a pintura, mostrando uma elevada densidade celular (Figura 2b) nas zonas de maior alteração. De facto, os fungos filamentosos, com a proliferação das suas hifas pela microestrutura das camadas pictóricas podem constituir um fator determinante de degradação estrutural das pinturas [18-23], cujo controlo deve ser contemplado aquando da intervenção destas obras de arte.

A abordagem microbiológica permitiu isolar 22 fungos filamentosos. As estirpes fúngicas isoladas pertencem aos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Mucor*, mostrando-se estas pinturas maioritariamente contaminadas por fungos do género *Penicillium* (Figura 2c).

Os danos estéticos e estruturais observados nestas pinturas parecem estar intimamente correlacionados com a presença de contaminação microbiológica, encontrando-se nos locais com maior índice de alteração uma elevada concentração de fungos filamentosos. Assim, a obtenção de culturas puras das estirpes fúngicas que proliferam nestas pinturas, permitiu delinear estudos de simulação, com elevadas densidades celulares, com o intuito de

desenvolver estratégias de mitigação que permitam a inibição destas estirpes, e por conseguinte a preservação das obras de arte.

Os ensaios de atividade antifúngica foram efetuados com dois compostos comerciais (Panacide e NEW DES) e novos compostos bioativos de origem natural (CB) produzidos no nosso laboratório. Estes ensaios (Tabela 1) mostraram que o composto comercial Panacide e o composto natural CB apresentam um maior espetro de ação do que o composto NEW DES [24-25], o qual revelou ser pouco eficaz para a maioria das estirpes isoladas. CB revelou uma maior capacidade para inibir o crescimento de todos os isolados fúngicos, apresentando em alguns casos halos de inibição superiores a 26 mm (*Penicillium* e *Mucor*) parecendo constituir uma boa alternativa na mitigação dos agentes fúngicos biodeteriogénicos destas pinturas.

Desta forma, os compostos bioativos naturais mostraram ser mais efetivos que os biocidas comerciais testados, inibindo o crescimento de todas as estirpes fúngicas isoladas e aparentemente responsáveis pelas patologias observadas nas pinturas de cavalete de Giorgio Marini em estudo.

Para além da efetividade para inibir o crescimento fúngico, estudos de toxicidade *in vivo* efetuados anteriormente ao princípio ativo destes biocidas revelaram ausência de toxicidade em diferentes modelos biológicos [16], apresentando-se como potenciais compostos a ser utilizados na salvaguarda da Herança Cultural.

Tabela 1

Atividade antifúngica de diferentes biocidas contra as estirpes fúngicas isoladas

Microrganismos	Halo de inibição*		
	Panacide	NEW DES	CB
<i>Penicillium</i> sp.1	+++	-	++++
<i>Penicillium</i> sp.2	++++	+++	++++
<i>Penicillium</i> sp.3	++	-	+++
<i>Penicillium</i> sp.4	++	-	++++
<i>Penicillium</i> sp.5	+++	+	+++
<i>Penicillium</i> sp.6	++	++	++++
<i>Aspergillus</i> sp.1	++	-	+++
<i>Aspergillus</i> sp.2	+++	++	+++
<i>Cladosporium</i> sp.1	+++	-	+++
<i>Mucor</i> sp.1	++++	+++	++++

*Sem inibição: -; ≤14 mm: +; 15-19 mm: ++; 20-25 mm: +++; ≥26 mm: ++++.

Considerações finais

A vasta incidência de contaminação microbiológica nas pinturas de cavalete em estudo necessita de intervenção imediata. A elevada capacidade de inibição do desenvolvimento de fungos filamentosos pelos compostos bioativos CB, sugere que estes biocidas poderão vir a constituir uma alternativa eficaz, natural e *ecofriendly*, propondo-se futuramente a sua implementação em estratégias de intervenção de conservação e restauro destas obras de arte.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos projetos “HIT3CH – HERCULES Interface for Technology Transfer and Teaming in Cultural Heritage” (ref. ALT20-03-0246-FEDER-000004) e “MEDUSA – Microorganisms Monitoring and Mitigation – Developing and Unlocking Novel Sustainable Approaches” (ref. ALT20-03-0145-FEDER-000015), co-financiados pela União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, enquadrado no ALENTEJO 2020 (Programa Operacional Regional do Alentejo).

Referências

- Rosado, T.; Gil, M.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., ‘Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms – A comprehensive study’, *International Biodeterioration & Biodegradation* **85** (2013) 1-7, doi:10.1016/j.ibiod.2013.06.013.
- Rosado, T.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., ‘Microbial communities analysis assessed by pyrosequencing - a new approach applied to conservation state studies of

- mural paintings’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**(3) (2014) 887-95, doi:10.1007/s00216-013-7516-7.
- Nugari, M. P.; Pietrini, A. M.; Caneva, G.; Imperi, F.; Visca, P., ‘Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy)’, *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**(6) (2009) 705-711, doi:10.1016/j.ibiod.2009.03.013.
- Pangallo, D.; Chovanová, K.; Simonovicová, A.; Ferienc, P., ‘Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing’, *Canadian Journal of Microbiology* **55** (2009) 277-287, doi:10.1139/w08-136.
- Pepe, O.; Palomba, S.; Sannino, L.; Blaiotta, G.; Ventorino, V.; Moschetti, G.; Villani, F., ‘Characterization in the archaeological excavation site of heterotrophic bacteria and fungi of deteriorated wall painting of Herculaneum in Italy’, *Journal of Environmental Biology* **32** (2011) 241-250.
- Ripka, K.; Denner, E.; Michaelsen, A.; Lubitz, W.; Piñar, G., ‘Molecular characterisation of Halobacillus strains isolated from different medieval wall paintings and building materials in Austria’, *International Biodeterioration & Biodegradation* **58** (3-4) (2006) 124-132, doi:10.1016/j.ibiod.2006.05.004.
- Sarró, M. I.; García, A. M.; Rivalta, V. M.; Moreno, D. A.; Arroyo, I., ‘Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain)’, *Building and Environment* **41**(12) (2006) 1811-1820, doi: 10.1016/j.buildenv.2005.07.029.
- Sterflinger, K., Pinar, G., ‘Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills?’, *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**(22) (2013) 9637-46, doi:10.1007/s00253-013-5283-1.
- Rosado, T.; Martins, M. R.; Pires, M.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., ‘Enzymatic monitorization of mural paintings biodegradation and biodeterioration’, *International Journal of Conservation Science* **4** (2013) 603-612.
- Fonseca, A. J.; Pina, F.; Macedo, M. F.; Leal, N.; Romanowska-Deskins, A.; Laiz, L.; Gómez-Bolea, A.; Saiz-Jimenez, C., ‘Anatase as an alternative application for preventing biodeterioration of mortars: Evaluation and comparison with other biocides’, *International Biodeterioration & Biodegradation* **64**(5) (2010) 388-396, doi:10.1016/j.ibiod.2010.04.006.
- Silva, M.; Silva, S.; Teixeira, D.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., ‘Production of novel biocides for cultural heritage from *Bacillus* sp.’, in *Science, Technology and Cultural Heritage*, ed. M. A. Rogerio-Candelera, CRC Press, London (2014) 223-229.
- Caldeira, A. T.; Feio, S. S.; Arteiro, J. M.; Coelho, A. V.; Roseiro, J. C., ‘Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns’, *Journal of Applied Microbiology* **104**(3) (2008) 808-16, doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03601.x.
- Caldeira, A. T.; Santos Arteiro, J. M.; Coelho, A. V.; Roseiro, J. C., ‘Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051’, *Process Biochemistry* **46**(9) (2011) 1738-1746, doi:10.1016/j.procbio.2011.05.016.
- Salvador, C.; Branco, A.; Fialho, A.; Semedo, M.; Martins, S.; Candeias, M. F.; Candeias, A.; Caldeira, A. T.; Karmali, A., ‘Detection of proteic binders in easel paintings using monoclonal antibodies’, in *Science, Technology and Cultural Heritage*, ed. M. A. Rogerio-Candelera, CRC Press, London (2014) 329-334.
- Domsch, K.; Gams, W.; Anderson, T., *Compendium of Soil Fungi*, vol. 1, Academic Press, London (1980).
- Silva, M.; Salvador, C.; Candeias, M. F.; Teixeira, D.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., ‘Toxicological assessment of

- novel green biocides for Cultural Heritage', *International Journal of Conservation Science* **7**(1) (2016) 223-230.
- 17 Caldeira, A. T.; Vicente, H.; Arteiro, J. M.; Roseiro, J. C.; Neves, J., 'An Artificial intelligence approach to *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051 cultures: application to the production of antifungal compounds', *Bioresource Technology* **102** (2011) 1496-1502, doi:10.1016/j.biortech.2010.07.080.
- 18 Rosado, T.; Gil, M.; Caldeira, A. T.; Martins, M. R.; Dias, C.; Carvalho, L.; Mirão, J.; Candeias, A., 'Material characterization and biodegradation assessment of mural paintings: Renaissance frescoes from Santo Aleixo Church, Southern Portugal', *International Journal of Architectural Heritage* **8**(6) (2014) 835-852, doi:10.1080/15583058.2012.751466.
- 19 Rosado, T.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., 'Characterizing microbial diversity and damage in mural paintings', *Microscopy and Microanalysis* **21**(1) (2015) 78-83, doi:10.1017/S1431927614013439.
- 20 Sciutto, G.; Dolci, L. S.; Guardigli, M.; Zangheri, M.; Prati, S.; Mazzco, R.; Roda, A., 'Single and multiplexed immunoassays for the chemiluminescent imaging detection of animal glues in historical paint cross-sections', *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**(2-3) (2012) 933-940, doi:10.1007/s00216-012-6463-z.
- 21 Arslanoglu, J.; Schultz, J.; Loike, J.; Peterson, K., 'Immunology and art: using antibody-based techniques to identify proteins and gums in artworks', *Journal of Biosciences* **35**(1) (2010) 3-10, doi:10.1007/s12038-010-0001-y.
- 22 Cartechini, L.; Vagnini, M.; Palmieri, M.; Pitzurra, L.; Mello, T.; Mazurek, J.; Chiari, G., 'Immunodetection of proteins in ancient paint media', *Accounts of Chemical Research* **43** (2010) 867-876, doi:10.1021/ar900279d.
- 23 Branco, A.; Salvador, C.; Fialho, A.; Semedo, M.; Martins, S.; Candeias, M. F.; Karmali, A.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., 'Characterisation and purification of proteic binders used in easel paintings', in ed. M. A. Rogerio-Candelera, *Science, Technology and Cultural Heritage*, CRC Press, London (2014) 177-184.
- 24 Baglioni, P.; Berti, D.; Bonini, M.; Carretti, E.; Dei, L.; Fratini, E.; Giorgi, R., 'Micelle, microemulsions, and gels for the conservation of cultural heritage', *Advances in Colloid and Interface Science* **205** (2014) 361-71, doi:10.1016/j.cis.2013.09.008.
- 25 Silva, M.; Rosado, T.; Teixeira, D.; Candeias, A.; Caldeira, A. T., 'Production of green biocides for Cultural Heritage novel biotechnological solutions', *International Journal of Conservation Science* **6** (2015) 519-530.

Recebido: 2015-12-28

Aceite: 2016-05-06

Online: 2016-05-17



Licenciado sob uma Licença Creative Commons
Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional.
Para ver uma cópia desta licença, visite
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.pt>