

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

VALQUIRIA DE OLIVEIRA SILVA

**O EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NA DESCONTAMINAÇÃO  
MICROBIOLÓGICA DE PINTURAS: um estudo de caso em uma obra de  
PORTINARI**

BELO HORIZONTE

2022

VALQUIRIA DE OLIVEIRA SILVA

**O EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NA DESCONTAMINAÇÃO  
MICROBIOLÓGICA DE PINTURAS: um estudo de caso em uma obra de  
PORTINARI**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas com ênfase em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto  
(Departamento de Microbiologia e  
Departamento de Bioinformática do  
ICB/UFMG)

BELO HORIZONTE

2022

043

Silva, Valquiria de Oliveira.

O efeito da radiação gama na descontaminação microbiológica de pinturas: um estudo de caso em uma obra de Portinari [manuscrito] / Valquiria de Oliveira Silva. – 2022.

159 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Fungos. 3. Pintura. 4. Técnicas Microbiológicas. 5. Fenômenos Químicos. 6. Raios gama. I. Góes Neto, Aristóteles. II. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **VALQUÍRIA DE OLIVEIRA SILVA**

Nº REGISTRO: **2017712854**

Às 14:30 horas do dia **10 de outubro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jacqueline Aparecida Takahashi (DQ/ICEx/UFMG), João Cura D`Ars de Figueiredo Junior (EBA/UFMG e DQ/ICEx/ UFMG), Mariana Santos Cardoso (Departamento de Bioinformática/ICB /UFMG), Alice Ferreira Silva (Universidade Federal da Paraíba) e o Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto (Orientador), para julgar o trabalho final "**O efeito da radiação gama na descontaminação microbiológica de pinturas: um estudo de caso em uma obra de Portinari**" da aluna **Valquíria de Oliveira Silva**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

#### Membros da Banca:

Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi  
Prof. Dr. João Cura D`Ars de Figueiredo Junior  
Dra. Mariana Santos Cardoso  
Profa. Dra. Alice Ferreira Silva

#### De acordo:

Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto  
(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza

(*Coordenadora do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia*)



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Aparecida Takahashi, Pró-reitor(a) adjunto(a)**, em 24/10/2022, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Cura D Ars de Figueiredo Junior, Professor do Magistério Superior**, em 24/10/2022, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Santos Cardoso, Professora do Magistério Superior**, em 24/10/2022, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alice Ferreira da Silva, Usuária Externa**, em 24/10/2022, às 20:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 27/10/2022, às 13:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aristoteles Goes Neto, Professor do Magistério Superior**, em 02/05/2023, às 08:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1443389** e o código CRC **5F38AD41**.

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus que me concedeu forças, consciência e fé em planeta em que a “educação e ciências transformam vidas, trazendo um ambiente justo e sustentável para o planeta” possibilitando uma “consciência de si e do outro” e “resiliência” características essas que se tornaram marcantes na minha personalidade no âmbito profissional e/ pessoal. Agradeço ao apoio recebido de pessoas/profissionais humildes não seria possível citá-los, porém registro a minha gratidão a essas ocupantes de funções diversas na Universidade Federal de Minas Gerais, sem elas, essa saga/odisséia complexa não seria possível. Essas colaboraram tornando a jornada de conhecimento denominada “Doutoramento” um pouco mais leve/ suave. Essas são da comunidade no ambiente acadêmico/técnico-científica em diversas unidades tais como: ICB/UFMG, DQ/ICEx/UFMG, DF/ICEx/UFMG, EBA/UFMG, CNEN/CDTN, CM/UFMG CECOR/EBA/UFMG, COLTEC/UFMG e por último o HC/ UFMG.

Cabe ressaltar o agradecimento ao meu orientador Prof Aristóteles Góes Neto, vulgo Ari da Bahia, que com sua paciência e sabedoria esteve próximo nesse percurso hercúleo, pela parceria, pelo reconhecimento dos meus esforços junto à comunidade científica da UFMG na busca sedenta e incansável pelo conhecimento científico. A minha ex-orientadora Profa Maria Aparecida de Resende Stoianoff, vulgo (Cidinha da Micologia), que reconheceu o esforço e trabalho no início da jornada do TCC de graduação até o mestrado. A Profa Vera Lúcia Santos que em conjunto com Prof João Cura D`Ars (DAPL/EBA/UFMG e DQ/UFMG) que me ofertaram a oportunidade de ingressar na pesquisa científica e compartilharam seu conhecimento com atenção e profissionalismo. As Profas. Danielle da Glória de Souza e Erna Kroon que não tem idéia do quanto o perfil delas é capaz de inspirar a carreira de outras pesquisadoras mulheres. Ao Prof Vasco Ariston de Azevedo, conheci na jornada de doutorado, acompanhou e reconheceu parte dessa luta da discente/trabalhadora da UFMG na busca pelo conhecimento e caminhada do ensino e pesquisa. Aos colegas do grupo de pesquisa LBMCF/ICB (Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos) em especial a Pós Doc Mariana Santos e Profa Alice Ferreira que em momentos essenciais compartilharam sua experiência e conhecimento me auxiliando nessa jornada acadêmica.

No DQ/ICEx importante agradecer ao Prof. Antônio Flávio de Carvalho de Alcântara, vulgo Tininha, que no doutorado me co-orientou/acompanhou num esforço enorme, infelizmente teve que se afastar por questões de saúde. Agradeço em especial a Profa Lucienir Pains Duarte, vulgo Lu” minha madrinha acadêmica” por sua sabedoria e palavras acalentadoras. A Profa

Rossimirian Pereira de Freitas que tive a oportunidade de conhecer e é um pessoa e profissional excepcional. A Profa Grasiely Faria de Souza pela parceria/acolhimento no NEPLAM e ao Prof Diogo Montes Vidal pela parceria nos VOCs do Portinari. A Profa Isolda Maria de Castro Mendes pelas trocas e bate papos na pesquisa científica. Aos colegas do NEPLAM/DQ/ICEx (Núcleo de Estudos de Plantas Mediciniais DQ/ICEx) pelo apoio.

Na EBA/UFMG o Prof João Cura D' Ars (DAPL/EBA/UFMG e DQ/UFMG) grande parceiro de pesquisas científicas desde os primórdios. A Profa Betânia Reis Veloso e a Profa Maria Regina Emery Quites que apoiaram desde o início a jornada pesquisa científica.

No CNEM/ LIG/CDTN agradeço aos queridos pesquisadores Luiz Carlos Ladeira e ao Márcio Tadeu Pereira que desde 2012 me receberam com entusiasmo científico e com parceria proficua. A Lorrane Cristina que possui uma dedicação e compromisso inigualável junto ao LIG/CDTN.

No COLTEC/UFMG agradeço ao esforço de profissionais que estruturaram um plano de qualificação para nossa comunidade buscando um ambiente justo para essa comunidade composta por Docentes e TAE`s. Em especial aos ex-dirigentes e atuais da unidade Profs Carlos Villani, Márcio Fantini, Natália Carneiro, Kátia Pedroso, Virgínia Motta pela parceria profissional junto à comunidade do COLTEC/UFMG. Tenho ciência que a minha responsabilidade e comprometimento, nas multifunções são inerentes a minha personalidade ( discente de pós, mãe, de filha de pais idosos ( pai deficiente), esposa, nora (de idosos), coexiste um ser humano na busca constante por equilíbrio e desempenho nesse âmbito complexo e adverso que é a universidade. Aos meus colegas Docentes e/ou TAEs Alexandre Martins, Giovanni Azevedo, Laura Gonçalves, Natália Kelles, Sergio Martins, Fábio Laboissiere, Albenir Campos, Cláudia Grossi, Ênio Damasceno, Rejani Silva, , Valdir Amaral, Kênia Coelho, Simone Vasconcellos, que de algum modo apoiaram, algumas vezes desconhecem quanto foram parceiros e me ajudaram.

Agradeço minha mãe Zilda (companheira de jornadas e lutas), meu pai Aparício e meu irmão. Minha sogra Maria José e meu sogro José Cândido (in memória) pelo apoio. A minha família pela compreensão das ausências em diversos momentos e apoio em momentos difíceis. A amiga Cláudia Assis minha parceira de batalhas.

Ao meu companheiro Sandro pela parceria, o meu amor e a minha gratidão. Minha filha pela compreensão das ausências “minha jovem curiosa cientificamente e bastante refletiva e questionadora”.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."(Marie Curie)

## Resumo

O patrimônio cultural é constituído por um conjunto de bens que representam a identidade de uma dada sociedade e o legado histórico deixado para as gerações futuras. Esses bens estão sujeitos a diversos mecanismos de deterioração, dentre esses destaca-se a biodeterioração por microrganismos. O conhecimento da comunidade fúngica associada aos bens culturais e das características físico-químicas do substrato são importantes subsídios para a compreensão dos processos deteriorogênicos e de suas causas, contribuindo para a determinação de um tratamento de desinfecção que seja eficaz e não ocasione danos à obra. Nesse sentido, o presente estudo intitulado “Caracterização físico química pictórica, prospecção e descontaminação microbiológica em uma pintura de Cândido Portinari: um estudo de caso” foi desenvolvido a partir da pintura mural intitulada “Frevo”, datada de 1961, executada pelo pintor Cândido Portinari. Essa pintura integra o complexo paisagístico da Pampulha, que constitui patrimônio cultural da humanidade, título concedido pela UNESCO. Assim, esse trabalho consistiu em análises físico-químicas (não-destrutivas) de seis fragmentos pictóricos coletados da pintura, empregando-se técnicas como o estudo estratigráfico, espectroscopia no infravermelho e Raman, e microscopia eletrônica de varredura, para identificar os materiais e técnicas empregados pelo artista na execução da obra. Foram encontrados pigmentos como o óxido de chumbo/ branco de chumbo ( $Pb_3O_4$ ), óxido de titânio/branco de titânio ( $TiO_2$ ), óxido de zinco/branco de zinco ( $ZnO_2$ ) e a carga carbonato de cálcio/gesso ( $CaCO_3$ ) na base de preparação, e, nas camadas pictóricas o amarelo e o vermelho de cádmio ( $CdSBaSO_4$  e  $CdS$ .  $CdSe$ ), azul de cobalto ( $CoOAl_2O_3$ ), os azul e verde de ftalocianina ( $CuC_{32}H_{16}N_8$  e  $CuC_{32}Cl_{16-n}H_nN_8$ ), óxido de ferro ( $Fe_2O_3/FeO_2$ ), lápis lazúli/azul ultramarino ( $Na_{6-8}Al_6Si_6O_{24}S_{2-4}$ ), e o aglutinante encontrado foi o óleo de linhaça ( $C_{18}H_{32}O_2$ ). Adicionalmente, foram coletadas amostras com swab na superfície pictórica e realizadas as análises microbiológicas que consistiram em isolamento fúngico, cultivo, identificação morfológica e molecular, utilizando oligonucleotídeos universais para as regiões ribossômicas ITS4 e ITS5. Dessa forma, foram identificadas quatorze espécies fúngicas pertencentes a oito famílias diferentes: seis (Aspergillaceae); sendo os gêneros correspondentes quatro *Aspergillus* e dois *Penicillium*, duas (Didymellaceae); cujos gêneros são *Epicoccum* e *Didymella*, (Apiosporaceae; *Arthrinium*); (Hypocreaceae, *Trichoderma*); (Calosphaeriaceae, *Pleurostoma*), (Chaetomiaceae, *Chaetomium*); (Mytiliniaceae, *Mytilinidion*); e (Sporidiobolaceae, *Rhodotorula*). Foram realizados ensaios de triagem enzimática dos fungos isolados para avaliar a produção de enzimas, e poucos fungos foram considerados produtores de xilanase e celulase. Fundamentado nos exames físico-químicos, foi realizado ensaio de concentração inibitória mínima para averiguar o crescimento dos isolados em componentes puros do substrato, o resultado encontrado foi que a maioria dos fungos crescem nos compostos puros testados. Os isolados fúngicos também foram submetidos à irradiação gama cobalto 60 em três dosagens 1kGy, 3kGy e 5 kGy, esses foram testados em solução de esporos e micélio em placas, sendo feitos ainda os grupos controle para o experimento. No que se refere ao tratamento por irradiação das soluções de esporos, praticamente todas as dosagens testadas foram eficazes, já no que se refere aos micélios, todos os fungos se mostraram com baixa sensibilidade às dosagens de irradiação. A partir das análises integradas supracitadas, o presente trabalho veio colaborar para a conservação e preservação dos bens culturais especificamente de pinturas.

**Palavras-chave:** fungos, biodeterioração, pintura, análises microbiológicas e análises físico-química, radiação gama.

## Abstract

The cultural heritage consists in one set of works of arts that represent the identity of a given society and the historical legacy left to future generations. These assets are subject to several deterioration mechanisms, among which biodeterioration by microorganisms stands out. The knowledge of the fungal community associated the cultural heritage and of the physicochemical characteristics of the substrate are important subsidies for the understanding of the deteriorogenic processes and their causes, it contributes to the determination of a disinfection treatment that is effective and does not cause damage to the work. In this, the present study entitled “the effect of gamma radiation on microbiological decontamination of paintings: a case study of Portinari's work” was developed from the mural painting “Frevo” dated 1961, by the painter Italian Brazilian. This painting is part of the Pampulha landscape complex, which constitutes a cultural heritage of humanity, a title granted by UNESCO. Thus, this work consisted of physicochemical (non-destructive) analyzes of six pictorial fragments collected from the painting, using techniques such as stratigraphic study, infrared and Raman spectroscopy, and scanning electron microscopy to identify the materials and techniques used by the artist in the execution of the work. Pigments such as lead oxide ( $\text{PbO}_2$ ), titanium oxide ( $\text{TiO}_2$ ), zinc oxide ( $\text{ZnO}$ ) and calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) filler were found in the preparation base, and, in the pictorial layers, the yellow and red of cadmium ( $\text{CdSBaSO}_4$  and  $\text{CdS}$ ,  $\text{CdSe}$ ), cobalt blue ( $\text{CoO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ ), phthalocyanine blue and green ( $\text{CuC}_{32}\text{H}_{16}\text{N}_8$  and  $\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{H}_n\text{N}_8$ ), iron oxide ( $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{FeO}$ ), lapis lazuli ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ ) and the binder found was linseed oil ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ). Additionally, microbiological samples were collected on the pictorial surface and microbiological analyses were performed consisted of fungal isolation, cultivation, morphological and molecular identification using universal oligonucleotides for the ITS4 and ITS5 ribosomal regions. Thus, fourteen fungal species belonging to eight different families, six were identified: (Apiosporaceae belonging to families) with the corresponding four families *Aspergillus* and *Penicillium*, two (Didymellaceae) two identified genera are *Epicoccum* and *Didymella*, (Apiosporaceae *Arthrinium*) (Hypocreaceae, *Trichoderma*) (Caphaeriaceae *Pleurostoma*), (Chaetomiaceae *Chaetomium*), (Mytiliniaceae *Mytilinidion*) and (Sporidiobolaceae *Rhodotorula*). Enzymatic screening assays of the isolated fungi were also carried out to evaluate the production of enzymes, and few fungi were considered producers of xylanase and cellulase. Based on the physical-chemical tests, a minimum inhibitory concentration test was carried out to verify the growth of the isolates in pure components of the substrate, the result found was that most fungi grow in the pure compounds tested. The fungal isolates were also submitted to cobalt 60 gamma irradiation in three dosages 1kGy, 3kGy and 5 kGy, these were tested in spore solution and mycelium on plates, and the control groups were also made for the experiment. Regarding to the treatment by irradiation of the spore solutions, practically all the dosages tested were effective, as for the mycelia, all the fungi showed low sensitivity to the irradiation dosages. Based on the above-mentioned integrated analyses, the present work has contributed to the conservation and preservation of cultural heritage, specifically paintings.

**Keywords:** fungi, biodeterioration, painting, microbiological analysis, chemical physical analysis and gamma radiation

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µl	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
µg	Microgramas
UFC	Unidade formadora de colônia
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Estratigrafia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Frente
kg	Quilograma
kGy	Kilogray
mg	Miligrama
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
V	Verso

## LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotografia da obra “Frevo” do artista Portinari, técnica (mista), óleo sobre suporte compensado de madeira 2,90 m x 3,91 m	22
Figura 2: Localização da Sede PIC próximo à Praça da Liberdade em BH-MG, situada ao centro da imagem de satélite, local de guarda da obra Frevo do artista Portinari	23
Figura 3: Planta do Hall da Sede PIC na Praça da Liberdade, onde situa-se a obra Frevo do artista Portinari representada por um círculo de linha reforçada, vista de cima.	24
Figura 4: Infogravura representando a colonização de fungos filamentosos em diversos substratos	33
Figura 5: Infogravura representando os fatores associados à microbiodeterioração	35
Figura 6: Formação biofilme fúngico	37
Figura 7: Infogravura do experimento de Rutherford	45
Figura 8: Reação inicial e reação de propagação da radiação gama com molécula de água gerando íons	47
Figura 9: Fotografia com mapeamento detalhado das áreas de coleta pictórica na pintura “Frevo”	53
Figura 10: Fotografia da coleta microbiológica na superfície da pintura “Frevo”	58
Figura 11: Fotografia com mapeamento das áreas de coleta microbiológica na pintura “Frevo”	58
Figura 12: Painel de fragmentos da pintura parte inacabada A) Fragmento 5 nas posições frente, verso e corte estratigráfico, B) Fragmento 10 nas posições frente e corte estratigráfico C) Fragmento 12 nas posições frente e corte estratigráfico	70
Figura 13: Painel de fragmentos da pintura parte finalizada A) Fragmento 6 nas posições frente e corte estratigráfico, B) Fragmento 13 nas posições frente e corte estratigráfico C) Fragmento 14 nas posições frente e corte estratigráfico	71
Figura 14: Gráfico <i>bar plot</i> de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao IV por amostra analisada	79
Figura 15: Gráfico <i>bar plot</i> de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao Raman por amostra analisada	83
Figura 16: Gráfico <i>bar plot</i> de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao MEV por amostra analisada	88
Figura 17: Gráfico <i>bar plot</i> de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao IV, Raman e MEV	90
Figura 18: Fotografia com mapeamento das áreas visivelmente com biofilme pintura “Frevo”	91
Figura 19: Detalhamento da área 3 visivelmente com biofilme microbiano na pintura “Frevo”	91
Figura 20: Diagrama de Venn das famílias dos isolados (coletas realizadas em 16 /04 /15 e 06 /04 /18)	92

Figura 21: Diagrama de Venn dos gêneros dos isolados (coletas realizadas em 16 /04 /15 e 06 /04 /18)	93
Figura 22: Diagrama de Venn de espécies dos isolados (coletas realizadas em 16 /04 /15 e 06 /04 /18)	98
Figura 23: Gráfico <i>box plot</i> produção de enzimas (celulase e xilanase) por espécie fúngica	105
Figura 24: Mapa representativo com resultados de concentração inibitória mínima de compostos puros (da obra) frente aos isolados fúngicos (da obra)	109
Figura 25: gráfico <i>bar plot</i> crescimento solução de esporos 7 dias crescimento e 21 dias irradiação	116
Figura 26: gráfico <i>bar plot</i> crescimento solução de esporos 14 dias crescimento e 28 dias irradiação	117
Figura 27: gráfico <i>bar plot</i> micélios mensurados com 5 dias de crescimento antes da irradiação	121
Figura 28: gráfico <i>bar plot</i> micélios mensurados com 10 dias de crescimento e 5 dias de irradiação	122
Figura 29: gráfico <i>bar plot</i> micélios irradiados reinoculados com 7 dias de crescimento e 12 dias de irradiação	123
Figura 30: gráfico <i>bar plot</i> micélios irradiados reinoculados com 21 dias de crescimento e 28 dias de irradiação	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fungos contaminantes em acervos bibliográficos	27
Tabela 2: Compostos químicos empregados nas formulações químicas de biocidas	42
Tabela 3: Constantes específicas de radiação gama (Gamão)	48
Tabela 4: Atribuição de bandas vibracionais de pigmentos inorgânicos em acordo com análise dos espectros no IV	74
Tabela 5: Atribuição de bandas de absorção de pigmentos e aglutinantes orgânicos em acordo com análises dos espectros no IV	77
Tabela 6: Atribuição de deslocamento Raman de pigmentos e aglutinantes (orgânicos e inorgânicos)	81
Tabela 7: Elementos químicos encontrados em cada amostra em análise SEM-EDS	85
Tabela 8: Proposta de atribuição da natureza dos pigmentos fundamentados SEM-EDS confrontando dados da literatura de Portinari	86
Tabela 9: Proposta de atribuição dos pigmentos fundamentados resultados SEM-EDS confrontando dados da literatura de Portinari	87
Tabela 10: Atribuição de pigmentos fundamentados traços de elementos químicos conforme cruzamentos dos exames: Espectroscopia Raman, IV e MEV	89
Tabela 11: Dados meteorológicos mensurados nos dias das coletas	94
Tabela 12: Identificação morfológica e molecular dos isolados	97
Tabela 13: Pinturas em suportes e materiais diversos e os gêneros ou espécies reportadas na literatura	101
Tabela 14: Média dos índices enzimáticos por espécies e substrato	103
Tabela 15: Concentração inibitória mínima dos isolados coletados na pintura de Portinari frente aos componentes principais puros encontrados em exames físico químicos da obra	110

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1 Arte e vida de Portinari	19
2.2 Histórico da obra “Frevo” de Portinari	22
2.3 Microbiodeterioração associada aos bens culturais	25
2.3.1 Microbiodeterioração fúngica em acervos bibliográficos	26
2.3.2 Microbiodeterioração fúngica em esculturas, monumentos e edifícios históricos	28
2.3.3 Microbiodeterioração fúngica em pinturas	29
2.4 Aerobiologia e as características da colonização fúngica	32
2.5 Fatores associados à microbiodeterioração	33
2.6 Mecanismos de ação dos microrganismos nos processos de biodeterioração	35
2.7 Características da formação do biofilme microbiano	36
2.8 Enzimas fúngicas	37
2.9 Conservação preventiva aplicada aos bens culturais em risco por danos pela ação de fungos	39
2.10 Conservação curativa aplicada aos bens culturais em risco por danos pela ação de fungos	40
2.11 Controle do crescimento microbiano por compostos químicos	40
2.12 Radiações ionizantes	43
2.12.1 Radiação Gama Cobalto-60	46
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	<b>49</b>
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>51</b>
4.2. Objetivos específicos	51
<b>5 METODOLOGIA</b>	<b>52</b>
5.1 Caracterização da pintura	52
5.1.1 Exames globais: organolépticos	52
5.1.2 Coleta dos fragmentos pictóricos na obra “Frevo”	52
5.1.3 Corte estratigráfico dos fragmentos e microscopia óptica	53
5.1.4 Espectroscopia no infravermelho (IV)	54
5.1.5 Espectroscopia Raman	55
5.1.6 Microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos (MEV)	56

5.2 Caracterização dos fungos em pinturas	57
5.2.1 Fotografia à luz visível	57
5.2.2 Coleta de amostras microbiológicas	57
5.2.3 Isolamento dos fungos cultiváveis	59
5.2.4 Seleção macromorfológica das colônias e micro cultivos	59
5.2.5 Extração dos DNAs dos isolados	60
5.2.6 Reação em cadeia da polimerase	60
5.2.7 Sequenciamento	61
5.2.8 <i>Screening</i> enzimático	62
5.2.9 Avaliação do potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados de Portinari frente aos componentes identificados na composição de pigmentos e aglutinantes encontrados na obra Portinari	64
5.3 Avaliação do potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados de Portinari frente à irradiação gama cobalto 60	66
5.3.1 Potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados em solução de esporos frente a três dosagens de radiação gama cobalto 60	66
5.3.2 Potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados em micélio frente a três dosagens de radiação gama cobalto 60	68
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
6.1 Caracterização da pintura “Frevo” e sua estratigrafia	69
6.2 Espectroscopia no IV	72
6.3 Espectroscopia Raman	79
6.4 Microscopia eletrônica de varredura	83
6.5 Sumarização dos dados obtidos pelo cruzamento de informações fornecidas pelos exames físico-químicos de espectroscopia IV, Raman e pelo MEV	88
6.6 Registros fotográficos à luz visível e seus detalhes como o biofilme formado na superfície pictórica	90
6.7 Identificação morfológica e molecular dos fungos baseada na região de ITS do rDNA	91
6.8 Fungos isolados produtores de enzimas	103
6.9 Ensaio de Concentração inibitória mínima com compostos encontrados na obra	105
6.10 Ensaio de irradiação gama cobalto 60 aplicada aos isolados fúngicos	111
6.10.1 Ensaio de irradiação gama cobalto 60 aplicada a solução de esporos dos isolados	111
6.10.2 Ensaio de irradiação gama cobalto 60 aplicada ao micélio dos isolados fúngicos	118
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>125</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b>	<b>126</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>127</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>145</b>

Anexo A Espectros dos fragmentos ao exame Infravermelho	145
Anexo B Espectros dos fragmentos ao exame Raman	149
Anexo C Espectros dos fragmentos ao MEV no modo EDS	152

## 1 INTRODUÇÃO

Os bens culturais em suas diferentes formas de manifestações artísticas como pinturas, esculturas, manuscritos antigos, livros, sítios arqueológicos e artefatos históricos estão sujeitos a processos de deteriorações física, química e biológica (SAIZ-JIMENEZ 1995; STERFLINGER; PIÑAR, 2013). A biodeterioração é definida como qualquer mudança ou alteração, ocasionada pela atividade de organismos vivos, em um dado substrato (HUECK, 1965; ALLSOPP et al., 2004; RESENDE, 2008). Os aspectos envolvidos na biodeterioração dos materiais componentes dos objetos culturais são determinados por fatores como composição química do objeto, ou seja, da natureza do material que o constitui, das características e técnicas utilizadas na sua fabricação, bem como dos parâmetros físicos como aqueles relacionados à superfície desse objeto, do clima e local onde a obra está situada e dos processos utilizados na higienização (GAYLARDE et al., 2002, 2011; STERFLINGER; PIÑAR, 2013).

Os objetos artísticos podem sofrer alterações devido a mudanças climáticas ambientais em função do local onde se encontram, essas alterações são ocasionadas a partir da variação de umidade e temperatura (SAIZ-JIMENEZ, 1995; CAPITTELLI et al., 2010). Os objetos artísticos podem ser classificados de acordo com o tipo de material utilizado em sua fabricação, sendo aqueles elaborados a partir de materiais orgânicos, que possuem o carbono como elemento químico principal, denominados objetos orgânicos. O elemento carbono faz ligações covalentes entre si e com outros átomos, que resulta na obtenção de diferentes materiais orgânicos, tais como papel, madeira, cera e gelatina. E aqueles obtidos a partir de materiais inorgânicos, como os pigmentos minerais e rochas, apresentam em sua estrutura diferentes elementos químicos, não sendo o carbono o elemento principal da ligação. A diversidade de materiais utilizados em um dado objeto cultural remete a complexidade de sua conservação e preservação. Os objetos cujos materiais apresentam em seu maior percentual os compostos orgânicos são mais susceptíveis a ataques por organismos vivos, incluindo microrganismos (CANEVA et al., 2000). Bactérias, fungos, líquens (fungos liquenizados), insetos xilófagos, traças e outras pragas, causam danos estruturais e estéticos que influenciam na conservação do patrimônio cultural devido ao seu potencial de biodeterioração (STERFLINGER; PIÑAR, 2013).

Contudo, nota-se a carência de trabalhos que abordem a ação dos microrganismos, o controle dos processos de biodeterioração e a descontaminação sobre os bens culturais. Os estudos existentes desconsideram as técnicas construtivas, os componentes das obras, os efeitos de tratamentos de desinfecção microbiana e a aferição da interferência desses nos objetos artísticos. Essa questão de desconsiderar a composição físico-química dos bens culturais pode ser danosa para a conservação e preservação desses bens, uma vez que a escolha de um tratamento de descontaminação inadequado que desconsidera esse aspecto físico-químico pode ocasionar danos irreversíveis à estrutura dos objetos culturais. Na literatura há estudos com diferentes metodologias de descolonização, tais como emprego de biocidas, a atmosfera anóxica e gases (óxido de etileno). Dentre esses destaca-se a radiação gama, e sua aplicação na descontaminação e controle do crescimento microbiano em bens culturais. O presente estudo visa contribuir para a compreensão dos processos de colonização, controle e desinfecção com ênfase na interação do tratamento por radiação gama, utilizando como fonte o cobalto-60 proposto nos testes nos isolados encontrados na obra “Frevo” de Portinari, contribuindo para o entendimento do processo de desinfecção fúngica e para o processo de descontaminação, possibilitando a conservação e salvaguarda dos bens culturais.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Arte e vida de Portinari**

Cândido Portinari foi um artista brasileiro nascido em Brodowski, São Paulo- Brasil (1903-1962), filho de imigrantes italianos, possuía dupla cidadania, ítalo-brasileiro. Sua vocação artística surgiu ainda na infância, período em que Portinari teve acesso à educação formal. Aos 14 anos de idade, uma equipe de pintores e escultores italianos que atuavam na restauração de igrejas passou pela região de Brodowski e recrutou Portinari como ajudante. Seria o primeiro grande indício do talento do pintor brasileiro. Aos 15 anos, já decidido a aprimorar seus dons, Portinari deixou São Paulo e partiu para o Rio de Janeiro para estudar na Escola Nacional de Belas Artes (ENBA). Durante seus estudos na ENBA, Portinari começa a se destacar e chamar a atenção tanto de professores quanto da própria imprensa. Aos 20 anos já participava de diversas exposições, ganhando elogios em artigos jornalísticos. O artista despertou o interesse por um movimento artístico até então considerado marginal: o modernismo (RODRIGUES FILHO, 1962; CALLADO et al., 2003).

Portinari sonhava e almejava obter premiações com seu trabalho no âmbito artístico, tais como a medalha de ouro do Salão da ENBA. Nos anos de 1926 e 1927, o pintor conseguiu destaque, mas não conseguiu a sonhada premiação. Portinari chegou a afirmar que suas telas compostas por elementos modernistas escandalizaram e assustaram os juízes do concurso (CALLADO et al., 2003). Em 1928, Portinari deliberadamente preparou uma tela com elementos acadêmicos tradicionais, e finalmente ganhou a medalha de ouro e uma viagem para a Europa. Morou em Paris por dois anos, período importante para o desenvolvimento do estilo posteriormente denominado Portinari. Lá ele teve contato com outros artistas como Van Dongen e Othon Friesz, além de conhecer Maria Martinelli, uma uruguaia com quem o artista casou-se e passou o resto de sua vida. A distância de suas raízes despertou em Portinari uma nostalgia, e profundo interesse pelas questões sociais brasileiras (RODRIGUES FILHO, 1962; CALLADO et al., 2003).

Em 1931, Portinari retorna ao Brasil. Nesse período mudou a estética de sua obra, valorizando cores fortes, quebrou o compromisso volumétrico e abandonou a tridimensionalidade. Aos poucos o artista deixou de lado as pinturas de cavalete pintadas a óleo e começou a dedicar-se aos murais e afrescos. Portinari expôs três telas no Pavilhão Brasil da Feira Mundial em Nova Iorque de 1939. Os quadros chamaram a atenção de Alfred Barr, diretor geral do Museu de Arte Moderna de Nova Iorque (CALLADO et al., 2003).

A década de 1940 foi satisfatória para o artista e suas obras elaboradas em formas geométricas e construídas com esboços compostos por diagonais e paralelas provocando efeitos especiais. Nessa época, Alfred Barr comprou a tela "Morro do Rio", e imediatamente a expôs em Nova Iorque, ao lado de obras de artistas consagrados mundialmente. O interesse geral pelo trabalho do artista brasileiro fez Barr preparar uma exposição individual para Portinari em Nova Iorque. Nesse período, Portinari fez dois murais para a Biblioteca do Congresso em Washington. Ao visitar o museu de Nova Iorque, Portinari impressionou-se com uma obra que mudaria seu estilo novamente: "Guernica" de Pablo Picasso. Portinari foi ativo também no movimento político-partidário em 1945, militando pelo Partido Comunista Brasileiro (PCB) e, em 1948, exilou-se no Uruguai por motivos políticos (FABRIS, 1996; CALLADO et al., 2003).

Em suas obras, o pintor conseguiu retratar questões sociais sem desagradar o governo e aproximou-se da arte moderna européia sem perder a admiração do grande público. Suas pinturas se aproximam do cubismo, do surrealismo e dos pintores muralistas mexicanos, não se distanciando da arte figurativa e das tradições da pintura (FABRIS, 1996; BALBI, 2003). O resultado foi a produção de uma arte com características modernas. Em 1952, uma anistia geral

faz com que Portinari voltasse ao Brasil. Participou nesse mesmo ano de 1952 da XXV Bienal de Veneza. Ainda em 52, o artista expõe na 1ª Bienal de São Paulo diversas obras com destaque em uma sala particular, mas a década de 50 seria marcada por vários problemas de saúde.

Em 1954, Portinari apresentou uma grave intoxicação pelo componente chumbo presente nas tintas que empregava em suas obras. Desobedecendo as ordens e recomendações médicas, Portinari continuava pintando e viajando com frequência para exposições nos Estados Unidos, Europa e Israel (FABRIS, 1996; CALLADO et al., 2003).

Entre suas obras mais prestigiadas e famosas, destacam-se os painéis *Guerra e Paz* (1953-1956), que foram presenteados em 1956 à sede da ONU em Nova Iorque. Na época, as autoridades dos Estados Unidos não permitiram a ida de Portinari para a inauguração dos murais devido às ligações do artista com o PCB. Antes de seguirem aos EUA, o empresário e mecenas ítalo-brasileiro, Ciccillo Matarazzo, tentou trazer os painéis para São Paulo, terra natal de Portinari, para apresentá-los ao público. Portinari foi o único artista brasileiro a participar da exposição 50 Anos de Arte Moderna, no Palais des Beaux Arts, em Bruxelas (Bélgica) em 1958. Ainda foi convidado de honra, expôs 39 obras em sala especial na I Bienal de Artes Plásticas da Cidade do México, em 1958. Neste mesmo ano, expôs em Buenos Aires, e em 1959 expôs na Galeria Wildenstein de Nova Iorque com outros grandes artistas americanos como Tamayo, Cuevas, Matta, Orozco, Rivera (FABRIS, 1996; CALLADO et al., 2003). Participou da exposição Coleção de Arte Interamericana, do Museo de Bellas Artes de Caracas (Venezuela).

Candido Portinari morreu no dia 6 de fevereiro de 1962, quando preparava uma grande exposição de cerca de 200 obras a convite da Prefeitura de Milão (Itália), vítima de intoxicação pelas tintas que utilizava (RODRIGUES FILHO, 1962) e (*World Heritage Encyclopedia*). Segundo a *World Heritage Encyclopedia* e *Google Arts & Culture* críticos de arte moderna de âmbito nacional e internacional, Portinari foi, e é considerado, um dos principais pintores brasileiros no mundo e um artista influente e marcante na arte moderna, de suma importância dessa expressão de arte na abordagem de temáticas brasileiras culturais, históricas e de acentuada crítica ao desenvolvimento social. É o único artista brasileiro que possui todas as obras catalogadas em Catálogo *Raisonné* publicado em 2004 e intitulado “Cândido Portinari”, ainda em 2020, o Projeto Portinari em parceria com a *Google* lançaram na plataforma *Google Arts & Culture* a história e obras de Portinari enfatizando a importância do artista para cultura e história do Brasil.

Em novembro de 2010, os painéis “Guerra e Paz” voltaram ao Brasil e, finalmente, foram exibidos em dezembro do mesmo ano no Teatro Municipal do Rio de Janeiro. Os painéis

também foram expostos em outras capitais brasileiras, e exibidos por último em 2012, no Memorial da América Latina, em São Paulo. Atualmente os painéis se encontram na sede da ONU em Nova Iorque.

## 2.2 Histórico da obra “Frevo” de Portinari

A obra selecionada para esse trabalho trata-se de uma pintura painel do século XX, com dimensões 2,90 m x 3,91 m, técnica mista, óleo sobre suporte compensado de madeira (cedro naval), formada pela junção de 8 blocos. Datada de 1961, a obra é intitulada “Frevo” (FIGURA 1), retrata a cultura da dança frevo, forte expressão cultural na região do nordeste brasileiro, especificamente em Recife, capital de Pernambuco. Esse painel foi executado pelo artista Portinari para decorar um dos salões do Pampulha Iate Clube (PIC) na sede campestre situada no Complexo Paisagístico e Arquitetônico da Pampulha, na orla da Lagoa da Pampulha, em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O projeto do clube foi elaborado pelo arquiteto Oscar Niemeyer (CALLADO et al., 2003), a pedido do prefeito de Belo Horizonte à época, Juscelino Kubistchek, que pretendia desenvolver e modernizar a região norte da capital mineira. A pintura não foi finalizada pelo artista, que veio a falecer em 1962 (RODRIGUES FILHO, 1962). O valor estimado da pintura, mesmo inacabada, está entre 10 e 20 milhões de reais pelo *marchand* carioca Bergamin, um experiente avaliador especialista em arte moderna.

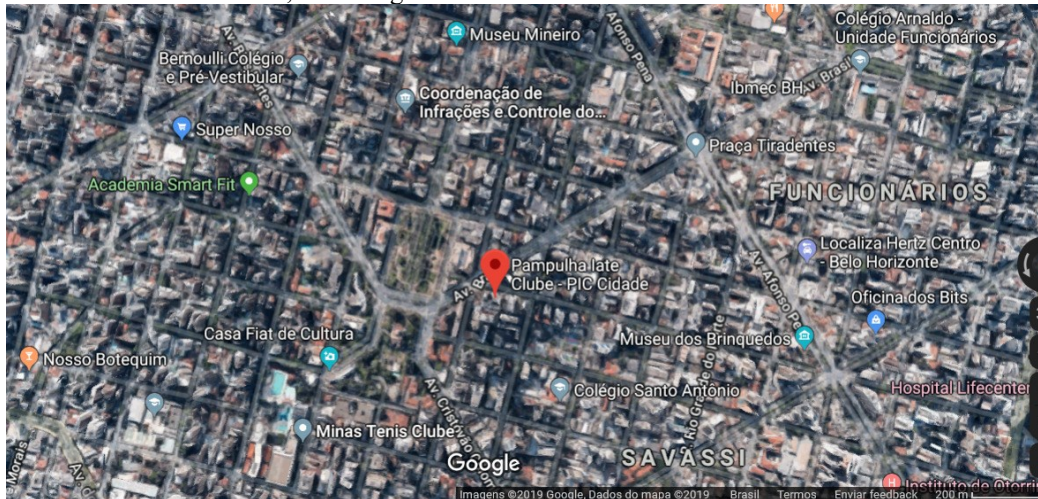
Figura 1: Fotografia da obra “Frevo” do artista Portinari, técnica (mista), óleo sobre suporte compensado de madeira 2,90 m x 3,91 m



Fonte: (<http://www.portinari.org.br/#/acervo/obra/2495>)

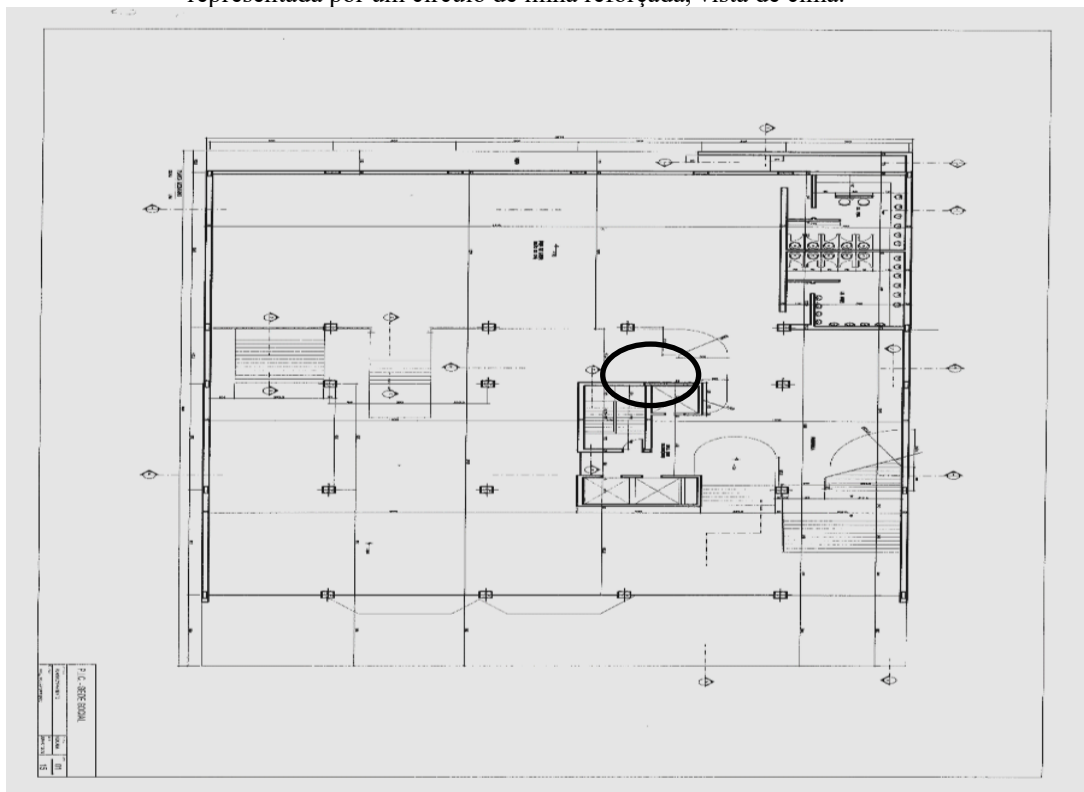
A obra “Frevo” pertencente à coleção particular do PIC, encontra-se desde 1990 na sua sede administrativa, que está situada na Rua Cláudio Manoel, nº 1185, Bairro Funcionários (FIGURA 2). A pintura encontra-se exposta no *hall* da sede administrativa do clube desde 1990 (FIGURA 3). O *hall* do prédio dá acesso direto à rua, fator que resulta em problemas técnicos de conservação e salvaguarda da obra. A obra “Frevo” de Portinari juntamente com as demais obras do Complexo Paisagístico e Arquitetônico da região da Pampulha, foram eleitas pela UNESCO em 2016 como Patrimônio Artístico e Cultural da Humanidade, e representam um importante complexo turístico e cultural para a capital mineira.

Figura 2: Localização da Sede PIC próximo à Praça da Liberdade em BH-MG, situada ao centro da imagem de satélite, local de guarda da obra Frevo do artista Portinari



Fonte: (Google Maps 2019)

Figura 3: Planta do Hall da Sede PIC na Praça da Liberdade, onde situa-se a obra Frevo do artista Portinari representada por um círculo de linha reforçada, vista de cima.



Fonte: (Arquivos do PIC-Sede Administrativa)

A obra “Frevo”, cuja imagem está disponível na Figura 3, apresenta as características estilístico-formais das produções pictóricas do artista referentes a esse período da década de 50, tais como a geometrização de formas utilizando retas paralelas e diagonais provocando efeitos especiais (BALBI, 2003). A obra “Frevo” é composta pela representação da tradição da dança frevo e da cultura nordestina. A composição apresenta tons de rosas (predominantes), azuis, ocre, verdes, amarelos, cinzas, brancos e laranjas e tons vermelhos terra e preto. Apresenta textura visualmente lisa, porém com leves irregularidades devido às pinceladas marcadas. Representando uma festa popular, observa-se uma multidão compacta de onde se sobressaem passistas de frevo, músicos e uma senhora porta-estandarte. Toda a composição é geometrizada criando superposição de planos que confundem a perspectiva, à exceção do canto superior esquerdo, onde se vê a vista de uma praia (CALLADO et al., 2003). No primeiro plano, à esquerda, destacado da multidão, passista, 3/4 voltado para a direita, dançando, com a perna esquerda esticada para frente e a direita dobrada servindo de apoio para o corpo. Seus braços estão esticados para o alto e segura com a mão direita uma sombrinha (CALLADO et al., 2003). O passista possui traços fisionômicos definidos, usa roupa branca e está descalço. No mesmo plano, ao centro, na frente da multidão, vê-se à esquerda um passista de frente, com as pernas

juntas até os joelhos e afastadas embaixo com os pés para dentro. Tem o braço esquerdo para baixo e o direito para cima segurando uma sombrinha escura, não possui traços fisionômicos definidos e está descalço. À direita, músico tocando violão, sentado quase de perfil para a direita, com cabeça voltada para frente e para baixo. Tem traços fisionômicos indicados, usa terno branco, meias listradas e sapatos brancos bem pontudos. Um pouco mais para a direita, mas no mesmo plano, baiana, em pé, de frente, sem traços fisionômicos definidos, cesta na cabeça, usando vestido tomara-que-caia e faixa. Tem o braço esquerdo esticado para cima e direito para baixo. Mais para a direita, um pouco destacado da multidão, outro passista, com a perna esquerda esticada para a frente e a perna direita dobrada, servindo de apoio ao corpo. Tem os braços esticados para frente, usa roupa branca e está descalço. No segundo plano, junto à multidão, porta-estandarte loura, com traços fisionômicos definidos, vestido amarelo e segurando com as duas mãos uma bandeira vermelha (CALLADO et al., 2003). Um pouco mais para a direita se destaca uma cabeça de equino de perfil para a esquerda; ao centro, busto de cangaceiro de frente usando chapéu e cartucheiras cruzadas no peito; à direita, parte de dois músicos, um flautista e um clarinetista e algumas máscaras. Na multidão ainda se destacam várias pessoas fantasiadas de árabe e de índio. Como toda a composição é geometrizada e inacabada, há confusão de planos, vendo-se à direita, área em tom mais escuro que o resto da composição. Ao fundo, à esquerda, área representando vista sobre uma praia com calçada (FIGURA 3) (CALLADO et al., 2003).

A obra *Frevo* evidencia o auge da fase cubista do pintor acentuada pelas cores e formas pictóricas, e nela também há alguns traços do surrealismo e do muralismo mexicano. O início de fabricação da pintura ocorreu um ano antes da morte de Portinari esse fato é considerado de suma importância, pois foi uma de suas últimas obras em processo de pintura (CALLADO et al., 2003), além de integrar o Conjunto Paisagístico e Arquitetônico da Pampulha que recebeu o título da UNESCO de Patrimônio Artístico e Cultural da Humanidade em 2016.

### 2.3 Microbiodeterioração associada aos bens culturais

O patrimônio cultural é nosso legado do passado, nossa “bagagem” do presente e herança para as gerações futuras. Os bens culturais, tais como pinturas, esculturas, documentos, sítios arqueológicos, paisagens e edificações históricas, integram o conjunto de bens ou objetos que compõem o patrimônio cultural, esses são portadores da identidade e memória de uma sociedade e possuem valor incalculável (BRASIL, 1988). Esses bens estão sujeitos a vários mecanismos de deterioração (física, química e/ou biológica), dentre os quais, destacam-se

aqueles de origem biológica, denominada microbiodeterioração, ocasionada pelos microrganismos (CALLOL, 2013; STERFLINGER; PIÑAR 2013). Os microrganismos capazes de ocasionar a biodeterioração são as bactérias e os fungos (CANEVA et al., 2000; STERFLINGER, 2010; CALLOL, 2013; STERFLINGER; PIÑAR 2013). Porém, os principais agentes biodeteriogênicos para os bens culturais são os fungos e as bactérias, devido à diversidade metabólica desses microrganismos, e, por possuírem alta eficiência na produção de enzimas, o que garante a sua sobrevivência desses em diferentes ambientes (STERFLINGER, 2010; CALLOL, 2013; STERFLINGER; PIÑAR, 2013; GOMOIU et al., 2018; MAZZOLLI et al., 2018).

### 2.3.1 Microbiodeterioração fúngica em acervos bibliográficos

Grande parte da história humana foi registrada na forma de documentos fabricados em materiais como trapos, papéis, pergaminhos (celulose, hemicelulose, lignina, pectina, tanino) e couros, os quais são de grande importância para historiografia e documental, por isso, devem ser preservados. Os acervos bibliográficos são compósitos elaborados a partir de materiais inorgânicos e orgânicos que servem de nutrientes para muitos microrganismos, tais como bactérias e fungos (CANEVA et al., 2000; MACEDO et al., 2012; BOMBLE et al., 2017; MAZZOLLI et al., 2018).

Os fungos filamentosos pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* são frequentemente associados à microbiodeterioração em arquivos e acervos bibliográficos. Esses fungos crescem sobre superfície (substrato) de materiais como papel (constituídos principalmente por celulose), ocasionando manchas, fragilidade de superfície e orifícios (BOMBLE et al., 2017). O principal mecanismo de ação dos fungos é a produção de enzimas celulolíticas que hidrolisam as moléculas de celulose para obterem a molécula de glicose (fonte secundária de nutrientes). Alguns fungos são capazes de digerir amidos, gomas, colas, adesivos e tintas presentes em acervos bibliográficos (CALLOL, 2013).

Na Tabela 1 estão elencados e relacionados os gêneros fúngicos, fonte de isolamento e metabólitos encontrados em acervos bibliográficos.

Tabela 1: Fungos contaminantes em acervos bibliográficos

ALGUNS FUNGOS CONTAMINANTES EM ARQUIVOS E BIBLIOTECAS			
GÊNERO	FONTE DO ISOLAMENTO	SUBSTÂNCIAS E/OU ENZIMAS QUE PRODUZEM	ATIVIDADE DETERIORADORA
<i>Alternaria</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Protease e Amilase	Manchas micelianas pardas, degradação do suporte
<i>Aspergillus</i>	Materiais orgânicos, ambiente	Enzimas e ácidos orgânicos	Manchas micelianas coloridas, degradação e acidificação do suporte
<i>Chaetomium</i>	Papel, cartão, peles, documentos fotográficos	Celulase, ácidos acético e láctico	Manchas pigmentares nos tons creme e rosa, acidificação
<i>Cladosporium</i>	Materiais orgânicos, fitas magnéticas, ambiente acético e fumárico	Protease, ácido láctico	Descoloração e acidificação do suporte, manchas micelianas azul-violeta e/ou rosa
<i>Fusarium</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Celulase, ácidos orgânicos	Manchas rosadas, descoloração, danos às fibras
<i>Mucor</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Protease, ácidos orgânicos	Manchas micelianas pardas e amarelas, acidificação
<i>Penicillium</i>	Materiais orgânicos e ambiente	Enzimas e ácidos orgânicos	Manchas micelianas verdes, degradação e acidificação
<i>Rhizopus</i>	Vários tipos de materiais orgânicos e ambiente	Enzimas e ácidos orgânicos	Manchas micelianas pardas, escuras, pigmentos, acidificação
<i>Sporotrichum</i>	Papel, têxteis e ambiente	Celulase, lignase, protease e ácido celobiótico	Manchas pardas escuras que afetam a fibra celulósica
<i>Trichoderma</i>	Papel, cartão e madeiras	Celulase, ácidos celobiótico e acético	Manchas micelianas verdes que degradam a fibra
<i>Verticillium</i>	Papel e têxteis	Celulase, ácidos celobiótico e acético	Manchas micelianas pardas escuras, pigmentos e acidificação

Fonte: Adaptado pela autora SILVA, 2016 (VAILLANT; VALENTIN, 1996)

### 2.3.2 Microbiodeterioração fúngica em esculturas, monumentos e edifícios históricos

As esculturas, monumentos e edifícios históricos foram desenvolvidos por manifestações artísticas humanas por meio de formas que foram extraídas a partir de matéria bruta composta por blocos que foram trabalhados e/ou esculpidos com auxílio de ferramentas (esses suportes podem ser rochas, marfim, metais e madeira). Essas formas ocupam três dimensões, (altura, volume e profundidade), comportando algumas vezes camadas pictóricas ou não, essas podem trazer consigo um significado simbólico ou agregar valor ao estilo decorativo (GOMBRICH, 1999). Essas obras encontram-se expostas ao ambiente, sejam elas compostas por materiais orgânicos tais como (madeira, marfim ou têxteis), ou inorgânicos (rochas minerais), estando susceptíveis às intempéries atmosféricas como: variação de umidade e temperatura, poluição, pólen, fezes de insetos e pássaros, que contribuem para a colonização de microrganismos (CANEVA et al., 2000; GAYLARDE et al., 2002; RESENDE, 1997, 2008).

A microbiodeterioração pode ocorrer em superfícies rochosas arquitetônicas como cantarias em igrejas e catacumbas, em porções parietais de cavernas, monumentos e em esculturas expostas ao relento (SAARELA et al., 2004; URZI, 2004; RESENDE, 2008; ETTENAUER et al., 2010; STEIGER et al., 2011). A presença de matéria orgânica na superfície desses artefatos contribui para a colonização desses bens culturais. A diferença na composição química dos materiais desses bens, características tais como a porosidade e a capacidade de reter água são fatores que influenciam o crescimento microbiano nessas superfícies (CANEVA et al., 2000; GAYLARDE et al., 2002; RESENDE, 1997, 2008). Ambientes como as cavidades terrestres, conhecidas como cavernas podem ser comumente colonizados por comunidades fúngicas, um exemplo clássico são as cavernas de Lascaux, na França, que foram acometidas por extenso biofilme fúngico nas rochas e nas pinturas rupestres parietais (BASTIAN; ALABOUVETTE, 2009).

Os monumentos integrados à arquitetura sofrem alterações físico-químicas, sejam esses com características orgânicas ou inorgânicas. Esse fato deve-se à quebra das ligações químicas e sucessão de reações químicas inter e intracristalinas, ocasionando a perda de coesão ou desmoronamento e, por interação com as condições do meio ambiente, iniciam e progridem gradualmente após o talhe ou a junção dos blocos. Essa alteração geralmente é influenciada pela atividade dos microrganismos responsáveis pela degradação biológica (MOHAMMADI; KRUMBEIN, 2008; RESENDE, 2008). Os agentes físicos, químicos e biológicos atuam em conjunto, de forma antagonista ou sinérgica, na deterioração de rochas (MOHAMMADI;

KRUMBEIN, 2008). Cada monumento que está sujeito ao clima local pode ser considerado um habitat diferente (BARROS, 2001).

### 2.3.3 Microbiodeterioração fúngica em pinturas

Pinturas são obras figurativas desenvolvidas pela criatividade e manifestação do homem desde os tempos pré-históricos, nas quais eram representadas cenas de caçada, lutas e rituais empregando pigmentos provenientes de ossos carbonizados, carvão vegetal, sementes, minerais como hematita aplicados em paredes rochosas de cavernas (GOMBRICH, 1999). Quando as cidades foram surgindo na antiga Grécia e Egito, as pinturas parietais eram feitas pela técnica denominada afresco (aplicação de pigmentos minerais em camadas compostas por areia, gesso e/ou argamassa). Também foram desenvolvidas pinturas em pergaminhos (pigmentos aplicados em couro e trapos), sendo que essas pinturas representavam imagens com figuras geométricas, pessoas em cultos, cerimônias palacianas e animais (GOMBRICH, 1999; RICETTO, 2010). Logo em seguida, os Romanos desenvolveram a técnica de afrescos proposta pelos gregos, e, aplicaram-na amplamente em seu território difundindo-a pelo mundo. Na idade média, a pintura esteve a serviço da igreja e do Estado, sendo denominada principalmente pintura cristã, dividindo a civilização humana em Antiga e Medieval. O homem representava então as formas da natureza, objetos, vegetação, e principalmente temas religiosos antigos e retratos de pessoas do alto clero em suportes tais como telas, pergaminhos, couro e livros de trapos. Posteriormente, surgiu o renascentismo ainda com temas cristãos, porém com temáticas de cunho iluminista e científico, e, logo em seguida o neoclassicismo trouxe as cenas da alta sociedade e do alto clero dominantes (GOMBRICH, 1999; RICETTO, 2010). Posteriormente, surgiu o romantismo com a pintura barroca, com objetivo de impressionar e causar emoção aos fiéis trazendo conceitos conflituosos e antagonistas, para isso causar esses sentimentos foram empregados pigmentos com cores fortes, contrastes do tom claro e escuro (sendo a fé [a claridade] e (a ausência da fé [a escuridão])). A pintura barroca trazia ainda a retomada da crença na fé católica das pessoas, abalada pelo surgimento do protestantismo europeu. O rococó traz essa ideia de contraste ao barroco, com resgate da fé católica por valores tais como: emprego de cores claras, harmonia decorativa, moderação e delicadeza. Nesse período eram representadas cenas religiosas e bíblicas, alto clero e pessoas da sociedade, principalmente em pinturas murais e sob tela (GOMBRICH, 1999; RICETTO, 2010). Somente no período moderno, o homem começou a expressar cenas desconstruídas com formas abstratas, e realizou experimentos com a luz em

várias horas do dia aplicada às imagens de paisagens sobre telas, e empregou desconstrução de imagens até então muito naturalistas e realistas, caminhando para a arte expressionista, cubista que influenciou posteriormente o surgimento de uma arte engajada, já trazendo em temas sociais humanos de flagelos de fome, miséria e violências de guerra, no mundo que resultou ainda na influência à arte do século XX (GOMBRICH, 1999; PROENÇA, 2010; RICETTO, 2010).

Para execução técnica, as pinturas exigem uma estrutura composta por camadas sobre um suporte (tecido, papel, madeira e couro) e as camadas são compostas por miríades de substratos orgânicos (adesivos, aglutinantes, óleo de linhaça, têmpera, guache e aquarela) e inorgânicos (pigmentos minerais, resinas e vernizes) e, em suas variadas técnicas de execução e materiais empregados, podem servir de nutrientes aos microrganismos (ALLSOPP et al., 2004; CANEVA et al., 2008; RICETTO, 2010; GAYLARDE et al., 2011). As colas de origem animal, utilizadas na base de preparação de quadros ou em restaurações, expostas em ambientes com condições de umidade relativa alta podem se tornar meio de cultura para bactérias e fungos (MARTIAREMA, 1992; CANEVA et al., 2000; GAYLARDE et al., 2002, 2011; ALLSOPP et al., 2004; RESENDE, 2008; STERFLINGER; PIÑAR, 2013). Como citado anteriormente, os fungos são reconhecidos como os causadores mais comuns de biodeterioração de pinturas ocasionando danos estruturais e estéticos (GARG et al., 1995; ALLSOPP et al., 2004; STERFLINGER, 2010; STERFLINGER; PIÑAR, 2013). Esses podem produzir uma grande variedade de enzimas, e provocar sérios danos estéticos às pinturas. Devido ao crescimento micelial no substrato, os fungos penetram por intermédio das hifas nos materiais, favorecendo o aumento de volume da massa micelial e causando rachaduras. Essas rachaduras podem levar à fragmentação, descolamento de camadas e perdas nas propriedades estruturais dos substratos, reduzindo a coesão desses materiais, ocasionando a degradação enzimática e ataque mecânico. Podendo causar ainda manchas, descolorações, pigmentação micelial, secreção de ácidos (oxálico, cítrico, succínico, fórmico, málico, acético, fumárico, glioxílico, glucônico e tartárico) que desempenham um papel significativo na deterioração química, causando ainda acidificação do substrato, esfoliações e perdas das camadas pictóricas (ALLSOPP et al., 2004, RESENDE, 1997, 2008; STERFLINGER, 2010; STERFLINGER; PIÑAR, 2013; ROSADO et al, 2013; ROSADO et al, 2015).

Os fungos podem causar ainda, a dissolução de cátions, a quelação de íons metálicos da camada pictórica dos pigmentos minerais. Levando à formação de complexos metálicos

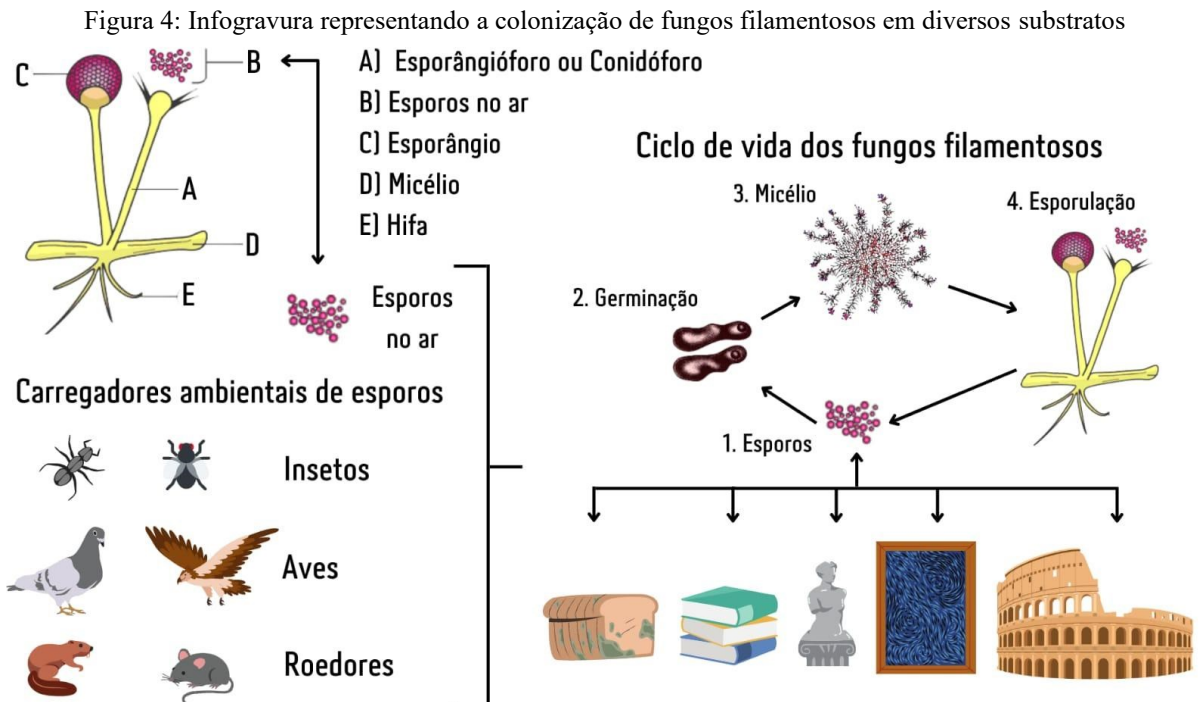
estáveis, cuja cristalização causa um aumento de pressão resultando em rachaduras, descamação e perdas de fragmentos (UNKOVIC et al., 2018). Os fungos normalmente encontrados em pinturas de cavalete (cujo suporte é um tecido) são *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium* e *Penicillium* (CIFERRI, 1999; CASELLI et al., 2017). Em pinturas murais, tais como (afrescos e *marrouflages*), os gêneros fúngicos comumente encontrados pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (GIACOBINNI et al., 1991; GUGLIELMINETT et al., 1994; GAYLARDE et al., 2002; SZOSTAK-KOTOW, 2004; GORBUSHINA et al., 2004; ROSADO et al., 2013; ROSADO et al., 2017; ROSADO et al., 2019).

Um exemplo de impacto negativo no turismo cultural e, por consequência na economia, é o caso reportado em artigos científicos das pinturas rupestres das Cavernas de Lascaux, em Dordogne, no sudoeste da França, que foram colonizadas por fungos. Essas pinturas parietais (paredes) do paleolítico foram descobertas em 1940 e são compostas por representações de cavalos, touros, bois, veados, cabritos e possuem cerca de 17.000 anos de idade. Após a II Guerra Mundial recebia cerca de 1800 visitantes/dia. Em 1963 estas foram fechadas para visita devido ao aparecimento de fungos liquenizados na superfície das pinturas rupestres (BASTIAN; ALABOUVETTE, 2009). As Cavernas de Lascaux permanecem fechadas. Os turistas são conduzidos às réplicas das cavernas, inauguradas desde 1983. Em 2001, surgiram novos problemas em Lascaux, quando se instalou um sistema de regulação de iluminação e temperatura. Surgiram nas paredes e tetos fungos brancos identificados como *Fusarium solani*. Um grupo de cientistas do Comitê Internacional de Conservação de Lascaux, composto por uma equipe multiprofissional, decidiu realizar um tratamento químico espalhando cal no solo da caverna e trataram os fungos presentes nas pinturas parietais com fungicida. Essa intervenção resultou no surgimento de fungos negros em algumas das pinturas rupestres, o que comprometeu a visualização e apreciação do complexo artístico-paisagístico. Esse fato evidenciou como tratamentos inadequados podem contribuir para a deterioração das pinturas rupestres em cavernas e para seu desequilíbrio ecológico. Após 74 anos da descoberta de Lascaux, o ser humano ocasionou impactos no equilíbrio ecológico, equilíbrio esse o qual até a sua descoberta havia colaborado para a preservação desse importante sítio de pinturas rupestres que se manteve conservado por milhares de anos (BASTIAN; ALABOUVETTE, 2009).

#### 2.4 Aerobiologia e as características da colonização fúngica

A aerobiologia é a ciência que trata do estudo das partículas bióticas (microrganismos) e abióticas (poeira) e as suas interações na atmosfera, seja em ambientes fechados e/ou abertos, cuja abordagem abiótica está relacionada aos fatores climáticos (temperatura, umidade, ventilação e iluminação) e a bióticas aos fatores biológicos (diversidade de microrganismos e variabilidade) (SAIZ-JIMENEZ; GONZALEZ, 2007; PASQUARELLA et al., 2015; GOMOIU et al., 2018; MAZZOLI et al., 2018).

Os fungos formam diversas estruturas de dispersão, sendo a principal os esporos, que, entram em contatos com várias vias de dispersão (vento) (ALEXOPOULOS et al., 1996; PASQUARELLA et al., 2015; MAZZOLI et al., 2018). Dentre as principais vias de dispersão dos fungos filamentosos na natureza, destaca-se o espalhamento dos esporos dos conidióforos e esporangiósporos pelo ar atmosférico, porém, esses também podem ser carregados por insetos, pássaros, roedores e pela manipulação (homem). Quando partículas como esporos fúngicos encontram substratos com nutrientes adequados, germinam e crescem formando hifas e colonizando essas superfícies (ALEXOPOULOS et al., 1996; PASQUARELLA et al., 2015), conforme esquema (FIGURA 4).



Fonte: Adptado pela autora, SILVA, 2016 (ALEXOPOULOS et al, 1996; BROCK, 2010; CANEVA et al., 2000; Environmental Contrating Restauration, 2012; STERFLINGER& PIÑAR, 2013)

### 2.5 Fatores associados à microbiodeterioração

Diversos são os fatores associados à microbiodeterioração, sendo esses fatores bióticos e abióticos. Dentre esses destaca-se o fator denominado abiótico clima (temperatura e umidade). O Brasil é um país de clima predominante tropical úmido (NÓBREGA, 2010), diversificado pelas variantes geográficas (topografia) que, somadas às condições do ar atmosférico, influenciam o clima em diversos ambientes terrestres. Esses fatores abióticos tais como umidade relativa do ar, temperatura, precipitação, incidência de luz solar e as suas oscilações favorecem a colonização microbiana e a ocorrência de microbiodeterioração em bens culturais (STERLIC et al., 2005; HOFBAUER et al., 2006; RESENDE, 2008; GAYLARD et al., 2011). A localização geográfica do objeto cultural e o clima influenciam o conteúdo químico do ar que chega à superfície exposta, e, é principalmente dessa forma (via aérea) que as mudanças climáticas favorecem colonização e o desenvolvimento da microbiota em bens culturais (RESENDE, 1997; STERLIC et al., 2005; HOFBAUER et al., 2006; RESENDE, 2008; GAYLARD et al., 2011).

A biodeterioração é conceitualmente definida como uma mudança indesejável nas propriedades dos materiais, ocasionada pela atividade biológica dos organismos (RESENDE,

1997; HUECK, 1965; ALLSOPP et al., 2004; RESENDE, 2008). O processo de biodeterioração consiste na perda do material ao qual o organismo está associado (RESENDE, 2008). A microbiodeterioração ocasionada principalmente por microrganismos provoca danos incalculáveis aos bens aos quais esses microrganismos estão associados como: formação de biofilmes e alterações de colorações de superfícies (devido à formação de biofilme), desprendimentos e perdas estruturais pelo crescimento de hifas dos fungos, por exemplo, ocasionando a deterioração orgânica e inorgânica dos materiais componentes das obras com a produção de metabólitos (ALLSOPP et al., 2004; RESENDE, 1997 e 2008; DE FELICE et al., 2010; CALLOL, 2013; MAZZOLLI et al., 2018). Como já citado, os objetos culturais e edifícios históricos e até mesmo obras contemporâneas estão sujeitos à microbiodeterioração (ALLSOPP et al., 2004; RESENDE, 2008; STERFLINGER; PIÑAR, 2013).

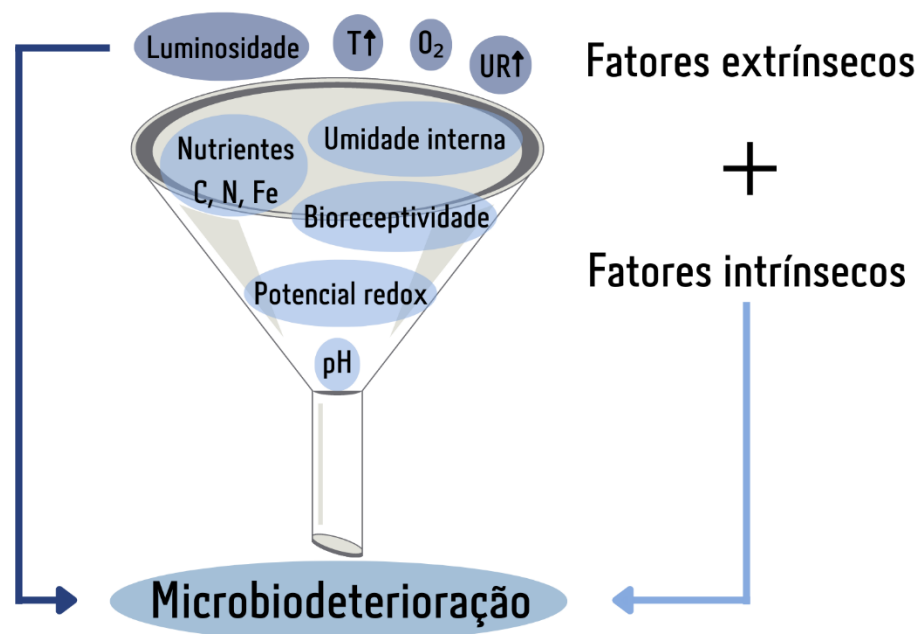
Os bens culturais que se encontram em processo de microbiodeterioração possuem valor artístico, cultural e histórico, referenciam a identidade e a memória de grupos formadores de uma sociedade (PETIT, 1995). A memória e identidade são elementos essenciais para formação e estruturação do turismo cultural, que surgiu com a expectativa de preservação da cultura e sua transformação em produto comercializável, gerando renda e fomentando a economia (BATISTA, 2005).

Há relatos antigos a respeito da biodeterioração em bens culturais. Os seus efeitos foram descritos no Velho Testamento da Bíblia Cristã (por exemplo, Levíticos Cap. 14, versículo 36) (STERFLINGER; PIÑAR, 2013). Os danos ocasionados pela biodeterioração foram negligenciados durante muito tempo, sendo que somente os processos químicos e físicos eram considerados fatores dominantes na deterioração dos materiais (STERFLINGER; PIÑAR, 2013).

Esses diversos fatores que estão associados à microbiodeterioração favorecem o crescimento de espécies fúngicas, sendo que algumas das quais exigem luz para o seu desenvolvimento, porém outras não crescem na presença de luz. A temperatura ideal para alguns fungos crescerem está entre 20°C e 30°C, esses são denominados mesófilos. Porém, há aqueles que crescem em faixas extremas de temperatura, por exemplo *Chrysosporium thermophilum* (ALEXOPOULOS et al., 1996; CAPPITELLI et al., 2010). Fatores intrínsecos à biodeterioração estão relacionados ao objeto e que envolvem características de sua fabricação (e junções de partes do objeto) e/ou dos materiais empregados (adesivos, colas, pigmentos e aglutinantes), além da porosidade, rugosidade, capacidade de retenção água (atividade de água),

processo de secagem, restaurações e intervenções estruturais. De modo geral, esses fatores estão também relacionados ao substrato do objeto como a faixa de pH na qual os fungos apresentam melhor taxa de crescimento em torno de 5 e 6, ou seja, pH ácido, a biorreceptividade da superfície do objeto, a presença de umidade interna e nutrientes (fonte de carbono), além do potencial de oxirredução do material conforme (FIGURA 5) (CANEVA et al., 2000; STERLIC et al., 2005; PANGALO et al., 2009; CAPPITELLI et al., 2010; CALLOL, 2013; MAZZOLLI et al., 2018).

Figura 5: Infogravura representando os fatores associados à biodeterioração



Fonte: Adaptado pela autora Silva, 2016  
(CANEVA et al., 2000; STERLIC et al., 2005; PANGALO et al., 2009; BROCK et al., 2010)

## 2.6 Mecanismos de ação dos microrganismos nos processos de biodeterioração

Os processos de biodeterioração em objetos culturais estão diretamente relacionados aos processos metabólicos dos microrganismos. Porém na biodeterioração, a inter-relação entre os microrganismos em objetos culturais e os respectivos substratos não foram ainda satisfatoriamente explicados (RESENDE, 2008; STERFLINGER; PIÑAR, 2013). A contaminação e colonização dos substratos são controladas pelo ambiente (umidade, temperatura e ventilação) e poluentes antropogênicos orgânicos e inorgânicos do ar, que

interferem e aceleram a biodeterioração de objetos e/ou monumentos (RESENDE, 1997, 2008; CAPPITELLI et al., 2010).

Os processos microbianos utilizados pelos microrganismos para a colonização em bens culturais conhecidos até o momento pela comunidade científica são a produção de ácidos, a produção de substâncias adesivas e surfactantes, produção de minerais como óxidos, fosfatos, carbonatos e oxalatos e a produção de nichos ecológicos, pois, os microrganismos ocasionam perfurações e formação de crostas na superfície do objeto colonizado (KRUMBEIN, 1988; RESENDE, 1997, 2008; MAZZOLLI et al., 2018).

### 2.7 Características da formação do biofilme microbiano

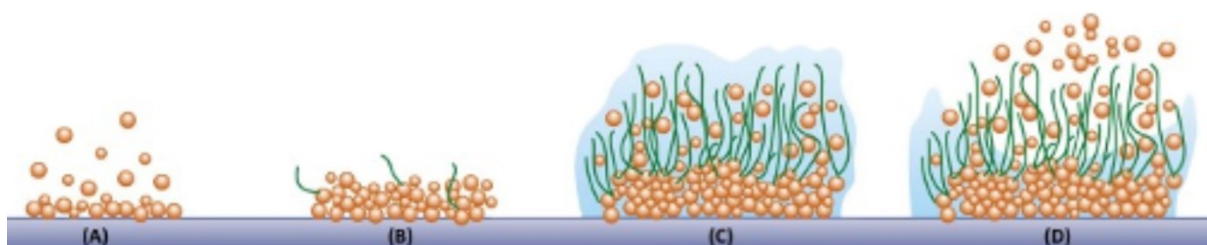
A microbiodeterioração em dada superfície de um objeto, ou seja, o processo de formação do biofilme microbiano em superfícies, ocorre através da colonização primária (chamado filme condicionante), logo ocorre a divisão e desenvolvimento celular microbiano, em seguida a síntese de exopolissacarídeos e o desenvolvimento de microcolônias pela coadesão de outras células ou grupos de microrganismos e, por fim, a formação de mosaicos clonais em biofilmes multi-específicos (ALLSOPP et al., 2004; GAYLARDE et al., 2011). Esse, por definição, consiste na formação de uma comunidade microbiana complexa, dinâmica e envolta por uma matriz polimérica extracelular de características polissacarídicas que se forma e sofre alterações ao longo do tempo. O biofilme é constituído por microrganismos, EPS conhecidos como (exopolissacarídeos), (proteínas e carboidratos), água e partículas sólidas retidas (argilas, areia, material orgânico e produtos de corrosão) (ALLSOPP et al., 2004). Esses microrganismos, sejam eles fungos e/ou bactérias, formam filme para obterem melhores condições de sobrevivência, e nessa conformação podem ser protegidos contra a variação de pH, concentrações de sais, radiações UV, desidratação, biocidas e antibióticos (ALLSOPP et al., 2004; GAYLARDE et al., 2011).

Os microrganismos ainda aproveitam melhor os nutrientes quando se estabelecem e criam nichos ecológicos. Os fatores que alteram a formação de biofilme nas superfícies sólidas são: rugosidade, hidrofobicidade, presença de materiais particulados, quantidade e concentração de nutrientes, luz, umidade e temperatura (RICHARD et al., 2003). Esse pode ser formado em ambientes aquosos, em interfaces sólido/líquido (superfícies imersas), líquido/líquido (água-petróleo), líquido/ar (superfície-água) e sólido/ar (expostas ao ar). As superfícies biorreceptivas podem ser diversas, tais como as células do corpo humano, de

animais, vegetais ou inertes (concretos, esculturas e pinturas), (FIGURA 6), (RICHARD et al., 2003; ALLSOPP et al., 2004). Devido à espessura da parede da membrana celular fúngica, eles podem resistir ao ataque químico e, portanto, resistem a biocidas entre outros tratamentos. Devido à forte melanização das paredes celulares por fungos negros (exemplo *Phiallopora*), objetos colonizados por esses exibem pontos negros ou podem ser completamente cobertos por uma camada de coloração preta. Além de ambientes externos, eles são também encontrados em superfícies rochosas de cavernas e catacumbas (SAARELA et al., 2004).

Figura 6: Formação biofilme fúngico

### Formação de biofilme fúngico



- A) Colonização primária da superfície, recoberta por um filme condicionante composto por polissacarídeos, proteínas, lipídeos, dentre outros;
- B) desenvolvimento, divisão celular, síntese da EPS e composição das microcolônias;
- C) co-adesão de células simples e ou co-agregados de células e ou grupo de microrganismos;
- D) maturação e formação de mosaicos clonais em um biofilme.

Fonte: Adaptado pela autora (RICHARD et al., 2003; ALLSOPP et al., 2004)

### 2.8 Enzimas fúngicas

Os fungos pertencentes aos gêneros das classes basidiomicetos (possuem basidiósporos) e ascomicetos (ascósporos) produzem enzimas que são por definição proteínas responsáveis por reações bioquímicas, envolvidas nos processos biológicos dos sistemas vivos, capazes de aumentar a velocidade das reações biológicas, sendo também conhecidas como catalisadoras de processos de degradação biológicos. Os fungos filamentosos dos Filos Basidiomycota e Ascomycota possuem propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimáticas que os destacam entre os organismos que podem crescer em diversos substratos produzindo uma grande variedade de enzimas e têm a notável capacidade para crescer e desenvolver em uma ampla

variedade de condições ambientais, incluindo uma condição de baixa quantidade de água (STERFLINGER, 2010). Alguns gêneros fúngicos são conhecidos por sua capacidade de degradar celulose e hemicelulose pela ação das suas enzimas, as quais permitem a degradação de lignina, celulose e hemicelulose em substratos tais como madeira e papel (GRIMM et al., 2005; FERNANDES et al., 2005). Os bens culturais tais como esculturas, pinturas, livros e documentos gráficos cujo suporte é lignocelulósico (compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina) estão susceptíveis à ação de fungos, sendo frequentemente colonizados. Tal ação pode ocasionar mais danos estruturais do que apenas problemas estéticos, uma vez que a atividade fúngica nos objetos consiste em uma profunda modificação da estrutura físico-química, ocasionando degradação e deterioração das fibras celulósicas realizadas pelas enzimas produzidas pelos fungos (MICHAELSEN et al., 2009). Geralmente, o dano ocasionado pelos fungos em pinturas é devido ao crescimento micelial no substrato, penetração de hifas, e produção de estruturas reprodutivas no substrato (ascomas e basidiomas), o que aumenta o volume e número de rachaduras, causando a ruptura da camada de pigmento e levando à descolamentos de fragmentos pictóricos (GARG et al., 1995; ROSADO et al., 2015). Os fungos filamentosos podem produzir diversas classes de enzimas catalisadoras tais como a celulase e a hemicelulase que apresentam diversas aplicações biotecnológicas. Embora um quantitativo grande de hidrolases fúngicas já tenham sido isoladas e caracterizadas, há ainda um grande interesse por parte da ciência e da indústria na descoberta de outras enzimas para aplicações tecnológicas (MONTEIRO; SILVA, 2009). Uma vez que as enzimas são produtos biológicos, essas que possuem alto valor agregado, apresentando vantagens em relação aos produtos químicos sintéticos pois essas não liberam, de modo geral, subprodutos poluentes e tóxicos ao meio ambiente (MONTEIRO; SILVA, 2009). Dentre as aplicações biotecnológicas de enzimas fúngicas na indústria destacam-se a redução de custos operacionais pois seus processos são limpos e contribuem para a redução do impacto ambiental destacando-se nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica, biocombustível e papel. Na indústria de alimentos, as enzimas fúngicas como as celulases auxiliam na extração de chá verde, de óleos essenciais e aromatizantes (LYND et al., 2002). Nas fábricas têxteis, as celulases podem tornar o tecido macio, liso e podem retirar excessos de corantes (DA SILVA et al., 1997). Na indústria de papel, as celulases por exemplo

auxiliam no refino da polpa, podem colaborar no processo de despigmentação da matriz celulósica e podem modificar as propriedades das fibras aumentando a velocidade de fabricação do papel (BHAT, 2000).

#### 2.9 Conservação preventiva aplicada aos bens culturais em risco por danos pela ação de fungos

A conservação preventiva pode ser definida como um conjunto de ações para mitigar e evitar deteriorações e perdas significativas dos bens culturais, protegendo-os perante futuras alterações (MARTIARENA, 1992; REYS et al., 2008; TOLEDO, 2011). Primeiramente faz-se a inspeção, avaliação, registro e diagnóstico do objeto ou bem em risco de deterioração. Posteriormente elabora-se um conjunto de estratégias sistemáticas e organizadas no tempo e espaço aplicados ao objeto de estudo, desenvolvidas em equipe multidisciplinar e em consenso com a sociedade, com a finalidade de preservar e resguardar o objeto ou bem em risco e também a sua memória inserida no dado contexto social (CARTA DE ATENAS, 1931; REYS et al., 2008). Essas ações geralmente são indiretas, ou seja, não interferem diretamente nos materiais e nas estruturas dos bens.

Um dos principais desafios da ciência da conservação preventiva são os materiais constitutivos dos acervos museológicos e o controle da biodeterioração, deterioração química e danos mecânicos (CARTA DE ATENAS, 1931; REYS et al., 2008; TOLEDO, 2011). Alguns fatores externos influenciam na conservação dos objetos como: físicos (temperatura, umidade relativa, luz natural e artificial), químicos (poluentes atmosféricos), biológicos (microrganismos e insetos), antrópico (manuseio, armazenamento e a exposição incorreta), catástrofes (inundações, terremotos e incêndios) (CANEVA et al., 2000; ALLSOPP, et al., 2004; CALLOL, 2013). Esses fatores podem ser controlados, minimizados e, algumas vezes evitados se a instituição adotar equipamentos de monitoramento e medidas mitigantes para evitar a deterioração do acervo, tais como controle da taxa de umidade relativa (a taxa referencial para conservação de pinturas está na faixa de 45% a 60%) (MARTIARENA, 1992; TOLEDO, 2011). Porém, estratégias e estudos interdisciplinares no âmbito científico das pesquisas físico-químicas dos materiais constituintes dos objetos culturais e análises microbiológicas aplicadas aos bens culturais para prevenir a microbiodeterioração de forma adequada e segura têm sido mister para preservação e salvaguarda desses bens (CIFERRI, 1999; UNKOVIC et al., 2016; ZUCCONI et al., 2022)

#### 2.10 Conservação curativa aplicada aos bens culturais em risco por danos pela ação de fungos

A conservação curativa é definida como um conjunto de ações aplicadas diretamente a um bem ou grupo de bens culturais, cujo objetivo principal é deter os processos danosos presentes. Essas ações são realizadas quando um bem ou objeto encontra-se em estado de fragilidade estrutural e/ou estética progressiva, sendo o objetivo principal dessas ações a preservação das características históricas e/ou estéticas da obra a ser tratada (CARTA DE ATENAS, 1931; CARTA DE RESTAURO, 1972; MARTIARENA, 1992; REYS et al., 2008). Nesse aspecto alguns exemplos de conservação curativa são o tratamento de desinfecção, aplicação de biocidas, dessalinização de cerâmica, desacidificação de papéis, desinfestação de insetos e estabilização de materiais em processo de corrosão (ALLSOPP et al., 2004; REYS et al., 2008; CALLOL, 2013). No entanto estudos, pesquisas e testes que prezem/zelem pelo estudo integrado empregando técnicas análises físico-químicas aplicadas dos objetos culturais e análises microbiológicas direcionadas para o controle do crescimento microbiano têm sido demandadas pela comunidade científica e têm sido considerados imprescindíveis e eficazes na preservação e salvaguarda desses objetos culturais (CIFERRI, 1999; UNKOVIC et al., 2016; ZUCCONI et al., 2022).

#### 2.11 Controle do crescimento microbiano por compostos químicos

O controle do crescimento de populações microbianas em bens culturais é importante para a preservação do patrimônio cultural. Como foi mencionado anteriormente, os fungos são os principais microrganismos que ocasionam danos aos bens culturais como: alteração da coloração original da superfície (dano estético), pigmentação no substrato pela melanização dos fungos e formação de crostas, produção de ácidos que danificam o suporte (substrato), alargamento de fissuras pelo desenvolvimento das hifas fúngicas, produção de substâncias adesivas e surfactantes (RESENDE, 2008; STERFLINGER, 2010; CALLOL, 2013; STERFLINGER; PINÃR, 2013; MAZZOLI et al., 2018). Alguns desses danos são considerados irreversíveis tal como os desprendimentos pictóricos (perda da camada da pintura) (STERFLINGER, 2010; CALLOL, 2013; STERFLINGER; PINÃR, 2013). Os tratamentos comumente empregados na preservação de bens culturais colonizados são substâncias biocidas (bactericidas, fungicidas e/ou algicidas), enzimas, tensoativos e sabões, taninos e fenóis (naturais e sintéticos), gases (óxido de etileno) e irradiação (radiação UV e radiação gama)

(KRUMBREIN et al.,1988; ALLSOPP et al., 2004; RESENDE, 1997, 2008; SILVA et al., 2013).

Os biocidas ou microbiocidas são agentes antimicrobianos sintéticos ou naturais, orgânicos ou inorgânicos, capazes de causar a morte das células microbianas fúngicas e/ou bacterianas que, sob ação desses perdem a capacidade reprodutiva (ALLSOPP et al., 2004; PAULUS, 2004). Esse processo ocorre através de diversos mecanismos de ação das drogas tais como inibição de síntese de parede celular, inibição da síntese proteica, inibição da síntese de lipídeos, alteração de permeabilidade de membrana celular, interferência no metabolismo e transporte de nutrientes (FINCH et al., 2003; ALLSOPP et al., 2004; PAULUS, 2004; BROCK et al., 2010). Eles podem ser usados tanto na desinfecção como também para aumentar a durabilidade de agentes protetores (consolidantes e vernizes), mas, devido à adaptação fisiológico-metabólica dos microrganismos e sua capacidade de integração em ecossistemas complexos os efeitos dos biocidas são limitados (KRUMBREIN et al.,1988; ALLSOPP et al., 2004; PAULUS, 2004; RESENDE, 1997, 2008).

A escolha do microbiocida deve levar em consideração sua eficácia contra uma ampla gama de microrganismos específicos do material a ser tratado ou protegido, seus efeitos colaterais no objeto como mudança de coloração, corrosão ou cristalização interna. O biocida preferencialmente deve ser biodegradável, de fácil aplicação e compatível com o material que compõe a obra. Na TABELA 2, seguem alguns exemplos de compostos químicos empregados para formulação de biocidas (ALLSOPP et al., 2004; PAULUS, 2004; RESENDE, 2008).

Tabela 2: Compostos químicos empregados nas formulações químicas de biocidas

Composto químico empregado nas formulações de biocidas						
1. Composto metálico	2. Fenólico	3. Composto quaternário de amônio	4. Composto de nitrogênio	5. Composto Sulfurados	6. Composto de nitrogênio e enxofre	7. Composto inorgânico
Naftenato e quinolato de zinco e cobre	Fenol e homólogos (fenila, creosol e timol)	Cloreto de diacildimeltiamônio	1,3,5-hexahidroxitriazina e derivados	Sulfeto de bis (2-hidroxi-5-clorofenil)	Dissulfeto de tetramiltiurano	Sais de elementos metálicos (cobre, zinco, cromo, potássio e mercúrio)
Dimetilditiocarbamato de cobre e zinco	Triclorofenol, pentaclorofenol, paracloro-metasol e diclorodihidroxidifenil metano	Cloreto de alquildimetilbenzillamônio	Salicilatos de dodecilamina	Hexaclorodimetilsulfona	Tioftalimida de N-triclorometil e derivados fluorados	
Óxido de tributina, flureto, cloreto e naftaleno	Ácido parahidroxidifenilbenzeno, laurato de pentaclorofenila	Paranitrofenol, salicilanilida	Oxazolidinas		Sulfato de hidroxiquinoleína	
Acetato fenilmercúrio			Imidazolinias		Isotiazolina	
10,10 - Oxibisfenoxarsina						
Organobóricos						

Fonte: Adaptado (ALLSOPP et al., 2004; PAULUS,2010)

Os compostos metálicos biocidas atuam na membrana celular dos microrganismos por meio de íons (partículas eletricamente carregadas). Esses íons que são liberados por esses compostos metálicos em meio aquoso, atuam na membrana plasmática, que é estrutura externa de proteção do organismo. Sem a qual, a parte interna do organismo fica exposta e sofre degradação e morte microbiana, sendo um exemplo de composto metálico o quinolato de cobre. Os compostos fenólicos com atividade biocida agem na desnaturação proteica dos componentes da parede celular microbiana, e, na ausência dessa estrutura, o conteúdo intracelular fica exposto e sofrendo degradação e morte celular, sendo um exemplo de composto fenólico o pentaclorofenol (ALLSOPP et al., 2004; PAULUS, 2004). Os quaternários de amônio são compostos catiônicos que agem inibindo a síntese proteica, ou seja, atuam diretamente na síntese da membrana plasmática, ou parede celular, provocando a destruição dessa estrutura e consequente morte microbiana, um exemplo de quaternário de amônio é o cloreto de diacildimetilamônio. Os compostos nitrogenados agem também inibindo a síntese proteica da membrana interna mitocondrial, permitindo o extravasamento de conteúdo mitocondrial e ocasionando o perecimento da célula microbiana, sendo um exemplo de composto nitrogenado a imidazolina. Compostos sulfurados também atuam na permeabilidade da membrana plasmática causando ruptura ou desintegração da mesma, ocasionando dispersão do conteúdo intracelular e morte da célula microbiana. Os compostos a base de nitrogênio e enxofre possuem ação inativando as enzimas constituintes da parede microbiana ou ocasionando a ruptura dessas estruturas das enzimas ocasionando morte celular microbiana (ALLSOPP et al., 2004; PAULUS, 2004). Os compostos mencionados acima são amplamente empregados nas formulações químicas de biocidas, desinfetantes, sanitizantes utilizados no controle do crescimento microbiano nas áreas de Microbiologia ambiental e médica (ALLSOPP et al., 2004; PAULUS, 2004).

#### 2.12 Radiações ionizantes

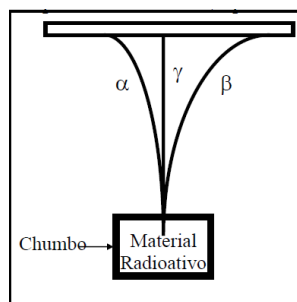
A elevada energia das radiações gama e dos raios-X possibilitam suas utilizações para diversos fins. A primeira, pode ser empregada na descontaminação de alimentos, esterilização de materiais médico-cirúrgicos (ARVANITOYANNIS, 2010), bem como na desinfestação (eliminação de insetos xilófagos), (organismos que empregam como fonte de energia celulose e hemicelulose) e desinfecção (eliminação de microrganismos contaminantes) em bens culturais colonizados (TOMAZZELO, 1994; MAGAUDA, 2004). Já a radiação de raio-X é

empregada em análises de determinação das características dos objetos artísticos (junção de estruturas como em esculturas em blocos de madeira) (TOMAZZELO, 1994; RIZZO et al., 2002; MAGAUDA, 2004; BANK et al., 2008; ARVANITTOYANNIS, 2010; SILVA et al., 2013).

Após o descobrimento dos raios-X por William Röntgen em 1895, o físico francês Henri Becquerel associou a existência desses raios, até então desconhecidos, aos materiais fosforescentes e fluorescentes, e testou uma série de substâncias com essas características. Assim, em 1896, verificou que sais de urânio emitiam radiações capazes de marcar chapas fotográficas, mesmo quando envoltas em papel preto (XAVIER et al., 2007; ARVANITTOYANNIS, 2010). Becquerel observou ainda que a quantidade de radiação emitida era proporcional à concentração de urânio e era independente das condições de pressão, temperatura ou estado químico da amostra, além de permanecer inalterada mesmo sob a ação de campos elétricos ou magnéticos. Posteriormente, o casal Pierre e Marie Curie aprofundou essas pesquisas, chegando, em 1898, à descoberta de dois novos elementos radioativos, o polônio e o rádio, tendo empregado o termo radioatividade para descrever a energia por eles emitida (XAVIER et al., 2007; ARVANITTOYANNIS, 2010).

Ernest Rutherford, em 1899, por meio de uma experiência simples contribuiu para elucidar a natureza da radioatividade. Uma amostra do material radioativo foi colocada dentro de um recipiente de chumbo contendo um orifício. A radiação produzia um ponto brilhante em uma placa de sulfeto de zinco, colocada diante do orifício. Sob a ação de um campo eletromagnético, o feixe de radiação repartia-se em três, que foram denominadas radiação alfa, beta e gama, conforme a (FIGURA 7). A radiação  $\beta$  foi posteriormente identificada como sendo constituída por elétrons. Tanto as partículas  $\alpha$  como as  $\beta$  eram emitidas com altas velocidades, demonstrando que uma grande quantidade de energia estava armazenada no átomo. Foi observado, também, que a radiação gama ( $\gamma$ ) não era desviada de sua trajetória sob a ação do campo magnético e apresentava as mesmas características dos raios-X, ou seja, uma onda eletromagnética de alta energia (ARVANITTOYANNIS, 2010).

Figura 7: Infogravura do experimento de Rutherford



Fonte: (ARVANITTOYANNIS, 2010)

Essas pesquisas permitiram concluir que a radioatividade é a transformação espontânea de um núcleo atômico, convertendo um nuclídeo em outro. O equilíbrio energético nuclear ocorre através da liberação da energia na forma de emissão de radiação alfa, beta, gama ou nêutrons (ARVANITTOYANNIS, 2010).

As radiações das partículas alfa, beta e radiações gama são formadas por ondas eletromagnéticas, que, por causa de sua alta energia, são capazes de penetrar na matéria. As radiações são processos de transferência de energia sob a forma de ondas eletromagnéticas e, ao interagir com a matéria, resultam na transferência de energia para os átomos e moléculas que estejam em sua trajetória (XAVIER et al., 2007; ARVANITTOYANNIS, 2010). Sob o ponto de vista da física, as radiações, ao interagirem com um material, podem provocar ionização, excitação, ativação do núcleo ou emissão de radiação de frenamento, conforme descrito nas etapas de ionização das moléculas dos materiais a serem irradiados, cujo processo ocorre na formação de átomos eletricamente carregados, ou seja, íons, pela remoção ou acréscimo de um ou mais elétrons. Os elétrons são deslocados de seus orbitais de equilíbrio e, ao retornarem, emitem a energia excedente sob a forma de radiação. Isso pode ocorrer pela ativação do núcleo da molécula que compõe a matéria e pela interação de radiações com energia superior à energia de ligação dos núcleos, o que provoca reações nucleares, resultando em núcleo residual e na emissão de radiação. E, por último, também pela radiação de frenamento (*Bremsstrahlung*), a qual ocorre em particular ao nível de raios-X, emitida em decorrência da perda de energia cinética de elétrons que interagem com o campo elétrico de núcleos de átomos-alvo, com elevado número atômico, ou interagem com a eletrosfera. Em decorrência das diferenças existentes entre as partículas e radiações, em suas cargas e suas massas, cada uma delas interage de modo diferente com a matéria (TOMAZZELO, 1994; ARVANITTOYANNIS, 2010).

### 2.12.1 Radiação Gama Cobalto-60

A radiação gama é obtida pela emissão de um radioisótopo, ou seja, um isótopo radioativo como o Cobalto-60, Irídio 192 ou Césio-137. É classificada como radiação energética de alta frequência, pois seu valor é superior a 10<sup>19</sup> Hertz (ciclos por segundo), frequência em que a intensidade energética é capaz de transpassar corpos opacos. A unidade de medida para atividade no sistema internacional é Becquerel. A energia transferida para o meio material é denominada Gray. A elevada energia da radiação gama possibilita seu emprego para diversos fins, seja na descontaminação de alimentos, esterilização de materiais médico hospitalares (ARVANITTOYANNIS, 2010; OSORIO et al., 2015) e, no âmbito dos bens culturais, é utilizada para a desinfestação e desinfecção de objetos colonizados (TOMAZZELO, 1994; RIZZO et al., 2002; MAGAUDDA, 2004; BANK et al., 2008; ARVANITTOYANNIS, 2010; SILVA et al., 2013).

As propriedades da matéria são afetadas pela radiação em função do tipo de processo associado à absorção de energia: excitação e/ou produção de íons, ativação nuclear ou, ainda, no caso específico de nêutrons, produção de núcleos radioativos. Os efeitos podem ser descritos em diferentes níveis, desde o comportamento do átomo isolado até as mudanças produzidas no material como um todo (BANK et al., 2008; ARVANITTOYANNIS, 2010). A irradiação de material biológico pode resultar em transformação de moléculas específicas (água, proteínas, açúcares e DNA), levando a consequências que devem ser analisadas em função do papel biológico desempenhado pelas moléculas atingidas. Os efeitos das transformações moleculares citadas devem ser acompanhados nas células, visto que estas são as unidades morfológicas e fisiológicas dos seres vivos. O DNA, por ser responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as enzimas das células, passa a ser a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos (BANK et al., 2008; ARVANITTOYANNIS, 2010).

A transferência energética de irradiação gama para o material do objeto a ser tratado ocorre devido a interação da radiação com o material irradiado, gerando moléculas reativas ou íons. Os efeitos radioquímicos imediatos sobre organismos vivos são a produção de elétrons e radicais livres, uma vez que a água é o principal componente das células, sendo responsável por cerca de 70% da composição celular e a maior parte da radiação incidente é absorvida por ela, dando lugar às espécies reativas (FIGURA 8). Os principais produtos resultantes da irradiação da água pura tendem a reagir com as bases nitrogenadas do DNA microbiano. Um resultado dessa interação pode ser a transferência de energia e excitação de grupos químicos presentes no



também está relacionada à **Taxa de Dose no ar** dada por:  $D = 0,86 \cdot X$ , onde  $X$  é a Taxa de exposição (BANK et al., 2008; ARVANITTOYANNIS, 2010).

Os valores da constante específica da radiação gama, também conhecida como “gamão”, são apresentados na (TABELA 3), abaixo:

Tabela 3: Constantes específicas de radiação gama (Gamão)

Constantes específicas de radiação gama (Gamão) RADIONUCLÍDEO	GAMÃO - (R.m <sup>2</sup> )/(Ci.h)
Sódio-22	1,20
Sódio-24	1,84
Cobalto-57	0,09
Cobalto-60	1,32
Tecnécio-99m	0,06
Iodo-125	0,004
Iodo-131	0,22
Césio-137	0,33
Irídio-192	0,48
Rádio-226 *	0,82

\* fonte envolta por 0,5 mm de platina Fonte: ARVANITTOYANNIS, 2010

A radiação gama cobalto-60 foi devidamente regulamentada no Brasil na década de 60, pelo Decreto-Lei n° 986/PR, de 21/10/1969, para aplicação à esterilização de materiais médico hospitalares e descontaminação de alimentos. Essa foi normalizada seguindo recomendações internacionais da Agência Internacional de Energia Atômica, nos padrões de segurança estabelecidos pela *World Health Organization* e *Codex Alimentarius* (WHO, 1999; FDA, 2019) e no país são fiscalizadas e inspecionadas, respectivamente, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Atualmente a padronização de qualidade na execução de procedimentos de irradiação vigente em âmbito internacional para esterilização de artigos médicos hospitalares é a ISO 11137, e para descontaminação de alimentos é a ISO 14470.

A radiação gama cobalto-60 começou a ser aplicada e testada em bens culturais infestados por insetos xilófagos na década de 50 em centros de pesquisa internacionais. Nesse mesmo período, foi verificada a sensibilidade de alguns microrganismos a esse procedimento. Notam-se na literatura estudos dispersos relacionados aos efeitos da radiação gama sobre os bens culturais e quando esses existem são voltados apenas para o estudo da resistência mecânica dos materiais (ADAMO et al., 1998, 2001, 2003; RIZZO et al., 2002; MAGAUDDA, 2004; NUNES et al., 2013; SILVA et al., 2013; MAHMOUD, et al., 2013; ADAMO et al., 2015;

BACCARO et al., 2015; GLUSZEWSKI et al., 2015). Aziz e colaboradores (2007) afirmam que a radiação gama é capaz de controlar o crescimento fúngico em diversos substratos. Há estudos que relatam o uso da irradiação gama como agente microbicida e antimicrobiano em pinturas (RIZZO et al., 2002; SILVA et al., 2013; YOON et al., 2015; SHEIKH et al., 2021). Percebe-se ainda escassez de estudos que abordem especificamente a alteração dos pigmentos e aglutinantes em materiais pictóricos após a irradiação gama, pois a estabilidade físico-química da cor (pigmento) e do aglutinante podem ser afetados pela irradiação gama (MANEA et al., 2012, MOHAMOUD, et al., 2013; BERTRAND et al., 2015; YOON et al., 2015; SHEIKH et al., 2021). O tratamento atualmente empregado na descontaminação microbiana em acervos bibliográficos é o cobalto-60 (TOMAZZELO, 1994; MAGAUDDA, 2004; VASQUEZ e NAGAI, 2020), que é obtido por meio do bombardeamento por nêutrons do isótopo estável Cobalto-59, que apresenta como característica a meia vida de 5,24 anos. A faixa de dosagem da radiação do Cobalto depende das especificações do objeto a ser tratado. Para procedimentos de desinfecção, desinfestação e/ou esterilização de dispositivos médicos, produtos e objetos por irradiação as doses podem compreender de 5,0 kGy até 25,0 kGy (WHO 1999; AZIZ, et al., 2007; FDA, 2019). Para o controle de infestação por insetos em livros são necessárias doses de radiação relativamente baixas, da ordem de 0,2 kGy a 0,5 kGy. Para a eliminação de fungos as doses variam entre 3 kGy a 12 kGy (TOMAZZELO, 1994; RIZZO et al., 2002; MAGAUDDA, 2004; BANK et al., 2008; SILVA et al., 2013; ADAMO et al., 2015; BACCARO et al., 2015; GLUSZEWSKI et al., 2015; SHEIKH et al., 2021).

### 3 JUSTIFICATIVA

A ocorrência de microbiodeterioração em bens culturais representa sérios danos e riscos à preservação do patrimônio cultural, principalmente de pinturas, pois essas possuem substratos ricos em camadas pictóricas que podem servir como fonte energética para microrganismos. A perda dos materiais e características histórico-artísticas dos objetos aos quais os microrganismos estão associados resulta em prejuízos culturais e econômicos incalculáveis para a sociedade. Os fungos podem utilizar um largo espectro de nutrientes para seu crescimento tal como pigmentos, adesivos, vernizes e aglutinantes (substâncias presentes em pinturas).

A obra “Frevo”, um painel à óleo, de autoria de Cândido Portinari, integra o Conjunto Arquitetônico Paisagístico da Pampulha, encomendado por Juscelino Kubistchek em 1940 a Niemeyer. O complexo paisagístico da Pampulha juntamente com os bens culturais que o integram receberam o título da UNESCO de patrimônio cultural da humanidade, fato que enfatiza a necessidade de preservação do principal ponto turístico belo-horizontino. Logo, se faz mister a preservação desse complexo paisagístico (e os bens que o integram) para Belo Horizonte, MG, para o Brasil e para a comunidade mundial, pois fomentam o turismo cultural, que é uma atividade importante economicamente para a população. Essa atividade econômica sofre declínio quando há má conservação do patrimônio cultural, além das consequências da biodeterioração avançada que ocasionam danos irreparáveis aos bens culturais. Em consequência desses danos surge a demanda por realização de restauração, atividade onerosa e que resulta em embargos às visitas turísticas.

A biodeterioração, especificamente a microbiodeterioração, que ocorre em bens culturais, tem chamado atenção dos pesquisadores nos últimos anos, devido à necessidade de entender seus processos e mecanismos para a proposição de métodos de controle do crescimento microbiano e descontaminação das superfícies desses bens. Porém, há um quantitativo limitado de estudos de microbiodeterioração aplicada a pinturas no Brasil, principalmente no que tange ao uso da radiação gama cobalto-60 como agente descontaminante e/ou preservante. Logo, o estudo dos fungos colonizadores de pinturas com ênfase na pesquisa microbiológica e o estudo físico-químico dos materiais empregados no objeto cultural pesquisado integram ações adequadas para o controle do crescimento e da proliferação desses microrganismos. Sendo assim, tão importantes no âmbito da ciência da conservação curativa quanto da preventiva no que tange ações para preservação do objeto cultural e sua salvaguarda.

Assim, nota-se a necessidade de estudos que prospectem os fungos, compreendam os mecanismos de deterioração desses nos substratos das pinturas, que busquem processos/métodos para o controle do crescimento microbiano, como a desinfecção por radiação cobalto-60. Além disso, há a necessidade de que essas pesquisas avaliem, ainda, a interação desse tratamento com os materiais (substratos) pictóricos. Nesse sentido, o presente trabalho pretende contribuir para o entendimento dos processos de microbiodeterioração fúngica, do método de controle do crescimento microbiano pelo emprego da radiação cobalto-60, como agente descontaminante, e buscar uma faixa de dosagem (mínima e máxima) adequada para descontaminação e controle do crescimento fúngico que ocasione danos

mínimos ao material pictórico, contribuindo para a salvaguarda das pinturas consideradas patrimônio cultural. Um aspecto importante desse trabalho é a possibilidade de aplicabilidade desse método científico integrado que busca o conhecimento físico-químico do substrato da obra, e o conhecimento dos microrganismos associados a obra para então propor métodos de descontaminação e de controle adequados em outras pinturas e outros bens culturais, tais como acervos gráficos documentais e históricos, acervos em tecido como vestes, acervos em esculturas, acervos filmicos e acervos em diversos substratos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar os efeitos da radiação gama (cobalto-60) na comunidade fúngica a partir dos isolados obtidos da pintura “Frevo” de Cândido Portinari, como estudo de caso.
- Investigar a composição da camada pictórica da obra através de técnicas analíticas físico-químicas empregadas nas microamostras pictóricas da pintura original.
- Realizar testes de susceptibilidade antifúngicas dos isolados encontrados na obra a partir de componentes identificados em exames realizados nos microfragmentos da obra original.

### 4.2. Objetivos específicos

- Analisar a diversidade dos fungos através de método direto (isolamento) e cultivo;
- Analisar a composição do substrato pictórico por métodos físico-químicos não destrutivos por técnicas tais como (espectroscopia de Infravermelho, Raman e Microscopia eletrônica de varredura) afim de propor tratamento para a descontaminação microbiana compatível com substrato pictórico;
- Realizar testes antimicrobianos *in vitro* com compostos puros (encontrados nos exames físico-químicos realizados) frente aos isolados fúngicos identificados na obra;
- Realizar testes de perfil enzimático com meios contendo diversas fontes de carbono para analisar a atividade enzimática dos isolados fúngicos da obra em diferentes meios sólidos;
- Realizar testes de submissão de irradiação gama com os isolados fúngicos identificados na obra propondo uma faixa de dosagem de radiação gama cobalto-60 (mínima e máxima) permissível para desinfecção e o controle do crescimento fúngico que ocasione danos mínimos na camada pictórica dos fragmentos.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Caracterização da pintura

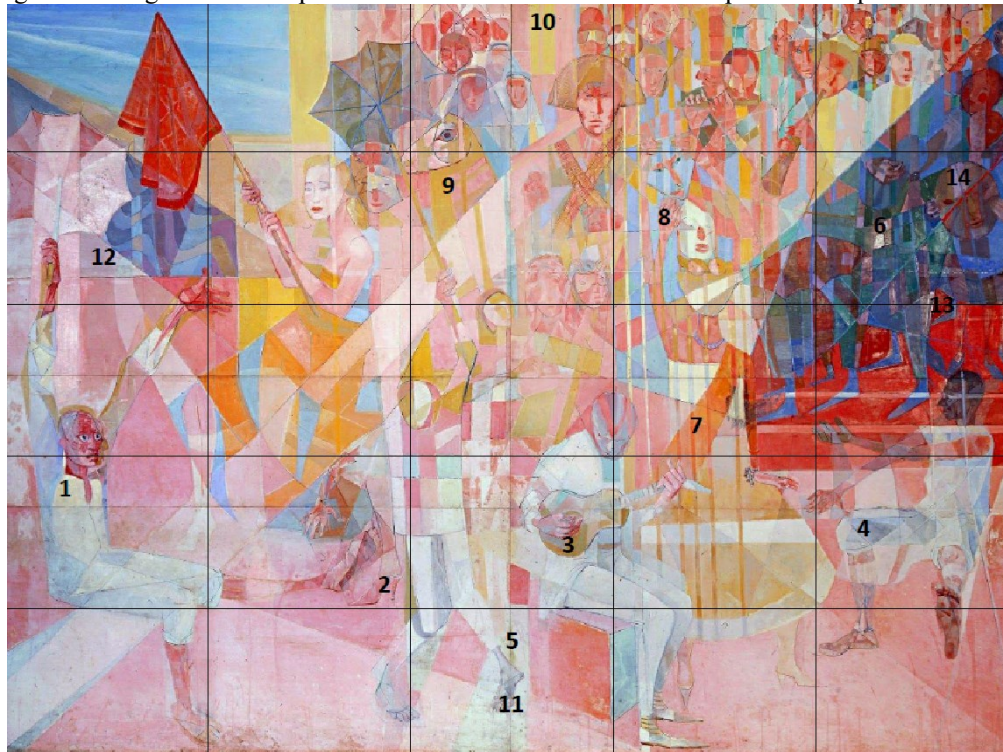
#### 5.1.1 Exames globais: organolépticos

Os exames organolépticos foram realizados na pintura para a percepção de suas características de fabricação por meio dos sentidos humanos. Foram observadas as cores, o brilho e a textura para avaliar o estado de conservação da obra (GOMEZ, 2005). Esses exames foram os primeiros realizados na pintura, para a observação de detalhes da fabricação e técnicas empregadas na pintura. Estes foram executados com o auxílio de uma lupa binocular a luz visível para averiguar o diagnóstico do estado de conservação da obra.

#### 5.1.2 Coleta dos fragmentos pictóricos na obra “Frevo”

Foram coletados 14 fragmentos pictóricos, em locais onde havia desprendimentos ou perdas das camadas de tinta, com auxílio de bisturi nº 11. Os fragmentos foram armazenados em microtubos de plástico estéreis e acondicionados em local limpo, com baixa luminosidade e arejado, para posterior realização de análises físico-químicas. De um total de 14 fragmentos coletados, 11 pertencem a área não terminada e 3 a parte terminada pelo artista. Dentre as últimas amostras, uma refere-se a área de restauro da obra “Frevo”. O mapeamento das áreas de coleta é detalhado (FIGURA 9).

Figura 9: Fotografia com mapeamento detalhado das áreas de coleta pictórica na pintura “Frevo”



Fonte acervo da autora

### 5.1.3 Corte estratigráfico dos fragmentos e microscopia óptica

Dentre as 14 microamostras que foram retiradas em locais de perda da camada pictórica, foram selecionadas para o estudo, 3 amostras da área terminada (6, 13 e 14) e três da área não terminada (5, 10 e 12) pelo artista para realizar os cortes estratigráficos. Esses cortes estratigráficos das 6 microamostras possuíam escalas e tamanhos que variaram entre dimensões micrométricas e milimétricas. Os fragmentos analisados foram visualizados ao microscópio com objetivas de 50x e 100x de aumento para a visualização. A resolução das imagens obtidas dos fragmentos e cortes foram 1804 x 1368 pixels, possibilitando a visualização das camadas e dos estratos conforme estudado pelos químicos MATTEINI; MOLLES, 2001.

Para a realização dos cortes estratigráficos, as 6 amostras foram inseridas individualmente em uma matriz plástica composta por uma resina acrílica autopolimerizante transparente. Primeiramente separa-se um recipiente que é o molde. Foram separados microtubos tipo *ependorf* cortados ao fundo. Logo em seguida posicionou-se o fragmento pictórico na posição que pretende observar as camadas ao microscópio na tampa dos microtubos, fixou-se o fragmento com cola (foi usada a cola epóxi Loctite Super Bonder Power Flex Gel Control), depois misturou-se a resina com endurecedor na proporção 2 por 1, ou seja,

50 g de resina para 25 g de endurecedor (Avipol resinas), verteu-se a resina misturada no molde com o fragmento pictórico. A polimerização ocorre após 24hs, após essa fase realizou-se a retirada do molde, e, em seguida realizaram-se polimento com auxílio de lixas finas com diferentes gramaturas, para somente então as amostras serem submetidas à observação e estudo ao microscópio óptico Olympus para observar as sequências morfológicas das camadas pictóricas e seus estratos (DQ/ICEX/UFMG). Já o registro de aquisições de imagens fotográficas dos fragmentos e de suas respectivas estratigrafias foram realizadas empregando microscópio Leica DM 4500, com câmera fotográfica da Nikon D60 acoplada, e o software empregado foi o *Las Core* versão 4.6, utilizando a luz transmitida do equipamento pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG. A formatação/edição das imagens foi realizada no programa Gimp 2.1 GNU.

#### 5.1.4 Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros no IV foram obtidos pela passagem da radiação IV através da amostra e pela determinação da radiação incidente absorvida, sendo a energia absorvida foi menor que  $0,4 \mu\text{w}$  conforme recomendado (SKOOG et al., 2006; LEITE, 2008; VAHUR et al., 2009). A energia de cada banda no espectro de absorção no IV correspondeu à frequência de vibração de uma parte da molécula da amostra analisada. A conversão do interferograma para espectro foi obtida pelo tratamento matemático com transformadas de Fourier, realizadas automaticamente pelo equipamento de espectroscopia no IV.

A técnica de espectroscopia no IV foi empregada no modo ATR (reflectância total atenuada), em que as amostras sólidas (microfragmentos pictóricos) foram posicionados individualmente sobre um acessório denominado Micro ATR de cristal (seleneto de zinco ângulo de incidência de  $45^\circ$ , área do cristal de  $500\text{mm}^2$ , com obtenção de 12 reflexões) opticamente denso cujo índice de refração possui valor alto (entre 2,38 e 4,01) com objetivo de exercer maior contato (BUFFETEAU et al., 1996; SKOOG et al., 2006; BRACCO & HOLST, 2013). A radiação produzida e direcionada a um ângulo específico pelo equipamento passou através do cristal em direção a cada amostra analisada que foi totalmente refletida em sua superfície interna (BUFFETEAU et al., 1996; VAHUR et al., 2009). Dessa maneira, o feixe de luz penetrou nas camadas finas da superfície de cada amostra absorvente ( $0,5$  a  $5 \mu\text{m}$ ) que sofreu perda de energia nos comprimentos em que o material absorveu. A intensidade da radiação foi atenuada devido às múltiplas reflexões ao longo do tamanho da amostra, ou seja, ocorreu a

mensuração da reflectância total atenuada, e um espectro da superfície de cada amostra foi detectado pelo interferômetro de alumínio cuja bancada ótica é selada e dessecada com CsI (iodeto de césio), e assim os espectros foram reproduzidos para serem analisados posteriormente de forma minuciosa (BUFFETEAU et al., 1996; VAHUR et al., 2009).

Foram obtidos espectros no IV, no modo ATR, de 6 amostras da pintura “Frevo”, sendo 3 da área acabada e 3 da área não acabada, tanto na frente como no verso dos microfragmentos, para pesquisar aglutinantes, pigmentos da base de preparação e da camada pictórica no equipamento *Perkin Helmer FT-IR Spectrum GX*, pertencente ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (DQ/ICEx/UFMG). O equipamento FT-IR foi usado na faixa de 225 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , foram realizados 64 *scans* em cada microfragmento. Os resultados foram analisados no programa *Spectrum* versão 5.3.1. Adicionalmente para o tratamento dos dados qualitativos obtidos ao exame IV foi empregado o *Software R* versão (4.1.3), empregando-se ainda as extensões *ggplot 2* (3.3.6) e *reshape 2* (1.4.4.) que produzem um gráfico que representa esses resultados.

#### 5.1.5 Espectroscopia Raman

A técnica de espectroscopia Raman foi empregada para a caracterização dos pigmentos, é amplamente utilizada em Química Analítica para análises de pinturas em cavalete, painel e mural de diferentes épocas (SALA, 1996; OLIVEIRA et al., 1998; LEITE, 2008). O comprimento de onda da sonda que é uma fonte de laser diodo, situou-se em 632,8 nm, de um laser de He-Ne, refrigerado a ar, cuja potência empregada foi baixa (abaixo de 0,4  $\mu\text{W}$ ), sendo que a faixa que o equipamento permite é entre 0,100  $\mu\text{W}$  e 1,000 mW, e a faixa de deslocamento Raman realizadas de 60 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Os raios lasers emitidos pela fonte diodo ao atingirem o material foram espalhados pelo mesmo, gerando luz de energia diferente da incidida: esse evento é conhecido como efeito Raman (OLIVEIRA et al., 1998; LEITE, 2008). As amostras foram então manipuladas em microscópio monitorizado acoplado BX 41 com estágios X, Y e Z. Esse equipamento possui ainda lentes de aumento de 50x e 100x que permitiram resolução espacial de 10  $\mu\text{m}$  no que tangem às análises dos fragmentos.

Os 6 fragmentos foram analisados em espectrofotômetro Raman *WITEC Alpha 300 RA* e as imagens e espectros detectados por leitor CCD do mesmo equipamento no Laboratório de Caracterização e Processamento de Nanomateriais pertencente ao Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil (LCPNANO/DF/ICEx/UFMG).

Os resultados foram analisados no software da *Witec* 4.1 para identificar o deslocamento Raman dos compostos químicos presentes nos materiais pictóricos da obra de Portinari tais como pigmentos e aglutinantes. Para o tratamento dos dados qualitativos obtidos ao exame Raman foi empregado o *Software R* versão (4.1.3), empregando-se ainda as extensões *gg plot 2* (3.3.6) e *reshape 2* (1.4.4.) que geram um gráfico ilustrativo dos resultados encontrados.

#### 5.1.6 Microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura foi empregado para a avaliação microestrutural e produção de imagens em alta resolução (até 300.000 x de aumento). Os feixes de elétrons foram transmitidos por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), após a aplicação de uma diferença de potencial que variou de 0,5 a 25 KV (MANNHEIMER, 2002; GOLDSTEIN et al., 2003), permitindo a variação da aceleração dos elétrons e provocando o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atraiu fortemente os elétrons gerados, resultando em uma aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes foi realizada pelas lentes condensadoras que alinharam os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajustou o foco dos feixes de elétrons antes deles atingirem as amostras analisadas e produziu imagens das superfícies analisadas fornecendo ainda informações sobre suas topografias, e, o equipamento no modo EDS (espectroscopia por energia dispersiva) possibilitou análises químicas elementares (mapa químico), ou seja, possibilita análises de composição elementar de amostras.

As amostras (5, 10 e 12) e (6, 13 e 14), foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura de feixe duplo *FEI Quanta 3 D* (SEM-EDS) que atuou no modo baixo vácuo 15 Pa equipado com um espectrômetro de energia dispersiva e câmera de vácuo acoplada cuja capacidade de magnificação foi 300.000 x. Para a maioria das análises elementares dos fragmentos pictóricos (heterogêneos) foi aplicada a corrente de feixe de 50 nA e tensão de aceleração de até 25 kV, porém, para a maioria das análises, o equipamento foi operado com feixe de 15 kV. O diâmetro do feixe foi focado em cerca de 1 nm, para melhorar a condutividade da superfície. Os fragmentos foram fixados em *stubs* de alumínio e cobertos com fita adesiva dupla face de carbono, com objetivo de caracterização físico-química, por detector de elétrons retroespalhados e secundários e topográfica das superfícies pictóricas dos fragmentos. As imagens produzidas também foram detectadas por leitor SSD, equipado ainda com analisador multicanal com 2048 canais (10 eV/canal). Os experimentos e as análises elementares foram

realizados em 2 pontos de cada amostra no equipamento *FEI Quanta 3 D* (SEM-EDS) no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil (CM/UFMG). Para tratamento dos dados qualitativos obtidos ao MEV foi empregado o *Software R* versão (4.1.3), empregando-se ainda as extensões *gg plot 2* (3.3.6) e *reshape 2* (1.4.4.) que produzem um gráfico representativo desses resultados.

## 5.2 Caracterização dos fungos em pinturas

### 5.2.1 Fotografia à luz visível

O exame à luz visível consistiu na avaliação do objeto artístico à luz visível (faixa de 380 nm a 780 nm do espectro eletromagnético da partícula da luz) que incidiu diretamente na obra, e foi registrada por uma câmera fotográfica profissional Nikon D60 (GOMEZ, 2005). Esse exame é utilizado para o conhecimento das características formais e estilísticas da obra, e para a avaliação detalhada do estado de conservação (presença de craquelês, ranhuras, biodeteriorações e biofilmes). Alguns registros fotográficos foram realizados posteriormente com auxílio de uma câmera fotográfica 48MP QUAD CÂMERA integrada ao celular Android modelo Redmi\* Note versão 8, tais como as micro deteriorações e biofilmes na superfície pictórica da pintura “Frevo”.

### 5.2.2 Coleta de amostras microbiológicas

Foram coletadas 25 amostras microbiológicas com auxílio de *swabs* embebidos em água destilada estéril, pelo método do esfregaço na superfície pictórica com movimentos uniformes, alternando o lado do *swabs* que tocavam a pintura carreando o máximo de células microbianas (FIGURA 10), em 25 quadrantes que compõem a superfície da pintura “Frevo”, de autoria do artista Cândido Portinari conforme mapeamento (FIGURA 11). As hastes desses foram cortadas com tesoura seca e previamente desinfetada com álcool 70 ° INPM, os *swabs* acondicionados em tubos (*ependorfs*) e transportados em suporte em caixa térmica contendo gelo seco a temperatura -78°C e levadas para laboratório. Essas amostras foram coletadas no dia 16/04/15 e 06/04/18, para a pesquisa bioprospectiva preliminar em 2015, e, segundo para a pesquisa do projeto de doutorado, com o objetivo de avaliar a sucessão ecológica dos fungos nesse período. Foram aferidos os dados meteorológicos da estação climática operante em Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais n ° (OMM: 83587), cujas coordenadas geográficas são de Latitude (graus):-19.93, Longitude (graus): -43.93, Altitude e (metros): 915.00, do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Esses dados coincidem com a geolocalização do bairro

onde situa-se a obra “Frevô”. As amostras coletadas foram mantidas a 4°C em geladeira até o processamento no Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Bloco J4/ Sala 158/ LBMCF/ICB/UFMG).

Figura 10: Fotografia da coleta microbiológica na superfície da pintura “Frevô”



Fonte: acervo da autora, 2018

Figura 11: Fotografia com mapeamento das áreas de coleta microbiológica na pintura “Frevô”



Fonte: acervo da autora, 2015

### 5.2.3 Isolamento dos fungos cultiváveis

O isolamento dos fungos cultiváveis foi realizado a partir das amostras coletadas, com o auxílio de *swabs* na superfície da pintura “Frevo” de Portinari, nos locais parcialmente colonizados por fungos, e nos locais não colonizados por fungos. O processamento dessas amostras foi realizado pela técnica de diluições seriadas. Cada amostra foi homogeneizada em 1 mL de solução salina a 0,85%, que posteriormente, foi transferida para um tubo com 9 mL de soro fisiológico. A segunda diluição ( $10^{-2}$ ) foi realizada transferindo-se 1 mL da diluição de ( $10^{-1}$ ) contendo 9 mL de salina e assim sucessivamente até  $10^{-3}$ . As amostras foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata- dextrose- ágar) (HIMEDIA) com cloranfenicol à 1%. De cada diluição foi retirada uma alíquota de 0,2 mL e realizada a semeadura na superfície do meio solidificado, realizou-se o espalhamento com alça de Drigalski. As placas foram incubadas por 14 dias à 28° C (SIDRIM, 2004; ZAITZ, 2010). Após o crescimento das colônias procedeu-se o isolamento observando-se as colônias morfológicamente semelhantes através de repicagens com auxílio de alças estéreis. O isolamento dos fungos foi importante na determinação da presença desses microrganismos no ambiente, no caso na superfície pictórica (BROCK et al., 2010; SIDRIM et al., 2004; ZAITZ, 2010).

### 5.2.4 Seleção macromorfológica das colônias e micro cultivos

Foi realizada a observação macroscópica dos cultivos das amostras coletadas: tamanho das colônias, aspecto se pulverulento ou cotonoso, leveduriformes (aspecto cremoso), além do crescimento. As colônias leveduriformes podem apresentar o crescimento limitado, enquanto, as colônias filamentosas podem apresentar crescimento invasor (BROCK et al., 2010; SIDRIM, 2004). O tempo de crescimento das colônias pode variar sendo considerada rápido (< 7 dias) e intermediário (8 a 14 dias) (SIDRIM, 2004). Em relação às colônias obtidas observou-se textura, pigmentação, topografia, aspecto das bordas, cor, diâmetro e tempo de crescimento. Esses parâmetros auxiliaram na identificação presuntiva das espécies fúngicas. O meio empregado foi BDA (Batata- dextrose- ágar) (HIMEDIA) acrescido de cloranfenicol a 1% (SAINTSUN PHARMA), os isolados foram incubados por 14 dias em estufa a 28° C.

Foram realizados microcultivos dos isolados em duplicata e incubados a 28° C conforme a técnica de RIDELL, 1970, por 14 dias. Os morfotipos isolados foram visualizados em luz

transmitida ao microscópio Olympus, lente de aumento de 40x e 100x. Primeiro procedeu-se a visualização, e posteriormente a identificação das estruturas reprodutivas com emprego do corante lactofenol/azul de algodão para todos os isolados.

#### 5.2.5 Extração dos DNAs dos isolados

Após o crescimento dos isolados, os DNA(s) desses, foram extraídos individualmente conforme descrito por SCHABEREITER-GURTNER et al., 2001, utilizando o FastDNA Spin Kit (*Mp Biomedicals*, Lote: 103927). Um volume de 200 µL da amostra de cada isolado foi suspenso em 1 mL de tampão de lise (Tris pH 8,0 200 mM, EDTA 50 mM, NaCl 200 mM, Citrato de Sódio 2 mM e Cloreto de Cálcio 10 mM) contendo 20 mg/mL de lisozima. As amostras foram incubadas a 37°C durante 1 hora com agitação periódica. Proteinase K (1 mg/mL) e o SDS (dodecil sulfato de sódio) (0,3%) foram então adicionados e a mistura foi incubada por mais 30 min a 70°C. As amostras foram centrifugadas a baixa rotação em microcentrífuga por 2 minutos na presença de 3% de SDS e 0,5 g de micro pérolas de vidro com 0,1 mm de diâmetro. O lisado foi então tratado com RNase por 20 min a 37 °C. As proteínas foram precipitadas a partir de 200 µL da fase aquosa da solução com 200 µL de isopropanol. Os *pellets* de DNA(s) foram lavados com etanol 70% e suspensos em uma solução de 50 µL de 10mM de Tris e 1 mM de EDTA em pH 8,0.

Após a extração, a verificação da qualidade e quantidade dos DNAs obtidos foram mensurados em espectrofotômetro *Nanodrop 1000ND* (*Thermo Scientific*, USA) e, em seguida, foram verificadas em eletroforese em gel de agarose por 20 min à voltagem de 100 v.

#### 5.2.6 Reação em cadeia da polimerase

Para todos os isolados foi realizada a reação em cadeia da polimerase PCR, contendo 2 µL de cada amostra de DNA (aproximadamente 50 ng de DNA). A reação de PCR foi realizada utilizando o Kit KAPA Taq HotStart em volume final de 50 µL, contendo 10 µL de tampão 5x KAPA, 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de DNTP (10mM), 1 µL de primer ITS5 (10 pmol), 1 µL de primer ITS4 (10 pmol), 1 µL de DMSO (absoluto), 1,5 µL de BSA (1µg/µL), 5 µL de betaina (5M), 0,2 µL de Taq (5U/µL), 25,3 µL ddH<sub>2</sub>O, e 1 µL de DNA. A reação de PCR foi realizada em termociclador Biocycler e Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), com a seguinte programação: desnaturação inicial: 94°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação:

94°C por 1 min, anelamento: 58 °C por 1 min, extensão: 72°C por 1 min e extensão final: 72°C por 5 min. Para verificar se o fragmento de interesse foi amplificado, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% utilizando o tampão TBE 0,5x (Tris-Borato EDTA 0,5 M pH 8,0) com adição de brometo de etídeo. Todas as amostras amplificadas foram purificadas utilizando EDTA 125 mM, etanol 70%, e etanol absoluto. Para o procedimento de purificação, 45 µL do produto de PCR amplificado foi misturado com 11,25 µL de EDTA e 135 µL de etanol absoluto, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 rpm por 25 min a 4°C, em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, 120 µL de etanol 70% foram adicionados aos tubos e estes foram homogeneizados por inversões sucessivas e centrifugados a 13.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi evaporado durante 20 min a uma temperatura de 37°C. O DNA foi ressuspendido em 10 µL de água Milli-Q autoclavada e incubado a 37°C por 20 min. Os produtos de PCR resultantes foram purificados usando o High Pure PCR Template Preparation Kit (*Roche*, Lote:21538900), seguindo o protocolo proposto pelo fabricante. Após a purificação, 100 ng de DNA genômico de cada amostra extraída foi enviada para sequenciamento em empresa especializada.

### 5.2.7 Sequenciamento

O sequenciamento do DNA dos isolados foi realizado a partir dos produtos das ampliações por PCR, utilizando os iniciadores das extremidades ITS5 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990). Cada reação de sequenciamento foi realizada em um sequenciador automático DNA sequencer ABI3730TM (Applied Biosystems) da empresa Myleus Biotechnology. Todas as sequências obtidas foram editadas e as sequências consenso geradas no software Geneious® 9.0.5. As sequências consenso obtidas foram submetidas e analisadas aos programas Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponível em ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) para comparação e identificação por análise de similaridade com o banco de dados (nr) Genbank do NCBI. As análises foram feitas comparando-se as sequências depositadas no banco de dados citado com as sequências obtidas nesse trabalho. Para o tratamento dos dados qualitativos obtidos foram propostos gráficos do tipo Diagrama de Venn para análises de famílias, espécies e gêneros encontrados. Para plotar esses gráficos foi empregado o *Software R* versão (4.1.3), adicionalmente foram necessários os pacotes de extensões *venn* (1.10) e *gg plot 2* (3.3.6) que geram gráficos que ilustram os resultados.

### 5.2.8 *Screening* enzimático

Para realização do *screening* enzimático foram selecionados os 14 isolados fúngicos identificados anteriormente. Primeiramente esses isolados foram transferidos, em capela de fluxo laminar em técnica asséptica com auxílio de canudo estéril. Um plug de micélio de cada isolado, foi colocado no centro da Placa de Petri contendo BDA (Batata- dextrose- ágar) (HIMEDIA) acrescido de cloranfenicol a 1% (SAINTSUN PHARMA), foram incubadas por 5 dias em estufa a 28° C. Posteriormente após crescimento os isolados foram utilizados para *screening* enzimático em meio contendo fontes de carbono para verificação da produção das enzimas pelos fungos isolados em triplicatas técnicas.

A composição do meio preparado com fonte de carbono para expressão da enzima celulase foi carboximetilcelulose de baixa viscosidade (Sigma, EUA) (YNB 0,67g. L<sup>-1</sup>, celobiose 0,05g. L<sup>-1</sup>; agar: 20,0 g.L<sup>-1</sup>; CMC: 5,0 g.L<sup>-1</sup>; água destilada). A reação positiva para a celulase foi realizada após 5 dias de incubação dos isolados em estufa a 28° C, o meio e os isolados foram revelados com 10 mL de solução corante de vermelho congo (Vetec) (2,5 g.L<sup>-1</sup>). Após 15 min, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 10 mL de solução de NaCl 1 mol. L<sup>-1</sup>. Aguardou-se por período de 15 minutos para a mensuração dos halos e colônias.

Para a verificação da produção da enzima lipase foi preparado um meio com os reagentes da (Sigma, EUA) (2,5 g peptona g. L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 1,25g g. L<sup>-1</sup>, ágar 2g, tributyrin 1g g. L<sup>-1</sup>; água destilada, pH 6,0). A reação enzimática positiva para lipase foi realizada após 5 dias de incubação dos isolados em estufa a 28° C. Esta ocorre pela formação de zonas claras ao redor da colônia decorrente da degradação do sal do ácido gorduroso (HANKIN, ANAGNOSTAKIS, 1975; CARDENAS et al., 2001; FERNANDES, 2009).

Para o ensaio da enzima ligninase foram empregados os reagentes (Sigma, EUA) (2,5 g peptona g. L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 1,25g g. L<sup>-1</sup>, ágar 2g; água destilada) acrescidos de 0,01% de corante Azul brilhante de Remazol (RBBR) (Sigma, EUA). A reação enzimática positiva para ligninase também foi realizada após 5 dias de incubação dos isolados em estufa a 28° C, que ocorre pela formação de zonas claras em volta da colônia em razão da degradação da lignina.

Para a realização do ensaio da enzima xilanase (Sigma, EUA) foram utilizados (YNB 0,67g. L<sup>-1</sup>, xilana 0,05g. L<sup>-1</sup>; ágar: 20,0 g.L<sup>-1</sup>; água destilada). A reação positiva para a xilanase foi realizada após 5 dias de incubação dos isolados em estufa a 28° C, o meio e os isolados foram revelados com 10 mL de solução triiodeto de potássio, ou seja, com lugol, cuja fórmula química é (I<sub>3</sub>K) (Sigma, EUA). A reação enzimática positiva para xilanase ocorre pela formação de zonas claras em volta da colônia em função da degradação da xilana.

Foram feitos três controles para cada ensaio de descoloração de cada isolado. No primeiro a enzima foi substituída por água destilada estéril e no segundo, manteve-se o volume da enzima empregada como tampão, no caso da lipase, e substituiu-se o corante quando necessário por água destilada estéril, por último o controle de crescimento do inóculo. A produção enzimática foi evidenciada pela formação de halos alaranjados ou translúcidos ao redor das colônias com a necessidade ou não de solução reveladora para visualização dependendo da metodologia.

A leitura do ensaio *screening* enzimático foi realizado após 5 dias do período de incubação dos isolados fúngicos a 28°C em estufa. Para a mensuração empregou-se um paquímetro digital de alta precisão cuja faixa de mensuração de 0-150 mm, previamente calibrado, da marca Vernier, o experimento foi realizado em triplicata biológica para cada espécie, e, ainda foi realizado o controle positivo em que se verificou a viabilidade dos inóculos, e controle negativo em que se averiguou o controle de esterilidade dos meios empregados.

Para analisar o potencial enzimático dos isolados testados utilizou-se como parâmetro o índice enzimático (IE), determinado pela equação  $IE = Dh/Dc$ , em que Dh compreende o diâmetro em milímetros (mm) do halo de hidrólise e Dc corresponde ao diâmetro em (mm) das colônias dos isolados fúngicos. Esse índice foi proposto por pesquisadores (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; OLIVEIRA et al., 2006) e é amplamente empregado para triagem de microrganismos produtores de enzimas em meio sólido. Por esse cálculo é possível inferir que aqueles microrganismos que apresentarem índice enzimático altos são aqueles que produziram maior quantidade de enzimas nos meios testados (OLIVEIRA et al., 2006). Para o tratamento dos dados qualitativos e quantitativos obtidos foi proposto gráfico *box plot*, para realizar esse foi empregado o *Software R* (versão 4.1.3), utilizando-se ainda os pacotes de extensões *gg plot 2* (3.3.6) e *reshape 2* (1.4.4) que produzem um gráfico que expressa os resultados obtidos com esse ensaio *screening* enzimático.

### 5.2.9 Avaliação do potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados de Portinari frente aos componentes identificados na composição de pigmentos e aglutinantes encontrados na obra Portinari

A atividade antimicrobiana pode ser mensurada determinando-se a quantidade mínima de um agente que é necessária para inibir o crescimento de um microrganismo, essa quantidade é denominada concentração inibitória mínima (CIM). Essa susceptibilidade antifúngica foi realizada frente aos 14 isolados identificados da pintura original de Portinari. Essa característica de susceptibilidade foi avaliada pelo método da microdiluição em caldo, descrito no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (M38-A2, CLSI, 2008) para fungos filamentosos, e (M27-A3, CLSI, 2008) para fungos leveduriformes, frente a 14 componentes identificados na composição das camadas pictóricas da obra de Portinari. Esses compostos foram testados em diferentes concentrações, em sua maior parte encontravam-se em pureza analítica, exceto os que foram no presente texto nomeados (aplicação exclusiva em obras de arte), e os quais na maior parte foram doados pelos docentes do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG para realização desse ensaio. Foram testados: V1 / óleo de linhaça (aplicação exclusiva em artes) ( $C_{18}H_{32}O$ ) (Winsor & Newton), V2 / carbonato de cálcio impuro (aplicação exclusiva em artes) ( $CaCO_3$ ) (Armazém das Artes), V3 / dióxido de Ferro (aplicação exclusiva em artes) ( $Fe_2O_3$ ), V4 / óxido de Ferro (aplicação exclusiva em artes) ( $FeO$ ) (Morgan Pigmentos), V5 / carbonato de cálcio puro ( $CaCO_3$ ) (Synth), V6 / dióxido de zinco ( $ZnO_2$ ) (Merck), V7 / trióxido de zinco ( $ZnO_3$ ) (Baker), V8 / sulfato e bário ( $BaSO_4$ ) (Synth), V9 / sulfato de cálcio ( $CaSO_4$ ) (Vetec), V10 / dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) (Vetec), V11 / dióxido de chumbo ( $PbO_2$ ) (Merck), V12 / azul de cobalto (aplicação exclusiva em artes) ( $CoAl_2O_4$ ) (ICROM), V13 / óxido de zinco (aplicação exclusiva em artes) ( $ZnO$ ) (Kremer), V14 / azul ultramar (aplicação exclusiva em artes) ( $Na_6Al_6Si_6O_{24}S_2$ ) (Kremer).

Os isolados da pintura em estudo foram subcultivados em BDA, por 7 dias a 28°C. A cultura de cada fungo foi suspensa em 1 mL de solução salina 0,85% estéril com tween 20 para a decantação das hifas (no caso dos fungos leveduriformes) e em seguida transferida para um tubo contendo 3mL solução salina estéril. A absorbância das suspensões foi ajustada para 0,09 a 0,17A em espectrofotômetro a 530nm, seguidos de diluição na proporção 1:50 em caldo batata (Sigma-Aldrich) para os fungos filamentosos, e diluição na proporção 1:50 seguido de 1:20 em Caldo Batata (Sigma-Aldrich) para os fungos leveduriformes para obter a concentração  $4 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células/mL (CLSI, 2008). A cada orifício teste de uma placa de microdiluição de 96 poços foram acrescentados 100  $\mu$ L de inóculo fúngico. O mesmo volume foi acrescentado nos

orifícios relativos ao controle de crescimento e de toxicidade do solvente. Para o teste de concentração inibitória mínima (CIM) dos componentes da parte pictórica carbonato de cálcio, óxido de ferro, dióxido de ferro, óxido de zinco, dióxido de zinco, trióxido de zinco, sulfato e bário, sulfato de cálcio, dióxido de titânio, dióxido de chumbo, azul de cobalto, azul ultramar, em todas as diluições foram realizadas em água destilada estéril, a solução estoque preparada foi de 0,1M, e concentração de aplicação nos testes de 0,01M. A concentração de solução estoque do óleo de linhaça foi 10mg/mL e concentração de testagem de 1mg/mL. O Captan (Sigma-Aldrich) foi utilizado como controle positivo para fungos filamentosos, diluído em água conforme recomendações, a solução estoque foi 48g/L e a concentração empregada foi 0,01M, e a Nistatina (Bristol-Myers Squibb) a partir de uma solução estoque de 10mM e a solução empregada para testagem de 1mM, esses valores foram determinados pelos testes de microdiluição antifúngica proposto pelo documento M38-A2, do *Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI* (2008). As soluções estoques foram diluídas em meio o caldo batata (Sigma-Aldrich) e da levedura em caldo Sabouraud (Sigma-Aldrich). As diluições foram obtidas de forma seriada, de modo que as concentrações testadas dos compostos acima variassem na seguinte forma: 5mM a 0,0039mM, o óleo de linhaça 0,5mg/mL a 0,0039mg/mL, o óleo de linhaça também foi testado, porém foi diluído com tween 80%, e o seu controle realizado tween 80% e meio, por último o Captan e a Nistatina na faixa de 0,5 mM a 0,00390625 mM, como controles positivos para fungos filamentosos e leveduriformes respectivamente.

Posteriormente, alíquotas de 100  $\mu$ L de cada concentração foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 poços. Como controle de esterilidade foi usado somente o caldo batata (sem a adição do composto e solvente). Como controle de crescimento foi utilizado o caldo batata e os inóculos fúngicos. Como controle de toxicidade do solvente usou-se o meio de cultura, juntamente com o solvente e inóculo (JOHANN et al., 2010). As placas foram incubadas por 48 horas para leveduras e 72 horas para fungos filamentosos à 32°C. A leitura foi realizada visualmente (CLSI, 2008). Os resultados foram expressos em mM, e somente o óleo de linhaça foi testado em mg/mL e os experimentos realizados em triplicata para cada isolado. As soluções foram utilizadas após a filtração com membrana filtro (22  $\mu$ m) (CLSI, 2008). O armazenamento das soluções estoques foi realizado segundo as instruções dos fabricantes. A leitura foi realizada visualmente, sendo que a densidade da turbidez do crescimento nos poços contendo os compostos foi comparada ao controle de crescimento e ao poço controle negativo (sem inóculo). Nesse contexto, a CIM foi determinada considerando-se

as menores concentrações que inibiram o crescimento de microrganismos fúngicos em 100% para compostos e 100% para o Captan (fungos filamentosos) e para a Nistatina (fungos leveduriformes) (CLSI, 2008). Para o tratamento dos dados qualitativos e quantitativos adquiridos foi proposto um gráfico mapa *plot heatmap* e, para realizar esse, foi empregado o *Software R* (versão 4.1.3), utilizando-se ainda os pacotes de extensões *gg plot 2* (3.3.6) e *reshape 2* (1.4.4), que são capazes de gerar um gráfico que reproduz ilustrativamente os resultados obtidos pelo ensaio CIM.

### 5.3 Avaliação do potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados de Portinari frente à irradiação gama cobalto 60

#### 5.3.1 Potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados em solução de esporos frente a três dosagens de radiação gama cobalto 60

Para realizar o teste de inibição do crescimento fúngico em solução de esporos, os isolados fúngicos da pintura primeiramente foram subcultivados em BDA (Sigma-Aldrich), por 7 dias a 28°C. A partir da cultura de cada fungo foi realizado um raspado que foi suspenso em 1 mL de solução salina 0,85% estéril para a decantação das hifas (no caso dos fungos filamentosos), e, em seguida transferida para um tubo contendo 1 mL solução salina estéril. A absorbância das suspensões foi ajustada para 0,09 a 0,17A em espectrofotômetro a 530nm, seguidos de diluição na proporção 1:50 em solução salina 0,85% estéril para os fungos filamentosos, e diluição na proporção 1:50 seguido de 1:20 em solução salina 0,85% estéril para os fungos leveduriformes para obter a concentração  $4 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células/mL (CLSI, 2008). Foram empregadas como grupo controle espécies de fungos filamentosos e leveduriformes de duas coleções de referência, a primeira a norte americana *American Type Culture Collection* (ATCC) e segunda brasileira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). O mesmo protocolo de diluições supracitado foi realizado para as espécies filamentosas das coleções ATCC nome/código *Aspergillus flavus* CCT4952 e coleção UFMG nome/código *Cladosporium cladosporioides* MAC BE 037, e, para as espécies leveduriformes como fungo de nome/código *Candida albicans* CCT 18804 e *Cryptococcus neoformans* H99. Foram realizados testes prévios para averiguar a viabilidade das células microbianas dos isolados e das espécies das coleções de referência para proceder às demais etapas do experimento. As suspensões dos isolados de Portinari e das coleções de referências foram armazenadas e identificadas em triplicata de cada

espécie, em *falcons* de 15 mL estéreis contendo um volume de 5mL que tinham células microbianas viáveis na concentração  $4 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células/mL conforme protocolo e mensuração 0,09 a 0,17A em espectrofotômetro a 530nm (CLSI, 2008).

Os tubos falcons foram dispostos em grades para transporte e posterior submissão a irradiação, no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, LIG/CDTN/UFMG, com Irradiador Panorâmico Multipropósito de Categoria II, fabricado pela MDS Nordion no Canadá, Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, equipado com uma fonte de Cobalto-60 estocada a seco com atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Ci., nas dosagens de 1, 3 e 5 kGy. Cada espécie foi testada em triplicata, foram realizados um controle positivo do inóculo que não foi submetido a radiação para controle de viabilidade das células microbianas do inóculo e um controle negativo sem inóculo para controle de esterilidade da solução salina. Para aferição de dosagens aplicadas foram empregados dosímetros Fricke, em acordo com as normas da *American Society for testing materials* (ASTM, 2007).

Para avaliação da eficácia das dosagens empregadas as soluções de inóculos de esporos foram agitadas em vórtex e semeados com pipeta no volume de 10 $\mu$ L, em três regiões em placas de Petri contendo BDA. Após 7 dias do período de incubação em estufa, e, com 21 dias após a irradiação dos isolados fúngicos que estavam armazenados em estufa a 28°C, foram submetidos às leituras e mensurações. E novamente após 14 dias de crescimento e 28 dias de irradiação nas mesmas condições citadas procedeu-se às medidas. Realizou-se a mensuração, empregou-se um paquímetro digital de alta precisão cuja faixa de mensuração de 0-150 mm, previamente calibrado, da marca Vernier. O procedimento de inoculação em placas também foi realizado em triplicata biológica para cada espécie. E ainda foi realizado o controle positivo em que foi verificada a viabilidade dos inóculos, e um controle negativo em que foi realizado o controle de esterilidade do meio empregado.

Para o tratamento dos dados qualitativos e quantitativos encontrados foi proposto o gráfico *Bar plot* e, para realização desse foi empregado o *Software R* (versão 4.1.3), utilizando-se ainda os pacotes de extensões *gg plot 2* (3.3.6) e *reshape 2* (1.4.4). Essas extensões produzem um gráfico que equivale aos resultados obtidos pelo ensaio de inibição do crescimento fúngico dos isolados em solução de esporos frente a três dosagens de radiação gama cobalto 60.

### 5.3.2 Potencial de inibição do crescimento fúngico dos isolados em micélio frente a três dosagens de radiação gama cobalto 60

Para realizar o teste de inibição do crescimento fúngico em micélios, os isolados fúngicos da pintura foram subcultivados em BDA, por 7 dias a 28°C. A cultura de cada fungo foi repicada usando palito estéril, em três regiões equidistantes cada placa de Petri (essas placas foram preparadas padronizadas com volume de 20 mL de meio BDA) (Sigma-Aldrich), cada fungo foi repicado em triplicata. Foram empregadas espécies filamentosas e leveduriformes de duas coleções de referência, a primeira norte americana *American Type Culture Collection* (ATCC), e a segunda brasileira do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). O mesmo protocolo de repique foi realizado para as espécies filamentosas das coleções ATCC, nome/código *Aspergillus flavus* CCT4952 e coleção UFMG nome/código *Cladosporium cladosporioides* MAC BE037, e, para as espécies leveduriformes como fungo de nome/código *Candida albicans* CCT 18804 e *Cryptococcus neoformans* H99. Foram realizados testes prévios para averiguação da viabilidade das células microbianas, em meio sólido BDA padronizando (espessura de 1mm de meio e volume de 20 mL por placa de petri), para proceder então às demais etapas do experimento de irradiação. A irradiação foi realizada no LIG/CDTN/UFMG, nas dosagens de 1, 3 e 5kG. Para cada espécie testada foi realizado um controle positivo do inóculo, que não foi submetido a radiação para controle de viabilidade das células microbianas presentes no inóculo, e um controle negativo sem inóculo para controle de esterilidade do meio BDA. Para aferição de dosagens aplicadas foram empregados dosímetros Fricke, em acordo com as normas da *American Society for testing materials* (ASTM 2007).

Para avaliação da eficácia das dosagens empregadas os inóculos de micélios foram mensurados com paquímetro digital, cuja faixa de mensuração empregada foi de 0-150 mm. Primeiramente, 5 dias antes do procedimento de irradiação os micélios foram mensurados, novamente mensurados 10 dias após crescimento e ainda com 5 dias após irradiação, placas acondicionadas em estufa a 28°C. Depois, as placas com fungos irradiados foram repicadas para verificar a viabilidade dessas colônias submetidas à irradiação e mensuramos novamente com 7 dias de crescimento e 12 dias após irradiação, e, procedeu-se as medidas mais uma vez com 21 dias de crescimento e 28 dias após irradiação. O procedimento de repique foi realizado em triplicata biológica para cada espécie, e, ainda foi realizado o controle positivo em que foi

verificada a viabilidade dos inóculos, e controle negativo em que foi feito o controle de esterilidade do meio empregado.

Para o tratamento dos dados qualitativos e quantitativos achados foi proposto o gráfico *Bar plot* e, para realizar esse, foi empregado o *Software R* (versão 4.1.3), utilizando-se ainda os pacotes de extensões *gg plot 2* (3.3.6) e *reshape 2* (1.4.4). Essas extensões geram um gráfico correspondente aos resultados alcançados pelo ensaio de inibição do crescimento fúngico dos isolados em micélio frente a três dosagens de radiação gama cobalto 60.

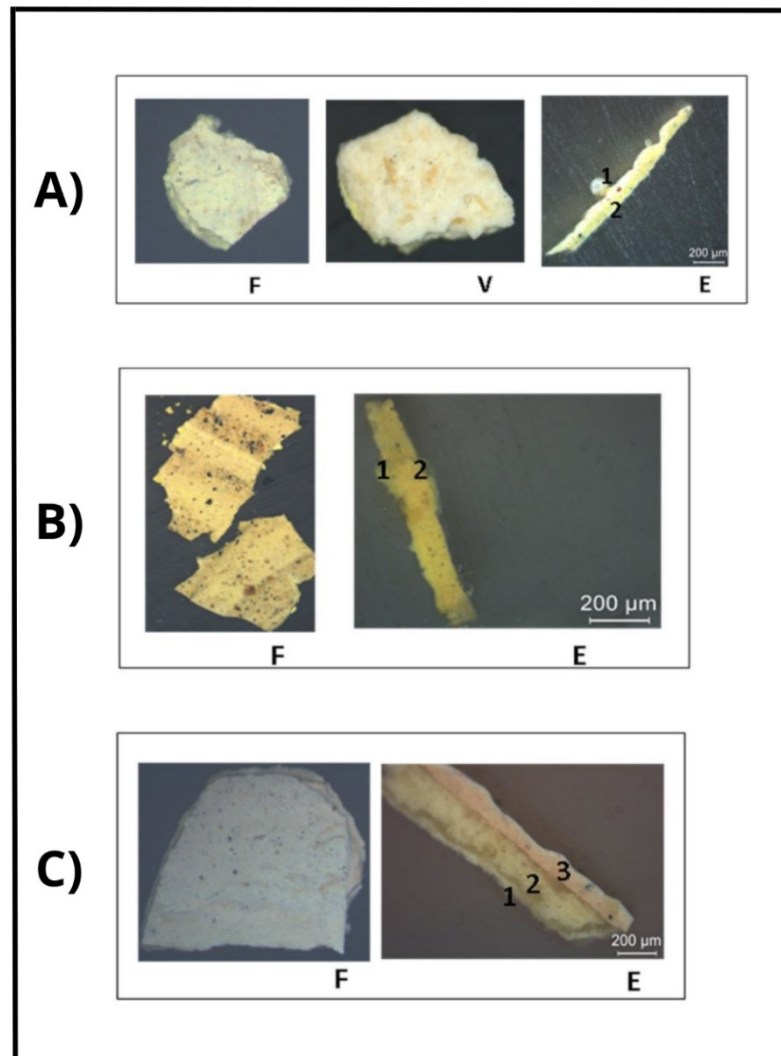
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização da pintura “Frevo” e sua estratigrafia

As análises dos fragmentos ao microscópio Leica DM4500 possibilitaram a visualização das camadas ou estratos pictóricos e correlacionando-os aos locais de origem de coleta.

As análises dos versos das amostras ao microscópio Leica DM 4500 sugerem que o artista empregou na base de preparação da pintura um pigmento branco sugerindo ainda a presença de grãos carbonáticos desse pigmento, como é possível observar ainda na imagem do verso do fragmento 5 (FIGURA 12, LETRA A). Os fragmentos 5 e 10 apresentaram 2 camadas, a amostra 5, apresentou uma camada branca interna, que provavelmente corresponde ao (verso) e outra amarela-clara que possivelmente representa a parte (frente) do microfragmento que juntas correspondem aproximadamente a 0,11 mm de espessura, o fragmento 10 (FIGURA 12 na letra B), apresentou-se com uma camada amarela-clara e outra amarela escura correspondentes estimadamente à 0,14 mm de espessura. O fragmento 12, apresentou 3 camadas, (FIGURA 12 na letra C), uma camada branca interna provavelmente corresponde (a base de preparação), a segunda amarela-clara e a terceira rosa-clara, essas camadas possuem juntas estimadamente 0,13 mm de espessura. Os resultados dos estudos estratigráficos e morfológicos desses três fragmentos (5, 10 e 12) vieram a corroborar para a hipótese de que essas amostras compõem a porção inacabada da pintura conforme foi relatado em história oral pela Sra Guiomar Lobato, membro responsável pela Diretoria/Curadoria de Artes do PIC.

Figura 12: Painel de fragmentos da pintura parte inacabada A) Fragmento 5 nas posições frente, verso e corte estratigráfico, B) Fragmento 10 nas posições frente e corte estratigráfico C) Fragmento 12 nas posições frente e corte estratigráfico

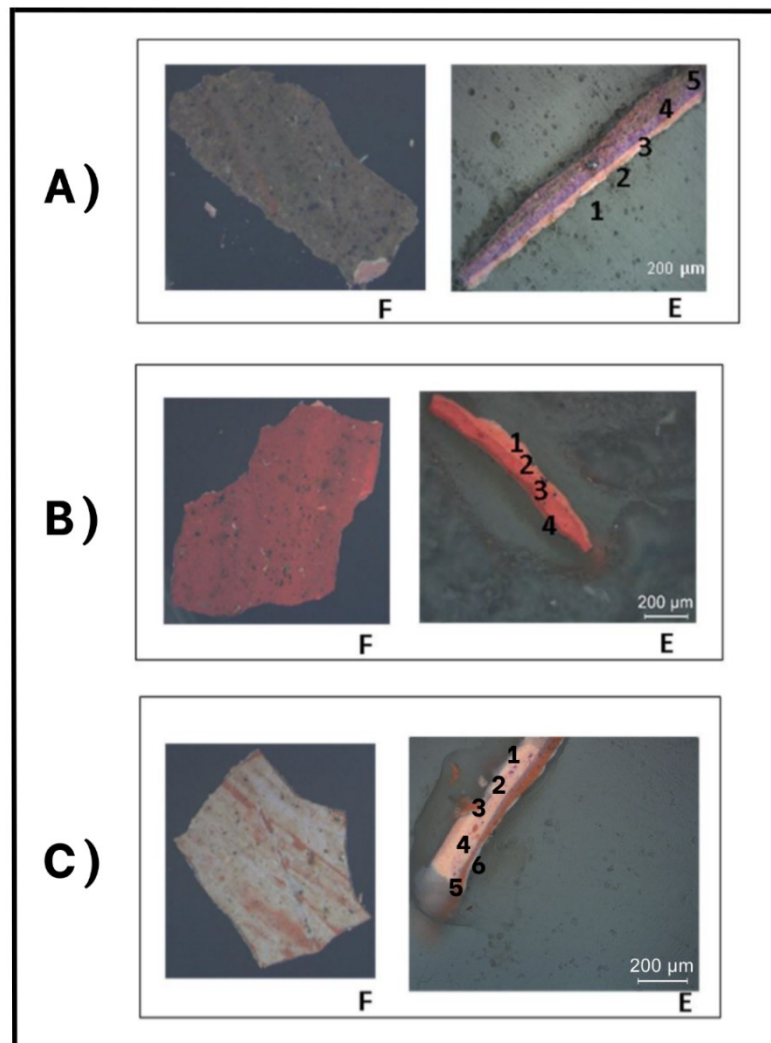


Fonte: acervo da autora a partir da análise de resultados estratigráficos

A amostra 6 apresentou 5 camadas (FIGURA 13 na letra A), uma camada branca mais interna provavelmente correspondente a base de preparação, uma rosa-clara, uma roxa, uma magenta e a última verde-acinzentada que correspondem aproximadamente a 0,12 mm de espessura. Já o fragmento 13, apresentou 4 camadas, (FIGURA 13 na letra B), uma rosa-clara mesclada com branco (sugerindo possivelmente migração de grãos brancos da base de preparação para a camada adjacente na cor rosa), segunda rosa-clara, terceira rosa no tom médio, a quarta roxa, a quinta vermelha-escura e a última cinza que apresentam juntas a

espessura aproximada de 0,13 mm. E por último, o fragmento 14 apresentou 6 camadas (FIGURA 13 na letra C), uma camada branca possivelmente correspondente a base de preparação, segunda camada rosa-clara, terceira rosa no tom médio com grãos roxos, a quarta roxa, a quinta vermelha-escura e a última cinza que apresentam juntas a espessura aproximada de 0,14 mm. As últimas amostras mostraram a diversidade de cores e de pigmentos da paleta de Portinari. Como os fragmentos são irregulares, e não planos, ao escolher uma objetiva para focalizar e fotografar um determinado ponto de um fragmento, como é possível observar nos registros fotográficos, as extremidades da imagem registrada perdem o foco.

Figura 13: Painel de fragmentos da pintura parte finalizada A) Fragmento 6 nas posições frente e corte estratigráfico, B) Fragmento 13 nas posições frente e corte estratigráfico C) Fragmento 14 nas posições frente e corte estratigráfico



Fonte: acervo da autora a partir da análise de resultados estratigráficos

## 6.2 Espectroscopia no IV

Foram obtidos os espectros no IV obtidos no modo ATR de dois grupos de amostras (5, 10 e 12) e (6, 13 e 14) correspondentes a um total de 6 fragmentos analisados, sugeriu para os cinco fragmentos (10, 12, 6, 13 e 14) analisados carga carbonato de cálcio cujo estiramento corresponde ( $n \cong 872 \text{ cm}^{-1}$  e  $n \cong 1400 \text{ cm}^{-1}$ ) e sulfato de cálcio ( $n \cong 1110 \text{ cm}^{-1}$ ) (VAHUR et al., 2010, 2016) e o pigmento orgânico verde de ftalocianina (CuN ou CNC  $n \cong 1390 \text{ cm}^{-1}$  e CC  $n \cong 1320 \text{ cm}^{-1}$ ) (BUTI et al., 2013). Em todas as amostras pertencentes aos dois grupos foi encontrado o aglutinante óleo ( $n \cong 1740 \text{ cm}^{-1}$ ) estiramento importante e pertencente ao grupo carbonila de ésteres graxos, que corresponde ao total das análises no modo ATR (BARBOSA, 2011; BUTI et al., 2013). Esses dados de transmitância e atribuição de bandas de absorção no IV podem ser observados nos espectros constantes no ANEXO A, e elencados nas TABELAS 4 e 5, classificando separadamente por pigmentos/aglutinantes atribuídos separadamente em orgânicos e inorgânicos por fragmento analisado. Não constam nas tabelas dados das transmitâncias atribuídas às absorções do grupo OH (hidroxila) ( $n \cong 3000 \text{ cm}^{-1}$  a  $n \cong 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) e do CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) ( $n \cong 2000 \text{ cm}^{-1}$ ) que foram encontrados nos espectros no IV em ambos os grupos analisados.

Nos espectros foi possível ainda encontrar absorções na amostra 5, atribuídas aos óxidos de titânio ( $n \cong 510 \text{ cm}^{-1}$ ) e, dióxido de zinco ( $n \cong 470 \text{ cm}^{-1}$ ) em 5 amostras (5, 12, 6, 13 e 14) analisadas (VAHUR et al., 2010, 2016). O pigmento amarelo de cádmio disperso em óleo, cuja banda ( $n \cong 600 \text{ cm}^{-1}$ ), estiramento pertencente ao grupo sulfatos foi encontrado em 4 amostras (10, 6, 13 e 14) analisadas. O lápis lazúli/Azul Ultramar ( $n \cong 410 \text{ cm}^{-1}$  e  $n \cong 444 \text{ cm}^{-1}$ ), estiramento pertencente ao grupo feldspatoídes, foi encontrado nas amostras (12 e 14) analisadas. Todos os dados espectrais e atribuições de bandas constam nas Tabelas 4 e 5 com suas respectivas referências. No grupo de amostras (6, 13 e 14) foram encontradas bandas de absorção de silicatos ( $n \cong 740 \text{ cm}^{-1}$ ) que correspondem a metade dos fragmentos analisados (VAHUR et al., 2010, 2016). Em duas amostras, 6 e 14, foi encontrado o verde de cromo cujas absorções atribuídas foram ( $n \cong 440 \text{ cm}^{-1}$  e  $n \cong 570 \text{ cm}^{-1}$ ) que correspondem ao estiramento pertencente ao grupo óxido de cromo. Já nas amostras 13 e 14 foram encontradas bandas características de óxido de ferro ( $n \cong 450 \text{ cm}^{-1}$  e  $n \cong 590 \text{ cm}^{-1}$ ) e azul de cobalto ( $n \cong 480 \text{ cm}^{-1}$  e  $n \cong 650 \text{ cm}^{-1}$ ) que correspondem ao estiramento pertencente ao grupo óxido de cobalto (VAHUR et al., 2010 e 2016). Na amostra 13, foi encontrado o azul cerúleo ( $n \cong 410 \text{ cm}^{-1}$ ), que

correspondem ao estiramento pertencente ao grupo óxido de cobalto. A FIGURA 19, intitulada gráfico *bar plot* IV, traz a representação da atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânicos encontrados ao IV por amostra analisada, simplificando a compreensão e comparação dos resultados obtidos. Tais como o óleo de linhaça ou ácido linoleico ( $C_{18}H_{32}O_2$ ), (representado em cor amarelo claro no gráfico), o verde de ftalocianina ( $CuC_{32}Cl_{16-n}H_nN_8$ ), (em cor verde escuro), o carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ), (em cinza claro), o sulfato de cálcio ( $CaSO_4$ ) foram encontrados em todas as seis amostras analisadas (5, 10 e 12) e (6, 13 e 14). O óxido de zinco ( $ZnO_2$ ), (representado em tom cinza médio), foi encontrado em cinco amostras (5, 6, 12, 13, 14). O sulfeto de cádmio (CdS), (representado em amarelo ocre) foi atribuído em quatro amostras (6, 10, 13 e 14). O silicato (SiO), (em bege claro), foi encontrado em três amostras (6, 13 e 14). O azul ultramar ( $Na_{6-8}Al_6Si_6O_{24}S_{2-4}$ ) (em azul tom médio) foi encontrado em duas amostras (12 e 14). E o azul de cobalto ( $CoOAl_2O_3$ ) (em azul escuro), também foi encontrado em duas amostras (13 e 14). Ainda o óxido de cromo ( $Cr_2O_3$ ), (representado em verde oliva) foi encontrado também em duas amostras (6 e 14). E por fim o óxido de titânio ( $TiO_2$ ), (em cinza clarinho), foi encontrado em apenas uma amostra (5), e, o azul cerúleo ( $CoO_nS_nO_2$ ), (em azul claro), foi encontrado também em apenas uma amostra (13). Na FIGURA 14, é possível observar o gráfico *bar plot* que sintetiza os resultados encontrados nas amostras ao IV.



Código da amostra pictórica	Posição e cor da camada analisada em relação a pintura	Atribuição do Pigmento utilizado	Composição química dos pigmentos no fragmento	Grupos funcionais e suas ligações químicas	Atribuição de banda do pigmento inorgânico disperso em óleo no IV n em $\text{cm}^{-1}$	Referências bibliográficas
AM 6	F*verde-acinzentado V* rosa	Amarelo de cádmio	$\text{CdSBaSO}_4$	Sulfatos $\text{SO}_4^{-2}$	600, 602	VAHUR et al., 2010 VAHUR et al., 2016
		Carbonato de cálcio ou gesso	$\text{CaCO}_3$	carbonatos $\text{CO}_3^{-2}$	708, 870, 872, 1320, 1406	
		Óxido de cromo ou verde de cromo	$\text{Cr}_2\text{O}_3$	óxidos $\text{O}^{-2}$	572, 418	
		Dióxido de zinco ou branco de zinco	$\text{ZnO}_2$		422, 440	
		Silicato	$\text{SiO}$		1066	
		Sulfato de cálcio ou gipsita	$\text{CaSO}_4$	Sulfatos $\text{SO}_4^{-2}$	422, 1108, 1110, 1178	
AM 13	F*vermelho-marrom V* rosa	Amarelo de cádmio	$\text{CdSBaSO}_4$	Sulfatos $\text{SO}_4^{-2}$	600, 668	VAHUR et al., 2010 VAHUR et al., 2016
		Azul de cobalto	$\text{CoO}.\text{Al}_2\text{O}_3$	óxidos $\text{O}^{-2}$	488	
		Azul cerúleo	$\text{CoOnSnO}_2$	óxidos $\text{O}^{-2}$	412	
		Carbonato de cálcio ou gesso	$\text{CaCO}_3$	carbonatos $\text{CO}_3^{-2}$	872, 718, 1398, 1450	
		Dióxido de zinco ou branco de zinco	$\text{ZnO}_2$	óxidos $\text{O}^{-2}$	412, 432, 420	
		Óxido de ferro	$\text{Fe}_2\text{O}_3$		530, 460	
		Silicatos	$\text{SiO}$		740	
		Sulfato de cálcio ou gipsita	$\text{CaSO}_4$	Sulfatos $\text{SO}_4^{-2}$	424, 668, 1064, 1106, 1108, 1172	

Código da amostra pictórica	Posição e cor da camada analisada em relação a pintura	Atribuição do Pigmento utilizado	Composição química dos pigmentos no fragmento	Grupos funcionais e suas ligações químicas	Atribuição de banda do pigmento inorgânico disperso em óleo no IV n em $\text{cm}^{-1}$	Referências bibliográficas
AM 14	F*vermelho-cinza V* rosa	Amarelo de cádmio	$\text{CdSBaSO}_4$	Sulfatos $\text{SO}_4^{-2}$	602, 664	VAHUR et al., 2010 VAHUR et al., 2016
		Azul de cobalto	$\text{CoOAl}_2\text{O}_3$	óxidos $\text{O}^{-2}$	654	
		Azul ultramar/Lápis lazúli	$\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$	Feldspatoides	442	
		Carbonato de cálcio ou gesso	$\text{CaCO}_3$	carbonatos $\text{CO}_3^{-2}$	718, 872, 1364, 1396, 1456	
		Dióxido de zinco ou branco de zinco	$\text{ZnO}_2$	óxidos $\text{O}^{-2}$	490, 458, 440, 598	
		Óxido de ferro	$\text{Fe}_2\text{O}_3$			
		Óxido de cromo ou verde de cromo	$\text{Cr}_2\text{O}_3$			
		Silicatos	$\text{SiO}$		1066, 1068	
		Sulfato de cálcio ou gipsita	$\text{CaSO}_4$	Sulfatos $\text{SO}_4^{-2}$	420, 426, 458, 664, 1066, 1110, 1112, 1174, 1174	

Fonte: elaborado pela autora a partir da análise de resultado espectrais por IV e com base na literatura correlata (VAHUR et al., 2010; VAHUR et al., 2016)

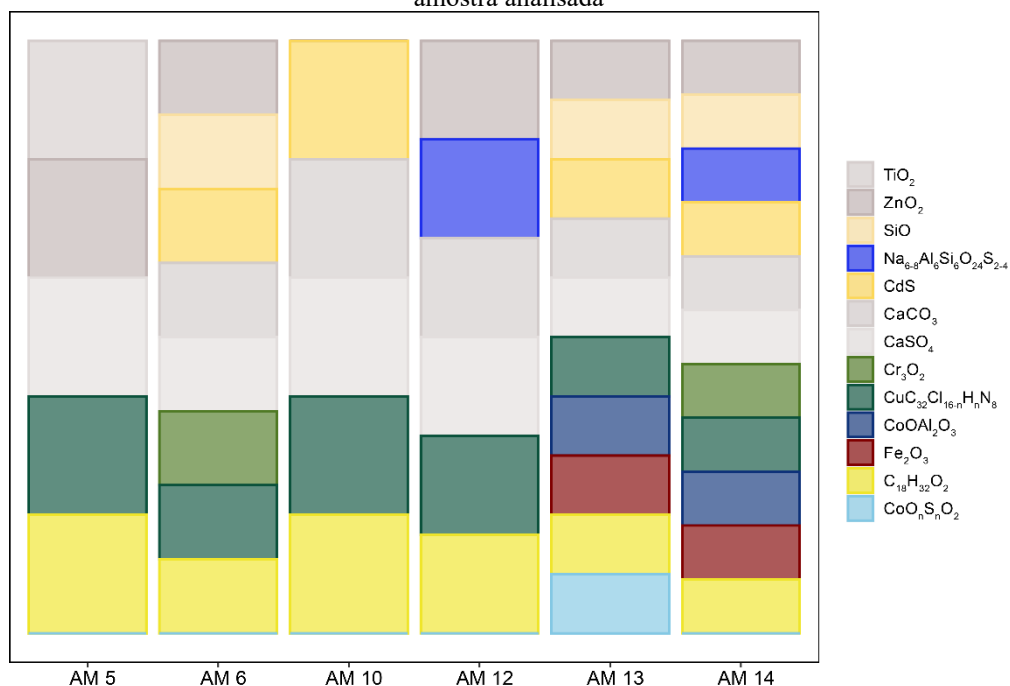
Tabela 5: Atribuição de bandas de absorção de pigmentos e aglutinantes orgânicos em acordo com análises dos espectros no IV

Código da amostra pictórica	Posição e cor da camada analisada em relação a pintura	Atribuição do Pigmento ou aglutinante utilizado	Composição química dos pigmentos ou aglutinante no fragmento	Grupos funcionais e ou suas ligações químicas que vibram	Atribuição de banda do pigmento ou aglutinante disperso em óleo no IV n em cm <sup>-1</sup>	Referências bibliográficas
AM 5	F*cinza V*branco	Verde de ftalocianina	$CuC_{32}Cl_{16-n}H_nN_8$	Hidrocarboneto CH CuN ou CNC	1094,1390,1394 1390	
		Óleo linhaça (ácido oleico) (ácido linoleico)	$C_{18}H_{34}O_2$ $C_{18}H_{32}O$	COOH	1772, 1794 3330	
AM 10	F* amarelo escuro V*amarelo claro	Verde de ftalocianina	$CuC_{32}Cl_{16-n}H_nN_8$	Hidrocarboneto CH C=C	1159 1316	MEILUNAS, 1990 BARBOSA, 2007 BUTI et al., 2013
		Óleo linhaça (ácido linoleico)	$C_{18}H_{32}O$	COOH	1410 3364, 3372	
AM 12	F* cinza V*branco	Verde de ftalocianina	$CuC_{32}Cl_{16-n}H_nN_8$	CH2 CuN ou CNC C=C COOH	2916, 2922 1396 1316 3364, 3372	

Código da amostra pictórica	Posição e cor da camada analisada em relação a pintura	Atribuição do Pigmento ou aglutinante Utilizado	Composição química dos pigmentos ou aglutinante no fragmento	Grupos funcionais e ou suas ligações químicas que vibram	Atribuição de banda do pigmento ou aglutinante disperso em óleo no IV n em $\text{cm}^{-1}$	Referências Bibliográficas
AM 6	F*verde-acinzentado V* rosa	Verde de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$	C=C CuN ou CNC	1320	MEILUNAS, 1990 BARBOSA, 2007 BUTI et al., 2013
		Óleo linhaça (ácido oleico) (ácido linoleico)	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$	Carbonila C=O CH2 COOH	1708 2920, 2918 3350	
AM 13	F*vermelho-marrom V* rosa	Verde de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$	C=C CuN ou CNC	1318 1396, 1398	
		Óleo linhaça (ácido linoleico)	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$	COOH CH2	3386 2918, 2920	
AM 14	F*vermelho-cinza V* rosa	Verde de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$	C=C CuN ou CNC	1318, 1320 1396	
		Óleo linhaça (ácido linoleico)	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	Carbonila C=O COOH CH2	1724, 1726 3382, 3388 2916, 2918	

F\* frente do fragmento em relação a pintura V\* verso do fragmento em relação a pintura Fonte: adaptado pela autora a partir da análise de resultados espectrais por IV e com base na literatura correlata (MEILUNAS, 1990; BARBOSA, 2007; BUTI et al., 2013)

Figura 14: Gráfico *bar plot* de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao IV por amostra analisada



Fonte: elaborado pela autora a partir da análise de resultados espectrais po IV e com base na literatura correlata

### 6.3 Espectroscopia Raman

Em praticamente todos os espectros obtidos ao Raman, ocorreu o efeito denominado fluorescência que é o efeito que a radiação invisível exerce sobre os elétrons, esses absorvem energia e mudam do estado fundamental para o estado excitado. Ao voltar ao estado fundamental, eles liberam o excesso de energia na forma de radiação conhecida como fluorescência de fundo que pode ter sido gerada tanto pelo analito quanto pela matriz, e pode ser característico de pigmentos minerais submetidos ao método analítico Raman ao laser 633 nm, fato que ocasionou ruídos nos sinais espectrais. Porém esses ruídos não foram suficientes para mascarar todos os sinais dos espectros. Nas análises dos espectros Raman realizados foi encontrado dióxido de titânio ( $n\ 142\ \text{cm}^{-1}$ ) em 5 fragmentos que foram analisados sendo que 3 pertencem à área inacabada (5, 10 e 12) e os outros 2 pertencem à área acabada (6 e 13), ou seja, o dióxido de titânio foi encontrado em praticamente todas as amostras submetidas à análise por espectroscopia Raman conforme ANEXO B na página 172. O pigmento orgânico verde de ftalocianina ( $n\ 680\ \text{cm}^{-1}$ ,  $n\ 1200\ \text{cm}^{-1}$  e  $n\ 1500\ \text{cm}^{-1}$ ) foi encontrado em metade das amostras analisadas (6, 12 e 14) pertencentes aos 2 grupos analisados, e, o azul de ftalocianina foi encontrado apenas na amostra (12) analisada (BURGIO et al., 2001; MARENCO et al., 2005;

BUTI et al., 2013; PITARCH et al., 2014; ROSADO et al., 2014). O óxido de ferro ( $n\ 420\ \text{cm}^{-1}$ ) foi encontrado em 2 amostras da área acabada (13 e 14) que foram analisadas. O Azul Ultramar/Lápis Lazúli (entre  $n\ 540\ \text{cm}^{-1}$ ,  $n\ 570\ \text{cm}^{-1}$  e  $n\ 790\ \text{cm}^{-1}$ ) também foi encontrado em 2 fragmentos (6 e 13) esses pertencentes à área finalizada da pintura. O carbonato de cálcio ( $n\ 156\ \text{cm}^{-1}$ ) e sulfato de cálcio ( $n\ 996\ \text{cm}^{-1}$ ) foram encontrados em apenas 1 amostra (13). O dióxido de zinco ( $n\ 93\ \text{cm}^{-1}$ ) foi encontrado em 1 amostra (5) assim como o trióxido de chumbo ( $n\ 65\ \text{cm}^{-1}$ ), o qual poderia dubiamente ainda ser atribuído ao sulfato de chumbo encontrado na amostra (12), e o azul da prússia encontrado também em 1 amostra ( $n\ 2279\ \text{cm}^{-1}$  e  $n\ 2429\ \text{cm}^{-1}$ ) (14) (BURGIO *et al.*, 2001). E, por fim, o aglutinante orgânico óleo de linhaça ( $n\ 1700\ \text{cm}^{-1}$  e  $2800\ \text{cm}^{-1}$ ) foi encontrado na amostra (14) (BURGIO et al., 2001; MARENCO et al., 2005; BUTI et al., 2013; ROSADO et al., 2014). As atribuições de deslocamentos Raman podem ser observadas detalhadamente no ANEXO B, e, na TABELA 6, em que constam ainda os dados encontrados ao Raman que foram sumarizados em pigmentos e aglutinantes orgânicos e inorgânicos.

A FIGURA 15, cujo título é gráfico *bar plot* Raman, ilustra a atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânicos obtidos ao Raman por amostra analisada, facilitando a compreensão e comparação dos resultados encontrados. Por exemplo, ao observar gráfico elaborado é possível notar que o óxido de titânio, ( $\text{TiO}_2$ ), foi encontrado em 5 amostras (5, 6, 10, 12 e 13) e (está representado em cinza claro no gráfico). O verde de ftalocianina ( $\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$ ) foi encontrado em três amostras (6, 12 e 13) (representado ao gráfico em verde escuro). O pigmento óxido de ferro ( $\text{FeO}_2$  e/ou  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) foi encontrado em duas amostras (13 e 14) (representado em marrom escuro). E azul ultramar ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ ) encontrado em duas amostras (6 e 13) (representado em azul). Já as substâncias a seguir foram encontradas em apenas uma amostra respectivamente óxido de zinco ( $\text{ZnO}_2$ ) (5), (representado em cinza clarinho), o óxido de chumbo ( $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ) e/ou sulfato de chumbo ( $\text{PbSO}_4$ ) (12), (representado em cinza escuro), o azul da prússia ( $\text{C}_{18}\text{Fe}_7\text{NO}_{18}$ ) (14), (representado em cinza escuro), azul de ftalocianina ( $\text{CuC}_{32}\text{H}_{16}\text{N}_8$ ) (12), (representado em azul escuro) e o sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) (13), (representado em cinza clarinho), e por último o óleo de linhaça ( $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ) (representado em amarelo).

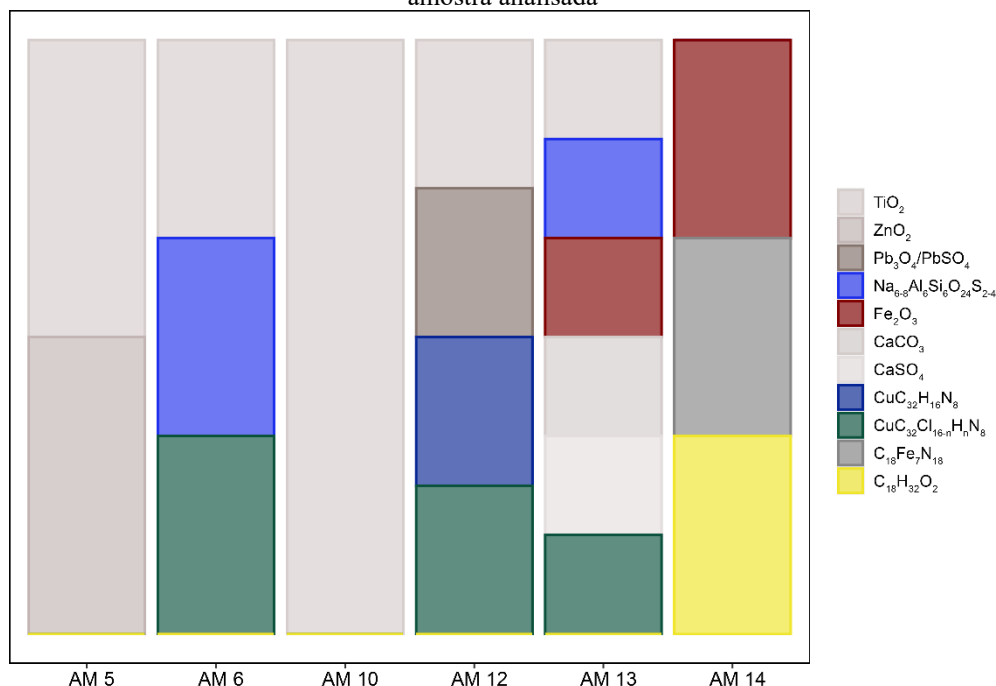
Tabela 6: Atribuição de deslocamento Raman de pigmentos e aglutinantes (orgânicos e inorgânicos)

Código da amostra pictórica	Posição e cor da camada analisada em relação a pintura	Atribuição do Pigmento ou aglutinante Utilizado	Composição química dos pigmentos ou aglutinante no fragmento	Grupos funcionais e ou suas ligações químicas que deslocam no raman	Atribuição de banda deslocamento raman pigmento ou aglutinante em $\text{cm}^{-1}$	Referências Bibliográficas
AM 5	F*cinza V*branco	Branco de zinco	$\text{ZnO}_2$	óxidos $\text{O}^{-2}$	93	OLIVEIRA et al., 1997 BURGIO et al., 2001 MARENGO et al., 2005 PITARCH et al., 2014 ROSADO et al., 2014
		Branco de titânio	$\text{TiO}_2$		143 e 619	
		Branco de titânio	$\text{TiO}_2$		143	
AM 10		Branco de titânio	$\text{TiO}_2$		143	
AM 12	F* cinza V*branco	Óxido de chumbo ou sulfato de chumbo	$\text{Pb}_3\text{O}_4$ ou $\text{PbSO}_4$	óxidos $\text{O}^{-2}$	65	
		Verde de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$	C=C CuN ou CNC	676 e 1596	
		Azul de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{H}_{16}\text{N}_8$	CuN ou CNC	1604	
AM6	F*verde-acinzentado V* rosa	Branco de titânio	$\text{TiO}_2$	óxidos $\text{O}^{-2}$	143	
		Verde de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$	C=C CuN ou CNC	685, 1213 e 1537	
		Azul ultramar/Lápis lazúli	$\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$	feldspatoides	547 e 548	
		Branco de titânio	$\text{TiO}_2$	óxidos $\text{O}^{-2}$	143	

Código da amostra pictórica	Posição e cor da camada analisada em relação a pintura	Atribuição do Pigmento ou aglutinante utilizado	Composição química dos pigmentos ou aglutinante no fragmento	Grupos funcionais e ou suas ligações químicas que deslocam no raman	Atribuição de banda deslocamento raman pigmento ou aglutinante em $\text{cm}^{-1}$	Referências Bibliográficas
AM 13	F*vermelho-marrom V* rosa	Azul ultramar/Lápis lazúli	$\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$	feldspatoídes	571 e 797	OLIVEIRA et al., 1997 BURGIO et al., 2001 MARENGO et al., 2005 PITARCH et al., 2014 ROSADO et al., 2014
		Carbonato de cálcio ou gesso	$\text{CaCO}_3$	carbonatos $\text{CO}_3^{-2}$	156	
		Branco de titânio	$\text{TiO}_2$	óxidos $\text{O}^{-2}$	143	
		Óxido de ferro	$\text{Fe}_2\text{O}_3$		425	
		Sulfato de cálcio ou gypsum	$\text{CaSO}_4$	Sulfatos $\text{SO}_4^{-2}$	996	
AM 14	F*vermelho-cinza V* rosa	Verde de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$	C=C CuN ou CNC	695 e 1509	
		Óxido de ferro	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	óxidos $\text{O}^{-2}$	425	
		Azul da Prússia	$\text{C}_{18}\text{Fe}_7\text{N}_{18}$	CuN	2279 e 2429	
		Óleo linhaça (ácido linoleico)	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$ $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$	Carbonila C=O	1703 e 2827	

Fonte: Adaptado pela autora a partir da análise de resultados espectrais por raman e com base na literatura correlata (OLIVEIRA et al., 1997; BURGIO et al., 2001; MARENGO et al., 2005; PITARCH et al., 2014 e ROSADO et al., 2014)

Figura 15: Gráfico *bar plot* de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao Raman por amostra analisada



Fonte: Elaborado pela autora a partir da análise de resultados espectrais por raman e com base na literatura correlata

#### 6.4 Microscopia eletrônica de varredura

Nas seis amostras analisadas (5, 10 e 12) e (6, 13 e 14) foram encontrados os elementos Ca, C, Cl, Mg, S, Si, Ti e O, determinados pelo equipamento através do modo EDS (espectroscopia por energia dispersiva pelo qual caracterizam-se elementos químicos em uma amostra) que correspondem ao total das amostras analisadas. O elemento cálcio possivelmente está na base de preparação dos fragmentos coletados na pintura, tais como (carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e/ou sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>)). O elemento enxofre pode igualmente estar no sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>). O elemento cloro provavelmente está no pigmento verde de ftalocianina (CuC<sub>32</sub>Cl<sub>16-n</sub>H<sub>n</sub>N<sub>8</sub>). Já o elemento magnésio pode constar no silicato de magnésio (Mg<sub>3</sub>Si<sub>4</sub>O<sub>10</sub>). O elemento silício pode constar nos silicatos (SiO). O elemento titânio provavelmente está no dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Porém é importante ressaltar que todas as amostras foram preparadas para a análise ao MEV com fita adesiva de carbono e por essa razão não foi dada ênfase à presença de carbono.

Foram encontrados em 5 amostras (5, 10, 12, 13 e 14) os elementos Ba, Cd e Fe. O elemento bário pode estar no pigmento amarelo de cádmio (CdSBaSO<sub>4</sub>) assim como o elemento

cádmio pode constar no sulfeto de cádmio (CdS). Já o elemento ferro pode constar no pigmento óxido de ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). O elemento P (fósforo) foi encontrado em 3 amostras (10, 13 e 14), representando metade dos fragmentos analisados e pode ser o pigmento violeta de cobalto ( $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$ ). O elemento Al (alumínio), foi encontrado em três amostras (5, 6 e 10) e pode constar no pigmento azul ultramar ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ ). Nas amostras (13 e 14) foi encontrado o Se que possivelmente refere-se ao pigmento seleneto de zinco (ZnSe). Foi encontrado em apenas uma amostra os elementos: Na e Co (6), o primeiro elemento pode ser atribuído ao pigmento azul ultramar ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ ), e o segundo pode ser atribuído tanto ao violeta de cobalto ( $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$ ) quanto ao azul de cobalto ( $\text{CoAlO}_3$ ). O Pb foi visto apenas na amostra 5 que possivelmente consta no pigmento dióxido de chumbo ( $\text{PbO}_2$ ). E o Na (sódio) foi encontrado apenas na 14 e pode constar no pigmento azul ultramar ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ ). As análises elementares de cada amostra constam nos espectros EDS constantes no ANEXO C e sumarizadas nas (TABELAS 7, 8 e 9) com respectiva atribuição de pigmentos. A FIGURA 16 identificada como gráfico *bar plot* MEV representa a atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânicos encontrados ao MEV por amostra analisada, contribuindo para a compreensão e comparação dos resultados encontrados. Por exemplo, o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) (representado em cinza clarinho), dióxido de zinco ( $\text{ZnO}_2$ ) (representado em cinza um tom mais escuro que a representação do titânio), o silicato ( $\text{SiO}$ ) (representados em bege claro), Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (representado em cinza muito claro) e o verde de fitalocianina ( $\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$ ) foram encontrados em todas as 5 amostras analisadas (5, 10 e 12) e (6, 13 e 14) e ao gráfico desse último está representado (em verde escuro) conforme FIGURA 16. O pigmento azul ultramar foi encontrado em três amostras (5, 6 e 10) ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ ) (está representado em azul) no gráfico. O seleneto de zinco (ZnSe) foi encontrado nas amostras (13 e 14) (representado na cor amarelo ocre). O sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) foi encontrado nas amostras (5, 13 e 14) (representado em cinza clarinho). O pigmento óxido de ferro ( $\text{FeO}_2$  e/ou  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) foi encontrado em cinco amostras (5, 6, 12, 13 e 14) (representado no gráfico em tom marrom). Já os pigmentos a seguir foram encontrados em apenas uma amostra, respectivamente: óxido de chumbo ( $\text{PbO}_2$ ) e/ou sulfato de chumbo ( $\text{PbSO}_4$ ) (5), (representado em cinza escuro), azul de cobalto ( $\text{CoOAl}_2\text{O}_3$ ) (6) (representado na cor azul escura), e por último o amarelo de cádmio (sulfeto de cádmio) (CdS) (12) (representado em amarelo tom médio).

Tabela 7: Elementos químicos encontrados em cada amostra em análise SEM-EDS

Elementos químicos encontrados em SEM-EDS																			
Código da amostra pictórica	Al	Cd	Co	Fe	Pb	Ti	Zn	Ba	C*	Ca	Cl	K	Mg	Na	O	P	S	Se	Si
AM 5	X			X	X	X	X	-	X	X	X		X		X		X		X
AM 10	X	X				X	X	X	X	X	X		X		X	X	X		X
AM 12		X		X		X	X	X	X	X	X		X		X		X		X
AM 6	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X
AM 13		X		X		X	X	X	X	X	X		X		X	X	X	X	X
AM 14		X		X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X

\*C refere-se ao carbono (todas as amostras foram preparadas com fita de carbono) Fonte: elaborado pela autora a partir da análise de resultados ao SEM-EDS e com base na literatura correlata

Tabela 8: Proposta de atribuição da natureza dos pigmentos fundamentados SEM-EDS confrontando dados da literatura de Portinari

Sugestão de pigmento por amostra fundamentado resultados SEM-EDS e literatura							
Elementos químicos SEM-EDS	AM 5	AM 10	AM12	AM 6	AM 13	AM 14	Fórmulas Químicas dos pigmentos
Al	Azul ultramar	Azul ultramar	-	Azul ultramar	-	-	$\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$
Cd	-	Amarelo de cádmio	Amarelo de cádmio	Amarelo de cádmio	Vermelho de cádmio	vermelho de cádmio	$\text{CdSBaSO}_4$ ou $\text{CdS}$ . $\text{CdSe}$
Co	-	-	-	Azul de cobalto Violeta de cobalto	-	-	$\text{CoAlO}_3$ $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$
Fe	-	-	-	Óxido de ferro	Óxido de ferro	Óxido de ferro	$\text{Fe}_2\text{O}_3$
Pb	Dióxido de chumbo	-	-	-	-	-	$\text{PbO}_2$
Ti	Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	Dióxido de titânio	$\text{TiO}_2$
Zn	Dióxido de zinco	Dióxido de zinco	Dióxido de zinco	Dióxido de zinco	Dióxido de zinco	Dióxido de zinco	$\text{ZnO}_2$
Ba	Amarelo de cádmio	Amarelo de cádmio	Amarelo de cádmio	Vermelho de cádmio	vermelho de cádmio	Amarelo de cádmio	$\text{CdSBaSO}_4$ ou $\text{CdS}$
Ca	Carbonato de cálcio	Carbonato de cálcio	Carbonato de cálcio	Carbonato de cálcio	Carbonato de cálcio	Carbonato de cálcio	$\text{CaCO}_3$
Cl	Verde de ftalocianina	Verde de ftalocianina	Verde de ftalocianina	Verde de ftalocianina	Verde de ftalocianina	Verde de ftalocianina	$\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{HnN}_8$

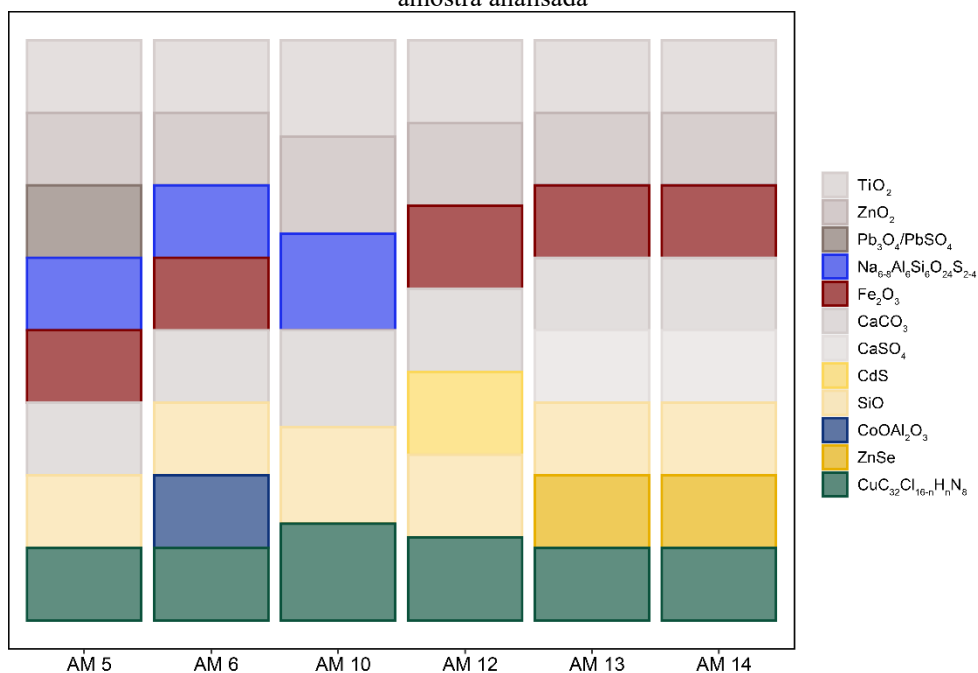
Fonte:Fonte: elaborado pela autora a partir da análise de resultados e com base na literatura correlata

Tabela 9: Proposta de atribuição dos pigmentos fundamentados resultados SEM-EDS confrontando dados da literatura de Portinari

Sugestão de pigmento por amostra fundamentado resultados SEM-EDS e literatura							
Elementos químicos SEM-EDS	AM 5	AM 10	AM12	AM 6	AM 13	AM 14	Fórmulas Químicas dos pigmentos
Na	-	-	-	-	-	Azul ultramar	$\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$
P	-	-	-	-	Violeta de cobalto	Violeta de cobalto	$\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$
S	Sulfato de cálcio	Sulfato de cálcio	Sulfato de cálcio	Sulfato de cálcio	Sulfato de cálcio	Sulfato de cálcio	$\text{CaSO}_4$
Se	-	-	-	-	Seleneto de zinco	Seleneto de zinco	$\text{ZnSe}$
Si	Silicatos	Silicatos	Silicatos	Silicatos	Silicatos	Silicatos	$\text{SiO}_2$
Mg	Silicato de magnésio	Silicato de magnésio -		Silicato de magnésio	Silicato de magnésio	Silicato de magnésio	$\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$

Fonte: adaptado pela autora a partir da análises dos resultados SEM-EDS com base na literatura correlata ( ROSADO et al., 2014)

Figura 16: Gráfico bar plot de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao MEV por amostra analisada



#### 6.5 Sumarização dos dados obtidos pelo cruzamento de informações fornecidas pelos exames físico-químicos de espectroscopia IV, Raman e pelo MEV

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas por espectroscopia IV, Raman e pelo MEV nos fragmentos analisados foram elencados, confrontados e, fundamentados nesses resultados foi possível propor que estavam presentes nas três análises supracitadas as substâncias: dióxido de titânio, carbonato de cálcio e óxido de ferro. Considerando os exames IV e MEV combinados, foram encontradas as substâncias dióxido de zinco, amarelo de cádmio, azul ultramar, óxido de cromo e verde de ftalocianina. Já observando somente os exames Raman e MEV combinados foi identificado o dióxido de chumbo, sendo que, curiosamente, esses pigmentos contém os elementos químicos como chumbo e cádmio que foram apontados por compêndios médicos como causa da intoxicação severa (atingindo sistema imunológico e neurológico) do artista. Portinari enfrentou sinais e sintomas agravados dessa intoxicação, e veio a falecer, sendo relatado que o artista tinha o hábito deletério de encaixar a haste do pincel na boca e, como esse continha resíduos de pigmentos, limpava o excesso de tinta do pincel com a boca e no tecido de seu avental (EVANGELISTA; SILVA, 2013). Esses dados dos exames físico-químicos foram confrontados e sumarizados, como é possível constatar na TABELA 10. A FIGURA 17, representa cruzamento de dados obtidos aos três exames supracitados juntos, e

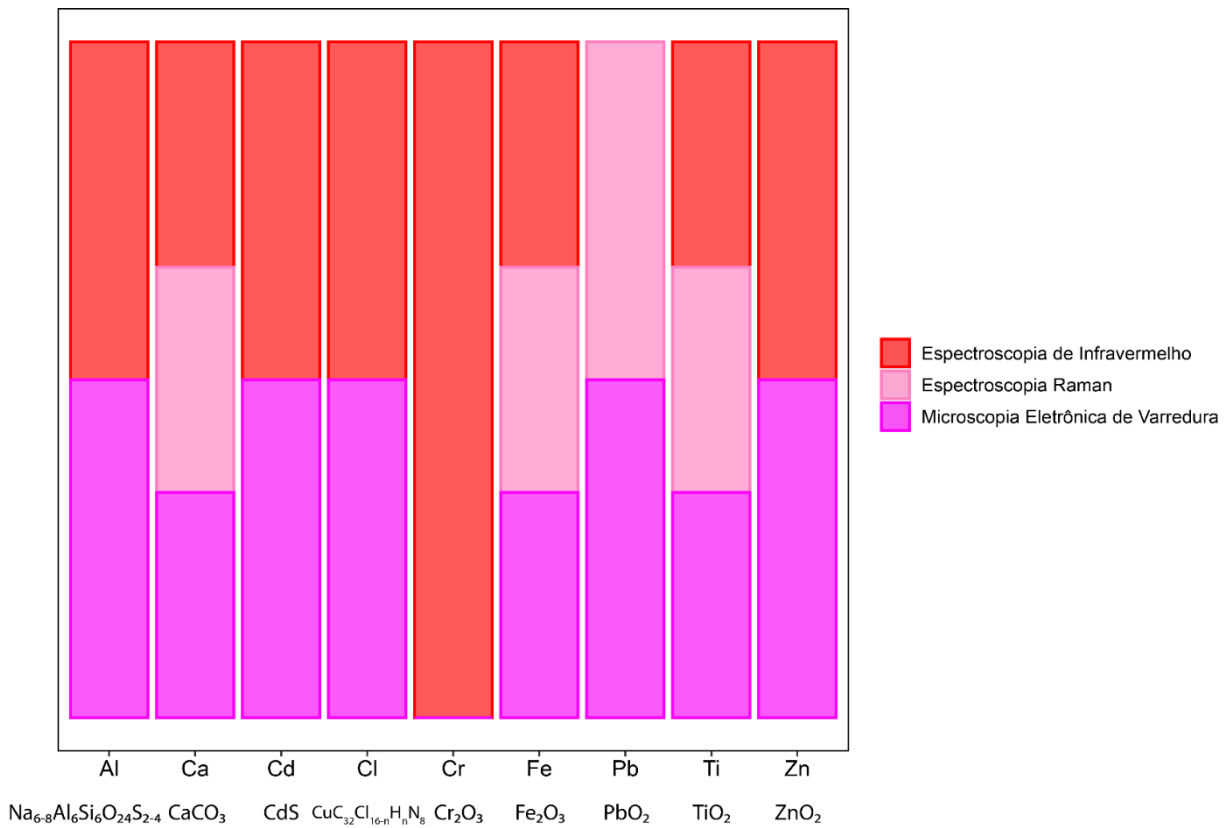
foram sumarizados, proporcionando a compreensão e comparação dos resultados encontrados. Por exemplo, as substâncias: dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e óxido de ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) foram encontradas aos três exames IV, (representado ao gráfico na cor vermelha), Raman, (representado na cor rosa clara), e ao MEV (representada na cor rosa escura). O óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) foi encontrado apenas ao IV (representado em vermelho). Aos exames Raman, (ao gráfico está representado em rosa claro), e MEV (representado em rosa escuro), combinados foi identificado o dióxido de chumbo ( $\text{PbO}_2$ ). Os compostos dióxido de zinco ( $\text{ZnO}_2$ ), seleneto de cádmio ( $\text{CdS}$ ), azul ultramar ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ ) e verde de ftalocianina ( $\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{H}_{16}\text{N}_8$ ) foram encontrados ao IV, (representado ao gráfico na cor vermelha), e, também ao MEV (representado na cor rosa escura).

Tabela 10: Atribuição de pigmentos fundamentados traços de elementos químicos conforme cruzamentos dos exames: Espectroscopia Raman, IV e MEV

Traços de elemento químico	Espectroscopia de Infravermelho	Espectroscopia Raman	Microscopia Eletrônica de Varredura	Atribuição de Pigmentos/ Fórmula do Pigmento em acordo com exames realizados
<b>Ti</b>	x	x	x	Dióxido de Titânio ( $\text{TiO}_2$ )
<b>Zn</b>	x	-	x	Dióxido de Zinco ( $\text{ZnO}_2$ )
<b>Ca</b>	x	x	x	Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ )
<b>Fe</b>	x	x	x	Óxido de ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )
<b>Cd</b>	x	-	x	CdS
<b>Pb</b>	-	x	x	Dióxido de chumbo ( $\text{PbO}_2$ )
<b>Al</b>	x	-	x	Azul ultramar ( $\text{Na}_{6-8}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$ )
<b>Cl</b>	x	-	x	Verde de ftalocianina ( $\text{CuC}_{32}\text{Cl}_{16-n}\text{H}_{16}\text{N}_8$ )
<b>Cr</b>	x	-	-	Óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ )

Fonte: elaborado pela autora a partir da análise de resultados dos Raman, IV e MEV

Figura 17: Gráfico bar plot de atribuição de pigmentos e/ou aglutinantes orgânicos ou inorgânico ao IV, Raman e MEV

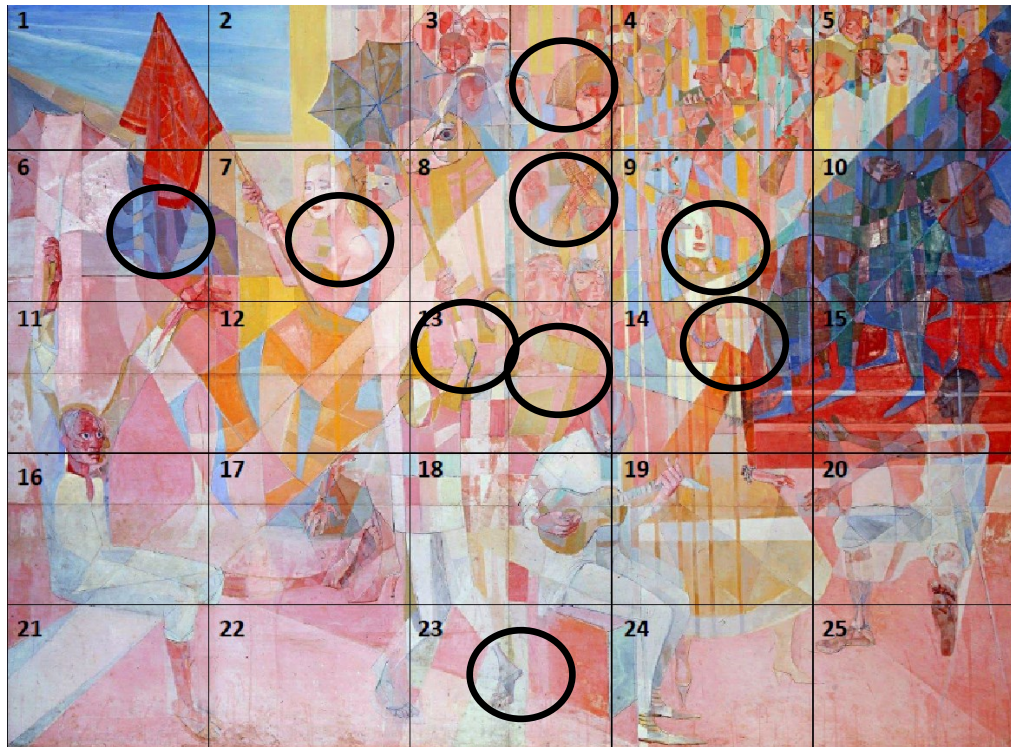


Fonte: elaborado pela autora a partir da análise de resultados IV, Raman e MEV

#### 6.6 Registros fotográficos à luz visível e seus detalhes como o biofilme formado na superfície pictórica

Por meio do mapeamento e registro fotográfico das áreas em que foram coletadas as amostras microbiológicas, foi possível organizar os dados, distinguindo 22 amostras constantes entre áreas não terminadas pelo artista. Algumas áreas pertencentes às regiões não terminadas encontravam-se visivelmente deterioradas (presença de biofilmes nas regiões: 3, 6, 7, 8, 9, 13, 14 e 23) conforme FIGURA 18, e que foram fotografadas no modo aproximação da lente, capturando detalhes, por exemplo, da formação do biofilme constante nas regiões supracitadas e em evidência detalhada na área 3 (FIGURA 19). Isso possibilitou a documentação científica por imagem à luz visível do biofilme microbiano na superfície pictórica, e, também o registro de detalhes técnicos da pintura realizada por Portinari (como o sentido das pinceladas na aplicação de tintas no suporte em madeira) entre as áreas terminadas da obra.

Figura 18: Fotografia com mapeamento das áreas visivelmente com biofilme pintura “Frevo”



Fonte: acervo da autora, 2016

Figura 19: Detalhamento da área 3 visivelmente com biofilme microbiano na pintura “Frevo”



Fonte: acervo da autora, 2021

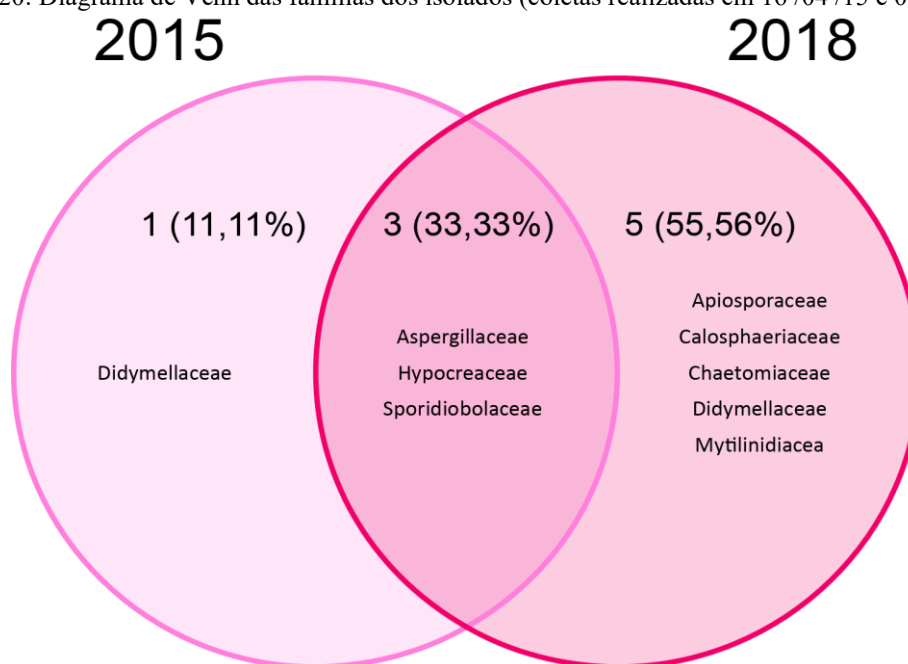
### 6.7 Identificação morfológica e molecular dos fungos baseada na região de ITS do rDNA

A caracterização molecular utilizando o sequenciamento da região ITS do rDNA permitiu identificar em nível de família 14 isolados fúngicos no presente trabalho e, ainda, corroborou na confirmação e complementação dos dados obtidos na classificação morfológica

ao nível de gênero, realizada em etapa anterior por análises taxonômicas macro e micromorfológicas. Os isolados sequenciados apresentaram em torno de 99 a 100% de identidade de suas sequências, comparando-os com os dados de espécies de fungos sequenciados/depositados no banco de dados GenBank do NCBI (TABELA 11).

De um total de 14 isolados, considerando esse valor total correspondente a 100%, foram encontrados 13 (92,88%) pertencentes ao filo Ascomycota, e, 1 (7,14%) ao Basidiomycota. Eles ainda foram classificados como pertencentes a 8 diferentes famílias: 6 pertencentes a família Aspergillaceae (11,1%), 2 Didymellaceae (11,1%), 1 Hypocreaceae (11,1%), 1 Sporidiobolaceae (11,1%). 1 Apiosporaceae (11,1%), 1 Calosphaeriaceae (11,1%), 1 Chaetomiaceae (11,1%) e 1 Mytilinidiaceae (11,1%) conforme é possível averiguar na FIGURA 20 intitulada Diagrama de Venn dos isolados.

Figura 20: Diagrama de Venn das famílias dos isolados (coletas realizadas em 16 /04 /15 e 06 /04 /18)

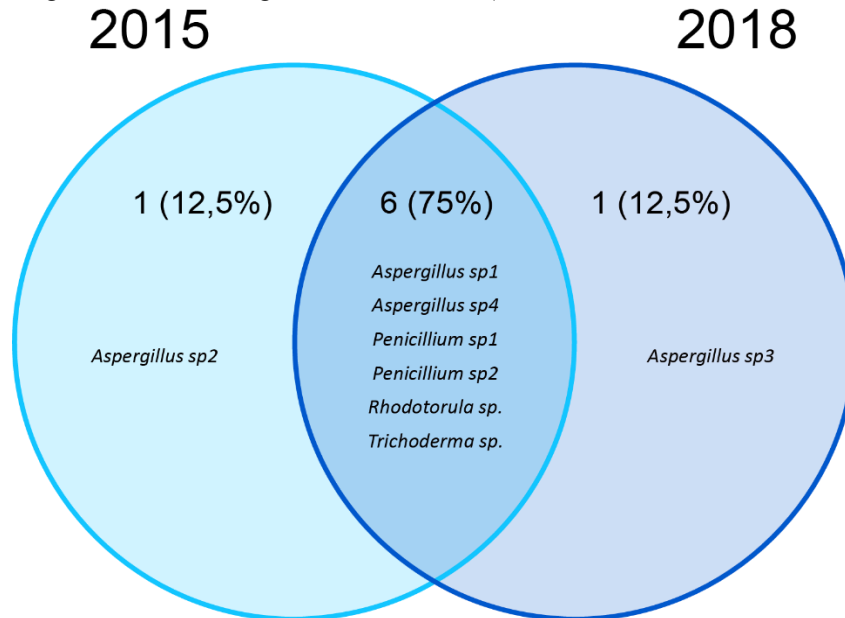


Fonte: elaborado pela autora a partir da análise de resultados dos isolados

Com relação às análises morfológicas, seis isolados da família Aspergillaceae foram classificados em dois diferentes gêneros *Aspergillus* sp. (4) e *Penicillium* sp. (2), e, um dos isolados da família Sporidiobolaceae foi classificado no gênero *Rhodotorula* sp. e 1 isolado da família Hypocreaceae foi classificado no gênero *Trichoderma* sp. A família Didymellaceae está representada no diagrama de Venn das famílias dos isolados, duas vezes em (2015 e 2018), pois essa informação está relacionada a espécies diferentes e também relacionadas a coletas em

momentos diferentes. Os resultados de identificação ao nível de família encontram-se elencados na TABELA 12.

Figura 21: Diagrama de Venn dos gêneros dos isolados (coletas realizadas em 16 /04 /15 e 06 /04 /18)



Fonte: elaborado pela autora a partir análise dos resultados dos isolados

Os achados de *Aspergillus* e *Penicillium* em pinturas já eram esperados pois esses gêneros são frequentes e seus esporos são abundantemente encontrados tanto em ambientes abertos quanto em fechados (PORTNOY et al., 2001; DOCAMPO et al., 2010). É possível visualizar no Diagrama de Venn os gêneros dos isolados encontrados na pintura conforme classificação morfológica e taxonômica clássicas que constam ainda na FIGURA 21 e na TABELA 12. Os fungos do gênero *Aspergillus* são capazes de crescer mesmo sob condições de deficiência nutricional (KORPI et al., 1997), esse gênero foi encontrado nas coletas realizadas em 2015 e 2018. Já os fungos do gênero *Penicillium* foram encontrados em ambas coletas realizadas nos anos de 2015 e 2018.

Cabe ressaltar que a coleta dos isolados na obra “Frevo” foi realizada em dois dias diferentes, foram eles dias: 16/04/15 e 06/04/18. Sendo que a coleta de 2015 foi realizada preliminarmente à escrita do projeto de doutorado e a de 2018 já ocorreu no início da execução desse projeto de pesquisa. As coletas de bioprospecção foram imprescindíveis para avaliar a presença dos isolados na superfície pictórica e sua possível sucessão ecológica no período. Para tal, foram analisados os parâmetros climáticos desses dias aferidos da estação climática operante em Belo Horizonte, cujo código cadastrado no INMET é (OMM: 83587). Além das

análises de composição dos materiais e técnicas por meio de análises físico-químicas que foram empregadas para compreensão do substrato ao qual os fungos estão associados, é importante compreender o local e clima onde a obra pesquisada encontra-se exposta, pois ambos são fatores determinantes para interpretação do fenômeno de biodeterioração microbiana (CANEVA et al., 2008).

Nesse sentido, foram compilados dados da estação meteorológica próxima à obra pesquisada tais como como precipitação, que se mantiveram nos mesmos valores em ambas as datas na TABELA 11.

Tabela 11: Dados meteorológicos mensurados nos dias das coletas

Data da Coleta	Precipitação (mm)	Temp Máx °C	Temp Min °C	Insolação W / m <sup>2</sup>	Evaporação	Umidade Relativa Média %	Velocidade média do vento km / h
16/04/15	0000-1200	10 – 26,6	19,9 – 4	6,1	22,78	65,75	1,35
06/04/18	0000-1200	10,5-26,1	20,6 – 2,8	3,1	22,32	66,5	1,33

Fonte: [http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera\\_serie\\_txt.php?&mreleacao=83587&btnprocesso=serie&](http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera_serie_txt.php?&mreleacao=83587&btnprocesso=serie&)

As diferenças entre as médias das temperaturas máximas entre os dois dias analisados variaram 5 °C a mais em relação ao segundo dia de coleta (06/04/18), ou seja, o primeiro dia apresentou temperatura máxima mais elevada em relação ao segundo. Já a diferença entre as médias das temperaturas mínimas variou 0,25 °C também com o valor maior para o primeiro dia de coleta (16/04/15).

A diferença entre as taxas de insolação variou também em 3 kW/h a mais para o primeiro dia de coleta em relação ao segundo, fato que se assemelha com os dados analisados acima, em que as temperaturas médias foram mais elevadas também para o primeiro dia (pois com maior insolação a temperatura mensurada é mais alta).

A subtração da taxa de umidade relativa demonstrou que no segundo dia essa estava mais elevada em 1,25 % em relação ao primeiro. A diferença da taxa de evaporação dos dois dias resultou em uma quantidade maior dessa taxa para o primeiro dia (16/04/15).

Por último, a variável velocidade do vento variou em 0,02 Km/ h a mais para o primeiro dia. Esse dado relativo à atividade/comportamento do vento colabora um pouco no entendimento da dinâmica de dispersão dos esporos fúngicos pelo ar (RESENDE, 1997, 2008; CAPPITELLI et al., 2010). Esses dados são externos ao edifício do PIC, unidade centro, onde está localizada a obra de Portinari. A parte interna do edifício não possui monitoramento de

parâmetros climáticos, por isso os dados do INMET foram importantes para inferência dos dados internos do edifício pois a obra “Frevo”, uma vez que o objeto dessa pesquisa se situa no *hall* e está exposto diretamente a oscilação do clima local.

Dedesko e Siegel (2015) afirmam que a umidade descontrolada em edifícios principalmente na área interna pode resultar em inúmeros problemas, sendo que a umidade interna pode resultar de inúmeras fontes, incluindo o fluxo de ar livre por difusão de vapor através do envelope do edifício, penetração de precipitação de chuva, incluindo atividades internas no ambiente como cozinha, limpeza e banho. Nesse sentido, é imprescindível enfatizar que a obra está exposta no *hall* da sede administrativa do clube na Praça da Liberdade BH, MG e esse *hall* o qual dá acesso direto à rua Cláudio Manoel, cujo fluxo de trânsito de veículos domésticos e de transporte público é intenso. Essa rua apresenta-se bastante arborizada e, segundo Saiz-Jimenez (1995), a contaminação da superfície por poluentes não microbiológicos aumenta a probabilidade de microrganismos heterotróficos colonizarem e crescerem em filmes de tinta.

Outro aspecto importantíssimo que coincide com a afirmação de Dedesko e Siegel (2015) de que a umidade interna proveniente de atividades de preparo de alimentos corrobora diretamente para ocorrência de biodeterioração interna, e se faz mister informar, é que ao lado desse *hall* onde está a obra encontra-se um restaurante que se expande aos fundos desse ambiente. Esse estabelecimento comercial conta atividades diárias de preparo e fornecimento de alimentações, no horário de: 8hs às 20hs, é aberto para associados e visitantes, localiza-se ainda no andar superior uma academia para atividades físicas dos associados, portanto, o fluxo de pessoas é grande e intenso devido aos andares superiores serem locados para as aulas práticas e estágios de discentes da Pontifícia Universidade Católica de BH, MG.

Todos esses fatores elencados resultam em problemas técnicos de biodeterioração que dificultam a conservação e salvaguarda da obra. Segundo Allsopp e colegas (2004), o crescimento de fungos e a diversidade desses aumentam com presença de umidade interna. Esses autores afirmam ainda que em ambientes onde os parâmetros de climatização interna não são controlados e que possuam materiais internos tais como pinturas, são características que os tornam susceptíveis à biodeterioração fúngica.

As mensurações climáticas em ambas as datas analisadas para esse estudo mostram pequenas variações conforme dados supracitados (T°C e UR %,) disponibilizados pelo INMET e segundo a literatura, sob condições diferenciadas de clima podem ocorrer variações na sucessão na microbiota conforme discutem os autores (CHAPIN et al., 2002; TORTORA et al.,

2004; CANEVA et al., 2008). Os autores justificam que a sucessão e a variabilidade da microbiota do ar e das superfícies está sob influência direta da variabilidade dos dados climáticos. Os isolados encontrados em ambos os anos 2015 e 2018, ambos no mês (abril) como *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium citrium*, *P. chrysogenum*, *Trichoderma reesei* e *Rhodotorula mucilaginosa* demonstram a possibilidade de sobrevivência desses microrganismos em um mesmo ambiente e em uma mesma estação climática. No entanto, a diferença de variedade dos isolados encontrados em 2015 apresenta-se menor que em 2018, isso pode ser justificado pela UR e as médias das T máximas e mínimas nesse ano terem sido maiores que em 2015, conforme discutiram os autores (CHAPIN et al., 2002; TORTORA et al., 2004), fato que favorece a variação de espécies, apesar da taxa de velocidade do vento ter se apresentado menor. Segundo Capitelli e colaboradores (2010), os dados climáticos de UR > 60% e a Temperatura média > 23°C em ambientes internos podem favorecer o crescimento dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* em bens culturais, pois esses microrganismos podem utilizar elementos desses pigmentos como fonte energética, os pigmentos, entre outros componentes que podem suplementar a busca desses por diversos nutrientes. Os achados da presente pesquisa corroboram com a literatura correlata.

Segundo Caneva e colaboradores (2008) os fenômenos de biodeterioração notados em pinturas murais dependem em grande parte dos materiais e técnicas empregados na realização da obra e das condições ambientais em que a obra se encontra. Os isolados identificados retratam a complexidade de materiais do substrato da obra “Frevo”, uma vez que se trata de uma pintura painel cuja técnica mista (óleo sob madeira), composta por materiais orgânicos (aglutinante triacilglicerol/óleo de linhaça e o pigmento verde de ftalocianina) e por materiais inorgânicos (dióxido de zinco/branco de zinco, óxido de titânio/ branco de titânio, carbonato de cálcio/gipsita, azul ultramar/lápis lazúli entre outros). Com essa composição, averiguada por técnicas como espectroscopia IV, Raman e microscopia eletrônica de varredura modo EDS, era esperado encontrar fungos associados às pinturas à óleo e ao suporte em madeira, conforme encontrado no presente estudo conforme (TABELA 12).

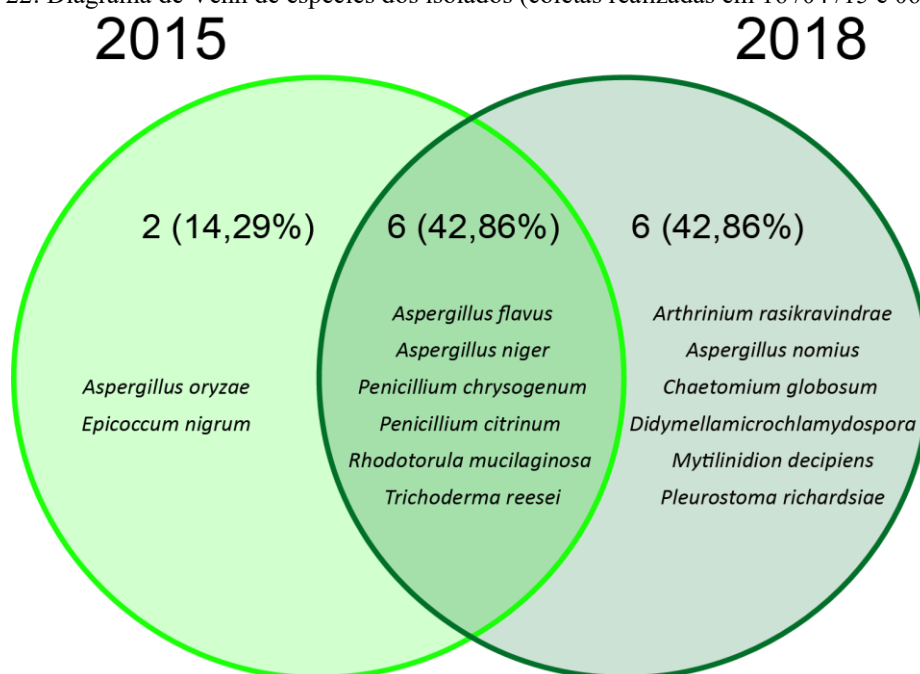
Tabela 12: Identificação morfológica e molecular dos isolados

Código do isolado	Família	Gênero morfológico	Identificação molecular (rDNA-ITS)	Identidade (%)	Cobertura (%)	Correspondência de acesso NCBI	Ano de coleta e identificação
AM 8		<i>Penicillium sp1</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	100%	100%	EU833213	2015 & 2018
AM11	Aspergillaceae	<i>Aspergillus sp1</i>	<i>Aspergillus niger</i>	100%	100%	MG976500.1	2015 & 2018
AM14 CB		<i>Aspergillus sp2</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	100%	100%	MH879860.1	2015
AM14 CV		<i>Aspergillus sp3</i>	<i>Aspergillus nomius</i>	99,69%	91%	MK841463.1	2018
AM18 A	Hypocreaceae	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	100%	100%	MF076623.1	2015 & 2018
AM 6	Didymellaceae	-	<i>Didymella microchlamydospora</i>	100%	100%	MH862504.1	2018
AM 11A	Sporidiobolaceae	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100%	100%	MF940134.1	2015 & 2018
AM13 CM	Didymellaceae	-	<i>Epicoccum nigrum</i>	100%	100%	MG602588.1	2015
AM13 CV	Aspergillaceae	<i>Penicillium sp2</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	100%	MK088497.1	2015 & 2018
AM16 CR	Apiosporaceae	-	<i>Arthrimum rasikravindrae</i>	100%	100%	KU940143.1	2018
AM19 LR	Mytiliniaceae	-	<i>Mytilinidion decipiens</i>	100%	99,29%	MH855534.1	2018
AM24 CV	Calosphaeriaceae	-	<i>Pleurostoma richardsiae</i>	100%	100%	MK268142.1	2018
AM24 CB	Chaetomiaceae	-	<i>Chaetomium globosum</i>	100%	100%	MG664777.1	2018
AM25 CV	Aspergillaceae	<i>Aspergillus sp4</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	100%	100%	MH186025.1	2015 & 2018

Fonte: elaborado pela autora a partir da análises dos resultados dos isolados

A partir da identificação dos isolados foi elaborado um diagrama de Venn que representa a incidência dos isolados encontrados nas coletas realizadas em 2015 e 2018 conforme Figura 22. Esse diagrama demonstrou que duas espécies dos isolados (14,29%) dos isolados fúngicos, *Aspergillus oryzae* e *Epicoccum nigrum*, foram encontrados apenas na coleta de 2015. E seis isolados (42,86%) isolados, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichoderma reesei* foram encontrados em ambas as coletas (2015 e 2018). Já seis (42,86%) dos isolados *Arthrinium rasikravindrae*, *Aspergillus nomius*, *Chaetomium globosum*, *Didymella microchlamydospora*, *Mytilinidion decipiens* e *Pleurostoma richardsiae* foram bioprospectados apenas em 2018.

Figura 22: Diagrama de Venn de espécies dos isolados (coletas realizadas em 16 /04 /15 e 06 /04 /18)



Fonte: elaborado pela autora a partir dos dados isolados encontrados

Uma extensa consulta realizada na literatura internacional e nacional usando bases como Scopus (<https://www.scopus.co>), Science Direct (<https://www.sciencedirect.com>), Web of Science (<http://www.webofknowledge.com>) e Google Acadêmico (<https://scholar.google.com>) sobre bioprospecção de fungos em pinturas foram considerados no presente texto e os artigos reportaram isolados principalmente pertencentes a família Aspergillaceae. Nessa família foram reportados dois gêneros, *Aspergillus* e *Penicillium*, que foram encontrados na literatura em diversos substratos pictóricos tais como pinturas (afrescos) (GIACOBINNI et al., 1991; GUGLIELMINETTI et al., 1994; CIFERRI, 1999; GORBURSHINA et al., 2004; SZOSTAK-

KOTOW, 2004; HUMBER; HANSEN, 2005; GREIF; CURRAH, 2007; PEPE et al., 2007; CAPODICASA et al., 2010; MOZA et al., 2012; PANGALLO et al., 2012 SILVA et al., 2013; ROSADO et al., 2014; GIL et al., 2015; ROSADO et al., 2017; UNKOVIĆ et al., 2017; ROSADO et al., 2019), pinturas sob tela (CAPODICASA et al., 2010; LOPEZ-MIRAS et al., 2013; GOMAIU et al., 2016; OKPALANOZIE et al., 2016; SALVADOR et al., 2017; CASELLI et al., 2018) e por último em pinturas rupestres (WAKELIN et al., 2004; BASTIAN et al., 2010; MA et al., 2015.) Esses resultados para ambos os gêneros já eram aguardados, pois ambos são gêneros ubíquos e foram encontrados conforme consta sumarizado na (TABELA 13).

A espécie *Aspergillus flavus* foi reportada em afrescos em diversas publicações (DHAWAN et al., 1991; DORNIEDEN et al., 2000; PANGALLO et al., 2008; 2012 PEPE et al., 2010; PANGALLO et al., 2012; KHALAPHALLAH et al., 2015; ROSADO et al., 2015; UNKOVIĆ et al., 2017; ELHAGRASSY, 2019), em uma pintura vinílica contemporânea brasileira (BONIEK et al., 2018) e nessa pesquisa. Já o *Aspergillus niger* foi reportado em pesquisas sobre bioprospecção em pinturas, a maioria em afrescos (DHAWAN et al., 1991 e 1992; GUGLIELMINETT et al., 1994; DORNIEDEN et al., 2000; PEPE et al., 2010; HELMI et al., 2011; ROSADO et al., 2015; VENERANDA et al., 2017; UNKOVIĆ et al., 2017; ELHAGRASSY, 2018; STOYANCHEVA et al., 2018; ROSADO et al., 2019) e uma pesquisa sob pintura vinílica sobre madeira (BONIEK et al., 2018) e no estudo vigente de bioprospecção de fungos em pintura óleo sobre madeira (compensado naval) é primeira vez que é encontrado. O *Aspergillus oryzae* foi reportado em dois estudos de prospecção de microrganismos em afrescos (UNKOVIĆ et al., 2017) e um estudo em pintura à óleo sobre madeira (SANTOS et al., 2009) e na pintura painel dessa pesquisa.

A espécie *Penicillium citrinum* foi reportada em artigos cujo objeto de estudo eram também pinturas murais em que a técnica empregada foi o afresco (SÁIZ-JIMÉNEZ; SAMSON; 1981; DHAWAN et al., 1991 e 1992; SENBUA; WICHITWECHKARN, 2019), em uma pintura brasileira de tinta vinílica sobre madeira (BONIEK et al., 2018) e no presente trabalho. Já a espécie *Penicillium crysogenum* foi reportada em inúmeros estudos (SÁIZ-JIMÉNEZ; SAMSON; 1981; GUGLIELMINETTI et al, 1994; PEPE et al., 2010; MOZA et al., 2012), todos correspondendo a pinturas murais (afrescos), e também foi reportada em pinturas rupestres e em tumbas na Itália e China (GAMBINO et al., 2017; MA et al., 2020).

O gênero *Arthrimum* foi reportado em pinturas murais do tipo afrescos (GUGLIELMINETTI et al, 1994; UNKOVIĆ et al., 2015).O gênero *Chaetomium* foi

encontrado em estudos em afrescos (GUGLIELMINETT et al., 1994; PANGALLO et al., 2012), e foi relatada ainda presença da espécie *Epicocum nigrum* em vários estudos (DHAWAN et al., 1992; GUGLIELMINETT et al., 1994; DHAWAN et al., 2002; PANGALLO et al., 2012; UNKOVIC et al., 2017) que coincidem com os mesmos achados desse trabalho. A espécie *Chaetomium globosum* foi identificada em uma pintura sobre madeira (SANTOS et al., 2009), em pinturas de cavalete em óleo sobre tela (OKPALANOZIE et al., 2016), e em outra pintura de técnica mista óleo e cera sob tela (SILVA, 2016) e recentemente na pintura “Frevo”. O gênero *Didymella* foi reportado em estudos antigos (IONITA, 1973; SÁIZ-JIMÉNEZ; SAMSON; 1981).

A levedura do gênero *Rhodotorula* foi reportada em diversos artigos de pinturas murais do tipo afrescos e no teto em igrejas (ROSADO et al., 2013; ROSADO et al., 2014; ROSADO et al., 2015; ROSADO et al., 2019). Já a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* foi reportada em apenas um estudo (ROSADO et al., 2014) e na bioprospecção dessa pesquisa de tese.

O gênero *Trichoderma* foi encontrado em publicações de bioprospecção de afrescos (DHAWAN, 2002; MARTINS et al., 2009; PALLA et al., 2010; GIL et al., 2015; ROSADO et al., 2015) e em pintura a óleo sobre tela (GOMAIU et al., 2016), sendo que o gênero também foi encontrado em pinturas rupestres (DU PONT et al., 2007; SUGIYAMA et al., 2008; SUGIYAMA et al., 2017). Porém a espécie *Trichoderma reesei*, que foi encontrada no presente estudo, é um achado novo em pinturas sobre madeira.

Já as cinco espécies *Aspergillus nomius*, *Arthrinium rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Mytilinidion decipiens* e *Pleurostoma richardsiae* encontradas nessa pesquisa da obra “Frevo” de Portinari são achados inéditos em pinturas.

Os dados encontrados na literatura que constam em discussão no presente texto foram sumarizados ainda na TABELA 13, e, foram comparados minuciosamente com achados na consulta bibliográfica supracitada, e trazidos para enriquecer a discussão com as devidas ressalvas dos achados fúngicos por substratos encontrados. É relevante ressaltar que maioria dos isolados encontrados na presente pesquisa corroboram com a literatura correlata, e ainda fundamental destacar os cinco isolados inéditos encontrados no presente estudo.

Tabela 13: Pinturas em suportes e materiais diversos e os gêneros ou espécies reportadas na literatura

Pinturas	Composição do substrato de coleta	Família	Gênero	Espécie	Referências Bibliográficas	
Afrescos	Areia, ovo, cal e pigmentos	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	GIACOBINNI et al., 1991; GUGLIELMINETTI et al, 1994; CIFERRI, 1999	
			<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium sp.</i>	GORBURSHINA et al., 2004; SZOSTAK-KOTOW, 2004; HUMBER e HANSEN, 2005; GREIF e CURRAH, 2007; PEPE et al., 2007; CAPODICASA et al., 2010; MOZA et al., 2012; PANGALLO et al., 2012	
				<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	SILVA et al., 2013; ROSADO et al., 2014; GIL et al., 2015; ROSADO et al., 2017; UNKOVIĆ et al., 2017; ROSADO et al., 2019
				<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	DHAWAN et al., 1991; DORNIEDEN et al., 2000; PANGALLO et al., 2008; PEPE et al., 2010; PANGALLO et al., 2012; KHALAPHALLAH et al., 2015; ROSADO et al., 2015; UNKOVIĆ et al., 2017; ELHAGRASSY, 2019
				<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	DHAWAN et al., 1991 e 1992; GUGLIELMINETTI et al., 1994; DORNIEDEN et al., 2000; PEPE et al., 2010; HELMI et al., 2011; ROSADO et al., 2015; VENERANDA et al., 2017; UNKOVIĆ et al., 2017; ELHAGRASSY, 2018; STOYANCHEVA et al., 2018; ROSADO et al., 2019
				<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	UNKOVIĆ et al., 2017
				<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium crysogenum</i>	SÁIZ-JIMÉNEZ &SAMSON; 1981; DHAWAN et al., 1991 e 1992; SENBUA, & WICHITWECHKARN, 2019
		Apiosporaceae	<i>Arthrimum</i>	<i>Arthrimum sp.</i>	SÁIZ-JIMÉNEZ; SAMSON; 1981; GUGLIELMINETTI et al, 1994; PEPE et al., 2010; MOZA et al., 2012	
		Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium sp</i>	GUGLIELMINETTI et al, 1994; UNKOVIĆ et al., 2015	
		Afrescos	Areia, ovo, cal e pigmentos	Didymellaceae	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>
<i>Didymella</i>	<i>Didymella sp.</i>				DHAWAN et al., 1992; GUGLIELMINETTI et al, 1994; DHAWAN et al., 2002; PANGALLO et al., 2012; UNKOVIĆ et al., 2017	
Sporidiobolaceae	<i>Rhodotorula</i>			<i>Rhodotorula</i>	IONITA, 1973; SÁIZ-JIMÉNEZ &SAMSON; 1981	
				<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	ROSADO et al., 2013; ROSADO et al., 2014; MA et al., 2015; ROSADO et al., 2015; ROSADO et al., 2017; ROSADO et al., 2019	
Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>			<i>Trichoderma sp.</i>	ROSADO et al., 2014	
				DHAWAN, S., 2002; MARTINS et al., 2009; PALLA et al., 2010; GIL et al., 2015; ROSADO et al., 2015		

Pinturas	Composição do substrato de coleta	Família	Gênero	Espécie	Referências Bibliográficas
Pintura de cavalete	Tela (tecido) e óleo	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp</i>	CAPODICASA et al., 2010; LOPEZ-MIRAS et al., 2013; GOMAIU et al., 2016; OKPALANOZIE et al., 2016; SALVADOR et al., 2017; CASELLI et al., 2018
			<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium sp.</i>	
	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	OKPALANOZIE et al., 2016	
	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	SANTOS et al., 2009	
	Sporidiobolaceae	<i>Rhodotorula sp</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ROSADO et al., 2014; ROSADO et al., 2017	
Tinta vinílica sob madeira	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	BONIEK et al., 2018	
		<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus niger</i>		
		<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citrinum</i>		
Pinturas rupestres	Rochas, ovos e pigmentos	Aspergillaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	WAKELIN et al., 2004 BASTIAN et al., 2010; MA et al., 2015
			<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium sp.</i>	
Pinturas rupestres	Rochas, ovos e pigmentos	Aspergillaceae	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium crysogenum</i>	GAMBINO et al., 2017; MA et al., 2020
		Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	DU PONT et al., 2007; SUGIYAMA et al., 2008; SUGIYAMA et al., 2017

Fonte: Adaptado pela autora a partir da análise dos isolados encontrados e confrontando-os com dados reportados em literatura ( DHAWAN et al., 1991; DORNIEDEN et al., 2000; GUGLIELMINETTI et al., 1994; CIFERRI, 1999, GORBURSHINA et al., 2004; SZOSTAK-KOTOW, 2004; HUMBER e HANSEN, 2005; GREIF e CURRAH, 2007; PEPE et al., 2007; CAPODICASA et al., 2010; MOZA et al., 2012; PANGALLO et al., 2012; SILVA et al., 2013; ROSADO et al., 2014; GIL et al., 2015; ROSADO et al., 2017; UNKOVIĆ et al., 2017; ROSADO et al., 2019)

## 6.8 Fungos isolados produtores de enzimas

O ensaio *screening* enzimático realizado possibilitou a triagem qualitativa e seleção de fungos potencialmente produtores de xilanase, ou seja, fungos que apresentaram atividade potencial xilanolítica, e também de fungos produtores de celulase, que demonstraram atividade celulolítica nos substratos testados. Das 14 espécies isoladas testadas nenhuma produziu halos que indicassem atividade lipolítica e/ou lignolítica como é possível observar na TABELA 14. Somente 2 espécies não apresentaram, simultaneamente, atividade xilanolítica e celulolítica que foram a *Rhodotorula mucilaginosa* e o *Trichoderma reesei*, para os substratos empregados nos ensaios. Ainda a respeito das 14 espécies isoladas empregadas na triagem enzimática somente 4 espécies não apresentaram atividade celulolítica, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichoderma reesei*. Ainda na TABELA 14, constam os índices enzimáticos (IE) por espécie testada conforme análise proposta pelos pesquisadores (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; OLIVEIRA et al., 2006).

Tabela 14: Média dos índices enzimáticos por espécies e substrato

Isolados fúngicos	IE CMC (mm)	IE Xi (mm)	IE Lip(mm)	IE LiG (mm)
AM6 <i>Didymela microchlamydospora</i> .	1,43	1,81	-	-
AM8 <i>Penicillium citrinum</i>	1,49	1,86	-	-
AM 11 A <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> .	1	1	-	-
AM11 <i>A. niger</i>	1	1,67	-	-
AM13CV <i>P. crysogenum</i>	1,27	2,65	-	-
AM13 CM <i>Epicoccum nigrum</i>	1,55	2,21	-	-
AM14CV <i>A. nomius</i>	1,25	2,89	-	-
AM14CB <i>A. oryzae</i>	1	1,16	-	-
AM 16CR <i>Arthrimum rasinkravindrae</i> .	1,35	1,26	-	-
AM 18A <i>Trichoderma reesei</i> .	1	1	-	-
AM 19LR <i>Mytilinidion decipiens</i>	1,33	1,29	-	-
AM 24CV <i>Pleurostoma richardsiae</i>	1,46	1,41	-	-
AM 24CV <i>Chaetomium globosum</i>	1,43	1,08	-	-
AM25CV <i>A. flavus</i>	1,31	2,78	-	-

Fonte: elaborado pela autora a partir do resultados do ensaio do screening enzimático end point: IE=1 ausência de atividade enzimática, IE> 1 e <1,5 atividade enzimática baixa, IE>1,5 atividade enzimática intermediária, IE>2 atividade enzimática alta, e – não cresceu e não produziu halo

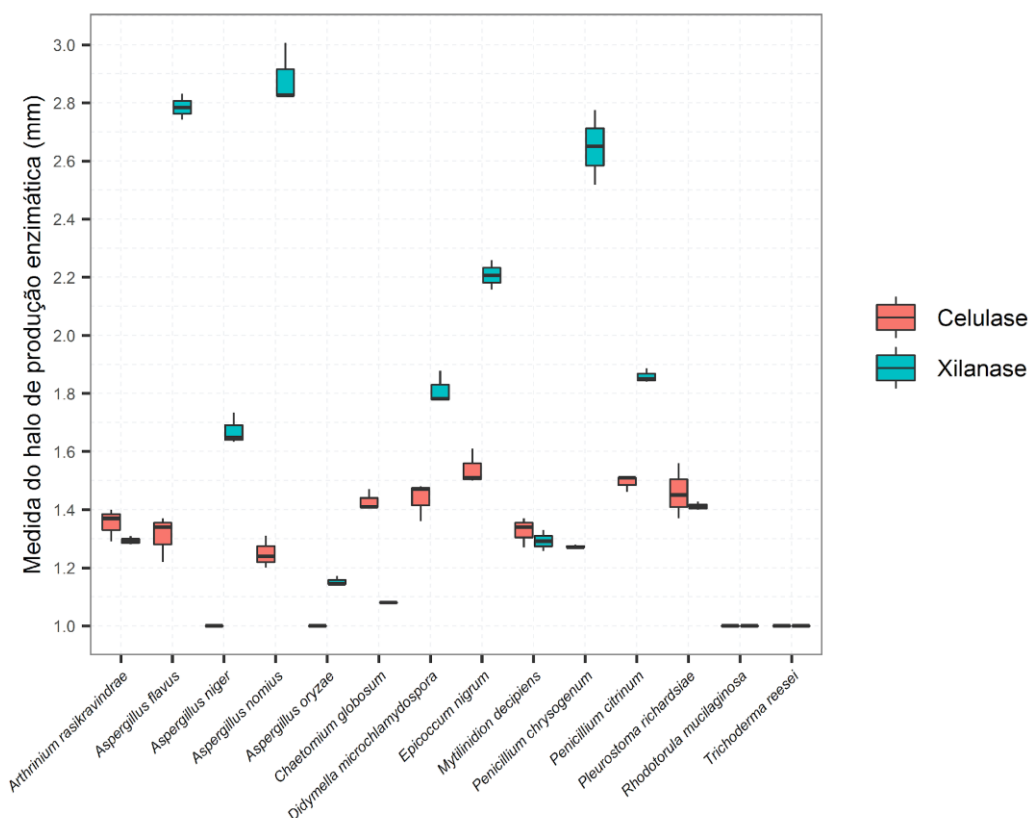
Os fungos que apresentaram atividades celulolíticas e xilanolíticas respectivamente consideradas baixas, de acordo com análise do IE, foram: *Arthrimum rasikravindrae*,

*Chaetomium globosum*, *Mytilinidion decipiens* e *Pleurostoma richardsiae*. Já o fungo que apresentou atividade xilanolítica considerada baixa de acordo com análise do IE foi o *Aspergillus oryzae*. O fungo que apresentou atividade celulolítica intermediária foi o *Epicoccum nigrum*. Os microrganismos que apresentaram atividade celulolítica consideradas baixas foram *Aspergillus nomius*, *A. flavus*; *Didymela microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*. Nenhum dos isolados apresentou atividade celulolíticas considerada alta. E os fungos que apresentaram atividade xilanolítica intermediária foram *Aspergillus niger*, *Didymela microchlamydospora* e *Penicillium citrinum*. Já os 4 isolados *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *Penicillium crysogenum* e *Epicocum nigrum* apresentaram atividades xilanolíticas consideradas altas. Os resultados para as atividades enzimáticas variaram entre os isolados, dados que estão em acordo com a literatura correlata (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; OLIVEIRA et al., 2006; FLORENCIO et al., 2012). Devido ao papel preponderante das enzimas hidrolíticas nos processos de deterioração em bens culturais, processos ecológicos e possíveis aplicações industriais, os resultados encontrados apontam a necessidade de realização de diferentes testes devido ao potencial de aplicação dessas para diversas finalidades (GARG et al., 1995; DA SILVA et al., 1997; BHAT, 2000; LYND et al., 2002; GRIMM et al., 2005; FERNANDES et al., 2005; MICHAELSEN et al., 2009; MONTEIRO; SILVA, 2009; ROSADO et al., 2015; HU et al., 2021).

Após a obtenção dos dados dos ensaios enzimáticos para celulase e xilanase, e, feitos os cálculos dos IEs desses isolados frente aos substratos testados, foi confeccionado um gráfico *box plot* (FIGURA 23). Esse foi elaborado para caracterizar os fungos em acordo com a atividade enzimática de cada um, demonstrando quais deles possuem melhor atuação em relação aos substratos testados. Ao analisar o gráfico é possível notar que 4 espécies não apresentaram atividade celulolítica são essas: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichoderma reesei* pois estão representadas com traço preto (indicam IE =1, ausência de atividade enzimática). Já a espécie *Chaetomium globosum* apresentou atividade xilanolítica pelo IE= 1,08, valor próximo de 1, ou seja, praticamente, não apresentou atividade xilanase (representada em azul). Ao passo que as espécies *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichoderma reesei* representadas no gráfico com traço preto (indicam IE =1, ausência de atividade enzimática). Apresentaram atividades celulolíticas e xilanolíticas respectivamente consideradas baixas, de acordo com análise do IE, ou seja,  $IE > 1$  e  $IE < 1,5$ , foram as espécies: *Arthrinium rasikravindrae*, *Chaetomium globosum*, *Mytilinidion decipiens* e *Pleurostoma richardsiae*. Os fungos que apresentaram atividade celulolítica, (representada em vermelho),

consideradas baixas, ou seja, com  $IE > 1$  e  $IE < 1,5$  foram os fungos: *Aspergillus nomius*, *A. flavus*; *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*. Os microrganismos que apresentaram atividade xilanolítica intermediária em acordo com  $IE > 1,5$  foram: *Aspergillus niger*, *Didymella microchlamydospora* e *Penicillium citrinum*. Os isolados *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *Penicillium crysogenum* e *Epicocum nigrum* apresentaram atividades xilanolíticas consideradas altas, ou seja,  $IE > 2$  (situadas na porção superior do gráfico *box plot* nas cores azuis). Nenhum dos isolados apresentou atividade celulolíticas considerada alta cujo  $IE > 2$  por isso constam (situadas na porção inferior do gráfico *box plot* nas cores vermelhas).

Figura 23: Gráfico *box plot* produção de enzimas (celulase e xilanase) por espécie fúngica



Fonte: elaborado pela autora a partir dos resultados dos ensaios de screening enzimático

#### 6.9 Ensaio de Concentração inibitória mínima com compostos encontrados na obra

As concentrações testadas para as drogas controles Captan (Sigma-Aldrich) e Nistatina (Bristol Myers Squibb) variaram de 0,5 a 0,0039 mM. Para a substância V1, a concentração

testada foi de 0,0039 a 0,5 mg/ml, e para as demais V2 a V14, as concentrações testadas variaram de 0,039 a 5 mM. Foi considerada a concentração inibitória mínima aquela concentração testada que reduziu 100% do crescimento fúngico conforme (CLSI, 2008).

O composto V6 (dióxido de zinco, ZnO<sub>2</sub>) (Merck) inibiu o crescimento de *Rhodotorula mucilaginosa* e *Arthrimum rasikravindrae* a 2,5 mM e inibiu o *Mytilinidion decipiens* em concentração de 5 mM.

O composto V7 (trióxido de zinco, ZnO<sub>3</sub>) (Baker) inibiu o crescimento de *Rhodotorula mucilaginosa* à 2,5 mM.

O V11 (dióxido de chumbo, PbO<sub>2</sub>) (Merck) inibiu o crescimento fúngico das espécies: *Epicoccum nigrum* a 0,039 mM, do *Penicillium crysogenum* a 0,3125 mM e da *Rhodotorula mucilaginosa* a 2,5 mM e do *Arthrimum rasikravindrae* a 0,625 mM.

Já o composto V13 (óxido de zinco, ZnO) (Kremer) inibiu o crescimento da *Rhodotorula mucilaginosa* a 5 mM e do *Arthrimum rasikravindrae* a 2,5 mM.

O composto V14 (azul ultramar, Na<sub>6</sub>Al<sub>6</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>24</sub>S<sub>2</sub>) (Kremer) inibiu o crescimento das espécies *Didymella microchlamydospora*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* a concentração de 0,1562 mM, inibindo ainda as espécies *Aspergillus oryzae* e *Pleurostoma richardsiae* a 0,0781 mM, inibindo ainda a *Rhodotorula mucilaginosa* à 2,5 mM e *Aspergillus nomius* a 0,3125 mM. A espécie *Arthrimum rasikravindrae* foi inibida na concentração de 1,25 mM.

A droga controle Captan (Sigma-Aldrich) variou inibindo os 13 isolados de 0,5 a 0,0039 mM conforme (CLSI, 2008). E a Nistatina (Bristol Myers Squibb) inibiu a *Rhodotorula mucilaginosa* a 0.0312 mM em conformidade com (CLSI, 2008). Somente a espécie *Mytilinidion decipiens* não foi inibida pela droga controle (Captan). Os controles de esterilidade do meio estavam em conformidade.

Esse ensaio de concentração inibitória mínima a partir de compostos identificados na obra pelos exames físico-químicos tais como (IV, Raman e MEV) são de suma importância para preservação e para o cuidado com os materiais constituintes da obra. No caso de pinturas, por exemplo, foi encontrado na literatura somente uma pesquisa que preza pelo princípio de preservação dos materiais presentes na obra original (VIETO et al., 2022). O ensaio de CIM a partir de compostos encontrados na obra corroborou para hipótese científica levantada por diversos autores pela qual os fungos podem utilizar largo espectro de nutrientes, tais como elementos químicos componentes de pigmentos minerais e/ou aglutinantes (como micronutrientes). Por exemplo, nesse ensaio *in vitro*, possivelmente os elementos químicos

presentes nos compostos (V2 a V14) e/ou aglutinantes tais como (V1 / óleo de linhaça), podem servir como fonte energética e de micronutrientes, inclusive para manutenção de atividades vitais e metabólicas dos microrganismos (IONITA, 1973; SAIZ-JIMENEZ et al., 1981; ALLSOPP et al., 2004; CANEVA et al., 2008; STERFLINGER, 2010; CALLOL, 2013; GOMOIU et al., 2018; MAZZOLLI et al., 2018). Nesse ensaio realizado frente aos 14 isolados fúngicos, a maioria dos fungos crescem na maior parte dos compostos testados, e em diversas concentrações avaliadas de 0,039 a 5 mM. Para a realização desse ensaio foi empregado como referência concentrações de compostos biocidas à 1%, essa é uma concentração usual para emprego de substâncias biocidas em bens culturais (SLAIBI et al., 2011), tais como o timol (HEINZEL, 1998; DI PASQUA et al., 2006; SLAIBI et al., 2011; CONNELL et al., 2013). Essa faixa de dosagem já foi testada e não ocasiona danos aos objetos culturais (DI PASQUA et al., 2006; SLAIBI et al., 2011), o timol, por exemplo atua ocasionando o rompimento da membrana celular microbiana, que causa o extravasamento de conteúdo plasmático levando a morte celular dos fungos (DI PASQUA et al., 2006; CONNELL et al., 2013).

Foi possível notar pelos dados de CIM, que foram elencados na Tabela 15, que os fungos isolados da pintura “Frevó”, de Portinari, cresceram em compostos puros e semi-puros que foram encontrados nos exames físico-químicos realizados nesse trabalho. Esses achados científicos vão de encontro a teoria de inúmeros pesquisadores acerca da necessidade nutricional desses microrganismos e que podem utilizar de seu largo espectro nutricional e metabólico seja de micro ou macronutrientes para colonizar diversos ambientes (ALLSOPP et al., 2004; CANEVA et al., 2008; STERFLINGER, 2010; CALLOL, 2013; GOMOIU et al., 2018; MAZZOLLI et al., 2018).

Para facilitar a visualização e interpretação dos dados obtidos nesse ensaio foi confeccionado um mapa com valores de concentração inibitória mínima de compostos puros (da obra) frente aos isolados fúngicos (da obra) conforme FIGURA 24 e ainda sumarizados os dados da TABELA 15. No mapa é possível observar que o Captan (Sigma-Aldrich) variou inibindo os 13 isolados de 0,5 a 0,0039 mM (representadas pelo círculo amarelo ocre de tamanho pequenino). E a Nistatina (Bristol Myers Squibb) inibiu a *Rhodotorula mucilaginosa* a 0.0312 mM (dentro da faixa reportada na literatura (de 0,5 a 0,0039 mM). Somente a espécie *Mytilinidion decipiens* não foi inibida pela droga controle (Captan).

É possível observar que o composto V6 (dióxido de zinco, ZnO<sub>2</sub>) (Merck) inibiu o crescimento de *Rhodotorula mucilaginosa* e *Arthrimum rasikravindrae* na dose >2,0 mM

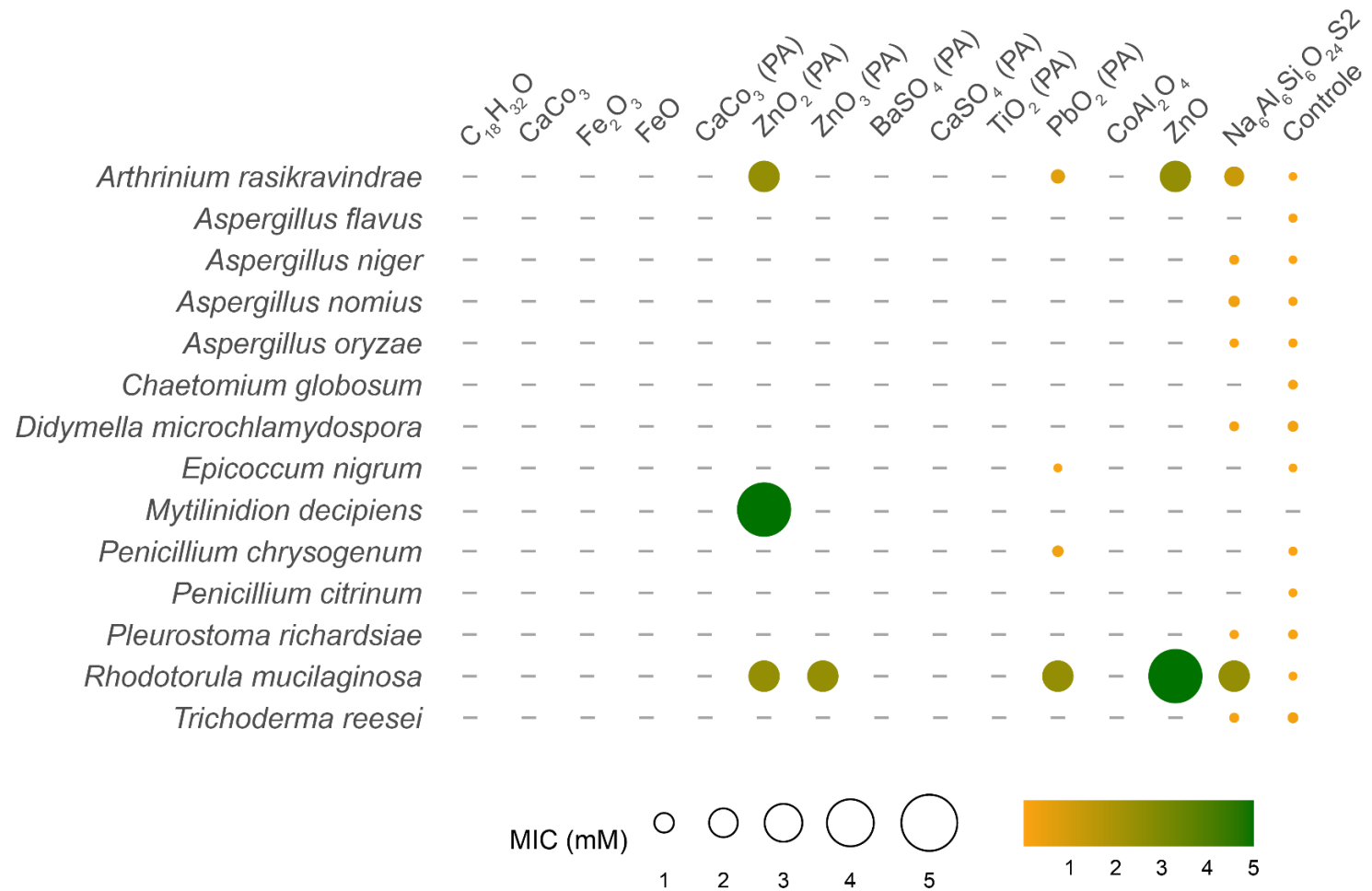
(representada pelo círculo amarelo ocre de tamanho médio) e inibiu o *Mytilinidion decipiens* em concentração de 5 mM (representada pelo círculo verde de tamanho grande).

O V11 (dióxido de chumbo, PbO<sub>2</sub>) (Merck) inibiu o crescimento fúngico das espécies: *Arthrinium rasikravindrae*, *Epicoccum nigrum* e o *Penicillium crysogenum* a concentração <1mM (representadas pelo círculo amarelo ocre pequenino) e inibiu a *Rhodotorula mucilaginosa* a dose >2,5 mM (representada pelo círculo amarelo ocre de tamanho médio).

Já o composto V13 (óxido de zinco, ZnO) (Kremer) inibiu o crescimento da espécie *Arthrinium rasikravindrae* a concentração >2,0 mM (representada pelo círculo amarelo ocre de tamanho médio) e a *Rhodotorula mucilaginosa* a concentração de 5 mM (representada pelo círculo verde de tamanho grande).

O composto V14 (azul ultramar, Na<sub>6</sub>Al<sub>6</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>24</sub>S<sub>2</sub>) (Kremer) inibiu o crescimento das espécies *Aspergillus niger*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *Didymella microchlamydospora*, *Pleurostoma richardsiae* e *Trichoderma reesei* na concentração < 1mM ((representadas pelo círculo amarelo ocre de tamanho pequenino), ainda a *Rhodotorula mucilaginosa* na concentração > 2,5mM (representada pelo círculo amarelo ocre de tamanho médio). A espécie *Arthrinium rasikravindrae* foi inibida na concentração > 1,25 mM (representada pelo círculo ocre tamanho pequeno).

Figura 24: Mapa representativo com resultados de concentração inibitória mínima de compostos puros (da obra) frente aos isolados fúngicos (da obra)



Fonte: elaborado pela autora a partir dos resultados do ensaio de CIM

Tabela 15: Concentração inibitória mínima dos isolados coletados na pintura de Portinari frente aos componentes principais puros encontrados em exames físico químicos da obra

Código do isolado	Identificação molecular (rDNA-ITS) do fungo	MIC (mM)														Drogas Controle*
		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V1	V11	V12	V13	V14	
AM6	<i>Didymella microchlamydospora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,156 2	0,25 Captan
AM8	<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0312 Captan
AM11	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,156 2	0,0039 Captan
AM13CM	<i>Epicoccum nigrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,039	-	-	-	0,0156 Captan
AM13CV	<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3125	-	-	-	0,0625 Captan
AM11A (levedura)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	2,5	2,5	-	-	-	2,5	-	5	2,5	0.0312 Nistatina
AM14CB	<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,078 1	0,0625 Captan
AM14CV	<i>Aspergillus nomius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,312 5	0,0625 Captan
AM16CR	<i>Arthrinium rasikravindrae</i>	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	0,625	-	2,5	1,25	0,0039 Captan
AM18A	<i>Trichoderma reesei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,156 2	0,25 Captan
AM19LR	<i>Mytilinidion decipiens</i>	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AM24CV	<i>Pleurostoma richardsiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,078 1	0,125 Captan
AM24CB	<i>Chaetomium globosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,125 Captan
AM25CV	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0625 Captan

\*CIM (100%) – ‘endpoint’ considerando 100% da redução do crescimento fúngico (CLSI, 2008) Concentrações testadas: Captan e Nistatina 0,5 e 0,00390625mM, V1 óleo concentração 0,0039 a 0,5 mg/ml e V2 aV14 concentração de testada 0,039 a 5 mM. V1= óleo de linhaça (C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O) (Winsor & Newton), V2 = carbonato de cálcio impuro (CaCO<sub>3</sub>) (Armazém das Artes), V3 = dióxido de Ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>),V4= óxido de Ferro (FeO) (Morgan Pigmentos), V5= carbonato de cálcio puro (CaCO<sub>3</sub>) (Synth), V6 = dióxido de zinco (Zn O<sub>2</sub>) (Merck), V7= trióxido de zinco (ZnO<sub>3</sub>) (Baker), V8= sulfato e bário (BaSO<sub>4</sub>) (Synth), V9= sulfato de cálcio (CaSO<sub>4</sub>) (Vetec), V10= dióxido de titânio(TiO<sub>2</sub>)(Vetec), V11= dióxido de chumbo (PbO<sub>2</sub>) (Merck), V12 = azul de cobalto (Co Al<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (ICROM), V13= óxido de zinco (ZnO) (Kremer), V14=azulultramar(Na<sub>6</sub>Al<sub>6</sub>Si<sub>6</sub>O<sub>24</sub>S<sub>2</sub>),(Kremer).Controles: Captan (Sigma-Aldrich) e Nistatina (Bristol Myers Squibb) Fonte:elaborado a partir dos resultados do ensaio de CIM

6.10 Ensaio de irradiação gama cobalto 60 aplicada aos isolados fúngicos  
6.10.1 Ensaio de irradiação gama cobalto 60 aplicada a solução de esporos dos isolados

A radiação gama cobalto-60 empregada na irradiação da solução dos esporos na dosagem de 1kGy foi avaliada com 7 dias de crescimento/ 21 dias após irradiação. As espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus oryzae*, *Arthrimum rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae* e a levedura controle *Candida albicans* ATCC 18804 não cresceram nessa dosagem e nem período citado. Já as espécies *Chaetomium globosum*, *Epicoccum nigrum*, *Mytilinidion decipiens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e os fungos controles *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613 *Aspergillus flavus* CCT4952 e *Cryptococcus neoformans* UFMG H99 cresceram na dosagem de 1kGy nos dias 7 dias de crescimento e 21 após irradiação. E o grupo controle que não foi submetido a irradiação cresceu normalmente. O controle de esterilidade seguiu também em conformidade, ou seja, ausência do crescimento fúngico. Os dados obtidos estão sumarizados na TABELA 16.

Na dosagem de 3kGy nos dias 7 de crescimento/ 21 após irradiação, as espécies *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *Arthrimum rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae*, *Trichoderma reesei* e as leveduras controle *Candida albicans* ATCC 18804, *Cryptococcus neoformans* UFMG H99 e os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613 e *Aspergillus flavus* CCT4952 controle também não cresceram. Já as espécies *Chaetomium globosum*, *Mytilinidion decipiens* e *Rhodotorula mucilaginosa* continuaram crescendo. O grupo controle não submetido à irradiação cresceu normalmente. E o controle de esterilidade seguiu em conformidade com o protocolo.

Já na dosagem de 5kGy com 7 dias de crescimento do inóculo/ 21 dias após irradiação, nenhum dos 14 isolados fúngicos cresceu, nenhuma das leveduras e fungos filamentosos controles positivos cresceram. E o grupo controle que não foi irradiado cresceu conforme o esperado e grupo controle de esterilidade do meio estava em conformidade.

A dose de 1kGy foi reavaliada e mensurada novamente com 14 dias de crescimento/ 28 dias após irradiação e as espécies *Aspergillus nomius*, *Aspergillus oryzae*, *Arthrimum rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae* e *Trichoderma reesei* e a levedura controle *Candida albicans* ATCC 18804 não cresceram nessa dosagem e nem no período citado. Já as espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* (que não haviam crescido com 7 dias de inóculo e 21 dias

após irradiação) junto com as demais *Chaetomium globosum*, *Epicoccum nigrum*, *Mytilinidion decipiens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e os fungos controles *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613, *Aspergillus flavus* CCT4952 e a levedura *Cryptococcus neoformans* H99 UFMG apresentaram crescimento.

Desmouts e colaboradores (2001), relatam que a espécie *Aspergillus flavus* (solução de esporos  $10^6$  esporos /mL), é inibida à dose de 1,7 kGy de irradiação, já, Maity e colaboradores (2011) informam que *A. flavus*, isolado de sementes de arroz e preparados com solução  $10^6$  esporos /mL requerem para inibição de crescimento a dosagem de 2,5 kGy. Logo a dosagem de 1kGy aplicada ao *A. flavus* isolado, e, ao *A. flavus* CCT4952 tinha grandes chances de não inibir o crescimento desses, tal situação de fato ocorreu no experimento. Os fungos *A. niger*, *Epicoccum nigrum* em solução de esporos aquosa, na concentração  $10^6$  esporos /mL, segundo a pesquisa de Tomazello (1994), é inibido a partir de 1 kGy até 2 kGy, sendo que o gênero *Trichoderma* sp. é inibido a dose de 1 kGy. Então, o experimento no trabalho acima citado é corroborado por dados dessa pesquisa. Ainda, segundo Malo e demais pesquisadores (2018), a espécie *Cryptococcus neoformans* H99 é inibida a dosagem de 0,750 kGy, no entanto, observamos no presente trabalho que a dosagem exigida pela espécie foi maior que a relatada por esses pesquisadores e o grupo controle do inóculo que não foi submetido à irradiação cresceu normalmente. E o controle de esterilidade seguiu em conformidade.

Na dosagem de 3kGy com 14 dias de crescimento/ 28 dias após irradiação, as espécies *Aspergillus nomius*, *A. oryzae*, *Arthrinium rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae* e *Trichoderma reesei* e as leveduras controle *Candida albicans* ATCC 18804, *Cryptococcus neoformans* UFMG H99, os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613 e *Aspergillus flavus* CCT4952 controles também não cresceram. Conforme descreve Frazier (1993) os gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. de modo geral são inibidos a partir da dose de 1,3 kGy até 3kGy, e, a presente pesquisa corrobora com os relatos desse pesquisador. Já as espécies *Chaetomium globosum*, *Mytilinidion decipiens* e *Rhodotorula mucilaginosa* continuaram crescendo. Nesse mesmo período avaliado de 14 dias de crescimento/ 28 dias após irradiação as espécies *Aspergillus flavus* e *A. niger* que não haviam crescido (com 7 dias de inóculo e 21 dias após irradiação) cresceram bastante. Segundo Castelvechi e colaboradores (2007) e Dadachova e colaboradores (2007), alguns fungos melanizados como *A. niger* ao serem submetidos a irradiação podem sofrer alterações nas propriedades eletrônicas da melanina, transformando esse pigmento em transdutor de energia, fator que favorece o crescimento e

sobrevivência dessas espécies. O grupo controle não submetido à irradiação cresceu normalmente. E o controle de esterilidade seguiu em conformidade com o protocolo.

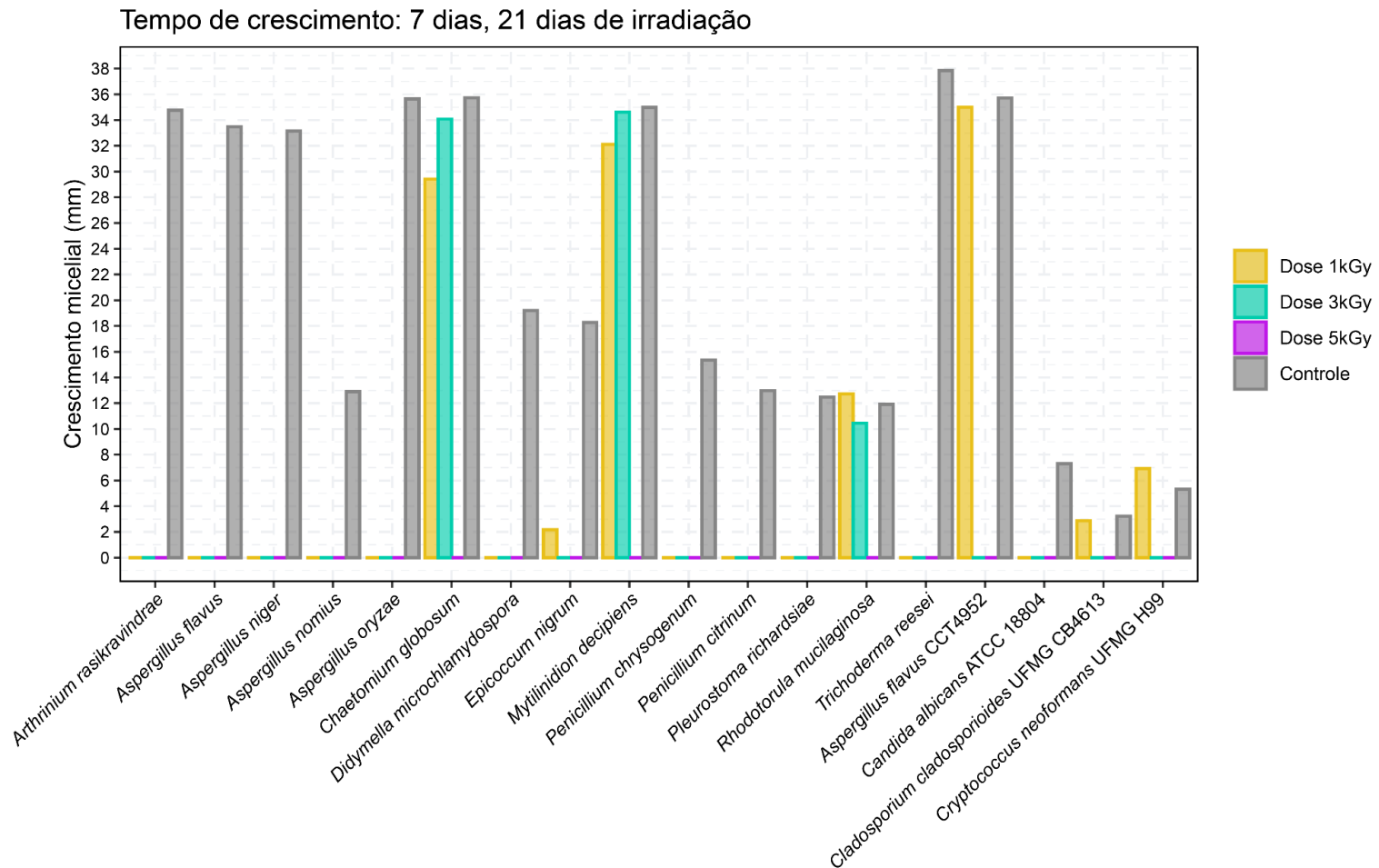
Na dosagem de 5kGy com 14 dias de crescimento do inóculo/ 28 dias após irradiação 13 isolados fúngicos não cresceram, somente o *Aspergillus niger* cresceu e nenhuma das leveduras e fungos filamentosos controles positivos cresceram. Segundo Bonetti e colaboradores (1979) a dosagem de 5 kGy de irradiação inviabiliza o crescimento de esporos fúngicos das espécies *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicilium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Chaetomium globosum*, esses dados relatados anteriormente por esses pesquisadores vão de encontro aos dados da presente pesquisa. Saleh e pesquisadores (1996), reportaram que dosagens de 4 kGy a 6 kGy inibem completamente fungos em diversos alimentos. Adicionalmente, (MUNIR & FEDERIGHI, 2020) reportaram radiosensibilidade dos gêneros os gêneros *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* nas dosagens 0,2 kGy a 5kGy de irradiação e os experimentos do presente trabalho corroboram com a constatação desses pesquisadores. Recentemente, duas pesquisas, realizadas em corpos de prova, trazem informações importantes para a discussão. A primeira pesquisa realizada com descontaminação fúngica de solução de esporos em corpos de prova em tecido de algodão por irradiação gama cobalto-60. E a segunda, em corpos de prova similares a pintura óleo sobre tela, com dois fungos de coleções de referência, primeiro foi inoculado o *Aspergillus niger* CBS 104.57, em seguida o *Penicillium chrysogenum* ATCC 12690, na concentração de  $10^3$  esporos /mL. Em ambas, os pesquisadores verificaram que esses corpos de prova inoculados e irradiados foram totalmente descontaminados à dosagem de 5kGy, ambas corroboram com os dados encontrados no presente trabalho de doutorado (VUJCIC et al., 2019; SHEIKH et al., 2021). Tomazello (1994) em seu trabalho cujo foco foi descontaminação de isolados fúngicos, encontrados em documentos históricos, constatou que *Cladosporium cladosporioides*, em solução de esporos aquosa na concentração de  $10^5$  esporos /mL, requer dosagem a partir de 1 kGy para sensibilizar/reduzir o crescimento desses esporos após irradiação e reinoculação em meio de cultura, no entanto, para a inibição do crescimento dessa espécie nessa concentração, requer-se dosagem mais alta a partir de 5,5 kGy a 6 kGy. No entanto, o *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613 foi inibido com a dosagem de 5 kGy, resultado que difere da referência usada, porém como esse é um fungo melanizado, essa camada pigmentada de melanina pode atuar impedindo a penetração da radiação ionizante (CASTELVECCHI, 2007; CASADEVALL et al., 2017). E algumas cepas, como a empregada por Tomazello em seus ensaios, podem possuir essa barreira protetiva, tornando a espécie, de certo modo, radioresistente. Além disso o grupo

controle, que não foi submetido à irradiação cresceu como esperado e grupo controle de esterilidade do meio estava em conformidade.

Para facilitar a visualização e interpretação dos dados obtidos nesse ensaio foi confeccionado um gráfico *bar plot* com crescimento solução de esporos 7 dias crescimento e 21 dias irradiação conforme FIGURA 25. Por esse 1º gráfico plotado é possível observar que todos os fungos controle positivo cresceram normalmente (representados em cinza escuro). E que a dosagem de 1kGy, (representada em amarelo ocre), inibiu o crescimento de dez fungos testados tais como: *Aspergillus nomius*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Arthrinium rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae* e *Trichoderma reesei* e a levedura controle *Candida albicans* ATCC 18804. E essa mesma dosagem não inibiu o crescimento de sete fungos são eles: *Chaetomium globosum*, *Epicoccum nigrum*, *Mytilinidion decipiens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e os fungos controles *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613, *Aspergillus flavus* CCT4952 e *Cryptococcus neoformans* UFMG H99. Já a dosagem de 3kGy, (representada em verde claro), as espécies *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *Arthrinium rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae*, *Trichoderma reesei* e as leveduras controle *Candida albicans* ATCC 18804, *Cryptococcus neoformans* UFMG H99 e os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613, *Aspergillus flavus* CCT4952 controle também não cresceram. Já as espécies *Chaetomium globosum*, *Mytilinidion decipiens* e *Rhodotorula mucilaginosa* continuaram crescendo nessa dosagem. A dosagem de 5kGy (destacada em cor roxa), nenhum dos fungos testados cresceu e nem mesmo os quatro fungos controles.

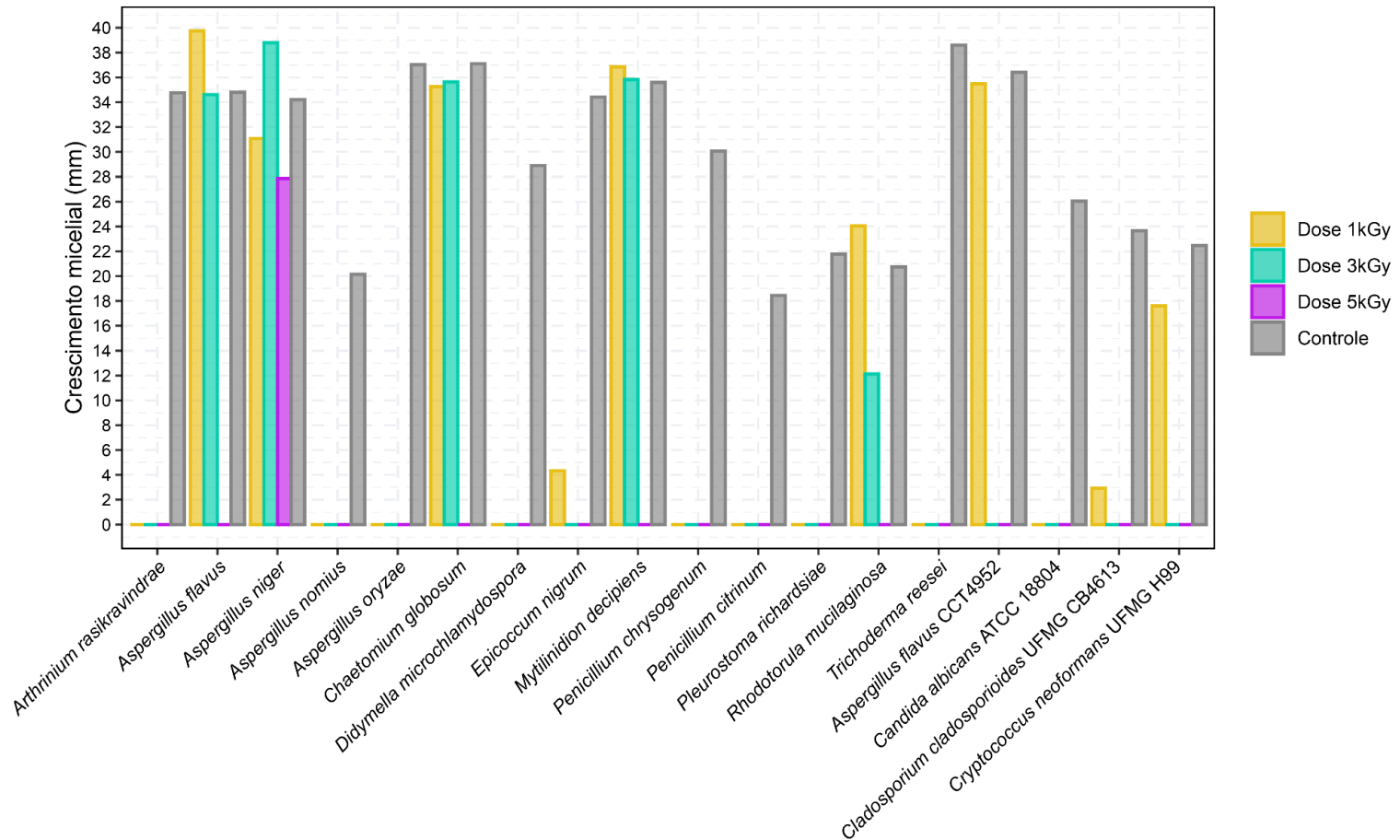
O 2º gráfico plotado refere-se à solução de esporos (recuperada) com 14 dias de crescimento/ 28 dias após irradiação, FIGURA 26, é possível observar que todos os fungos controle positivo cresceram normalmente (representados em cinza escuro). E que a dosagem de 1kGy, (representada em amarelo ocre), as espécies *Aspergillus nomius*, *A. oryzae*, *Arthrinium rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae* e *Trichoderma reesei* e a levedura controle *Candida albicans* ATCC 18804 não cresceram nessa dosagem e nem no período citado. Já as espécies *Aspergillus flavus*, *A. niger* (que não haviam crescido a 1kGy/ 7 dias de inóculo e 21 dias após irradiação) junto com as demais *Chaetomium globosum*, *Epicoccum nigrum*, *Mytilinidion decipiens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e os fungos controles *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613, *Aspergillus flavus* CCT4952 e a levedura *Cryptococcus neoformans* H99 UFMG

apresentaram crescimento. Na dosagem de 3kGy, (representada em verde claro), com 14 dias de crescimento/ 28 dias após irradiação, as espécies *Aspergillus nomius*, *A. oryzae*, *Arthrinium rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae* e *Trichoderma reesei* e as leveduras controle *Candida albicans* ATCC 18804, *Cryptococcus neoformans* UFMG H99, os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613 e *Aspergillus flavus* CCT4952 controles também não cresceram. Já as espécies *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Chaetomium globosum* *Mytilinidion decipiens*, *Rhodotorula mucilaginosa* a dose de 3kGy apresentaram crescimento acentuado. E, na dose de 5kGy (em cor roxa), nenhum fungo testado cresceu, exceto o *A.niger* que apresentou crescimento considerável e significativo. Diante desse resultado é possível levantar uma hipótese relativa a essa espécie *A.niger*, (isolada da pintura “Frevo” de Portinari), que os esporos produzidos por essa espécie apresentaram resistência à radiação gama Co-60 nas três dosagens testadas.

Figura 25: gráfico *bar plot* crescimento solução de esporos 7 dias crescimento e 21 dias irradiação

Fonte: elaborado pela autora a partir dos resultados do ensaio de irradiação da solução de esporos

Figura 26: gráfico *bar plot* crescimento solução de esporos 14 dias crescimento e 28 dias irradiação  
 Tempo de crescimento: 14 dias, 28 dias de irradiação



Fonte: elaborado pela autora a partir dos resultados do ensaio de irradiação da solução de esporos

#### 6.10.2 Ensaio de irradiação gama cobalto 60 aplicada ao micélio dos isolados fúngicos

A radiação gama cobalto-60 foi empregada na irradiação das placas contendo micélios, sendo realizadas com os micélios crescidos há 5 dias (considerados adultos) e todos os isolados foram mensurados antes do procedimento de irradiação conforme TABELA 17.

As medidas foram repetidas após 10 dias de crescimento e após 5 dias de irradiação nas dosagens 1kGy, 3 kGy e 5 kGy. Todos os isolados irradiados em todas as dosagens apresentaram crescimento *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *Arthrimum rasikravindrae*, *Didymella microchlamydospora*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum*, *Pleurostoma richardsiae* e *Trichoderma reesei*. Todas as espécies do grupo controle positivo, as leveduras controles *Candida albicans* ATCC 18804, *Cryptococcus neoformans* UFMG, e os fungos filamentosos controle *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613 e *Aspergillus flavus* CCT4952 apresentaram crescimento. Conforme é possível constatar na FIGURA 27. O grupo de microrganismos controle não submetido à irradiação cresceu normalmente. E o controle de esterilidade seguiu em conformidade com o protocolo. Provavelmente, esse crescimento dos 14 fungos ocorreu nesse momento do procedimento, pois o experimento de irradiação ocorreu 5 dias após inóculo inicial, momento inicial em que as hifas encontravam em crescimento livre, (inóculo foi realizado com *plug* de micélio padronizado). O micélio com 5 dias de tempo de crescimento já apresentava um crescimento considerável (apresentando um emaranhado de hifas visível), que propiciou um acúmulo de biomassa de células microbianas, dificultando a penetração e consequente ação dos raios da irradiação gama cobalto 60 nas células fúngicas. Fato que corroborou para a continuidade do processo de crescimento dos micélios fúngicos mesmo após a irradiação em dose mais elevada 5 kGy.

Logo após a releitura, e a reavaliação das placas contendo micélios irradiados, essas foram repicadas novamente a partir do micélio irradiado, para averiguar a viabilidade dessas células microbianas e avaliação do crescimento dessas após irradiação. Diante do procedimento realizou-se a leitura com 7 dias de crescimento e 12 dias de irradiado, e em seguida novamente com 21 de crescimento/28 dias após irradiação e observou-se que as espécies *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Arthrimum rasikravindrae*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium citrinum*, *P. crysogenum* e *Pleurostoma richardsiae* não apresentaram crescimento nas dosagens de 3kGy e 5 kGy como é possível constatar nas TABELAS 19 e 20. As demais espécies *Aspergillus flavus*, *A. nomius*, *Chaetomium globosum*, *Didymella microchlamydospora*, *Mytilinidion decipiens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichoderma reesei* apresentaram o crescimento que foi reduzindo à medida

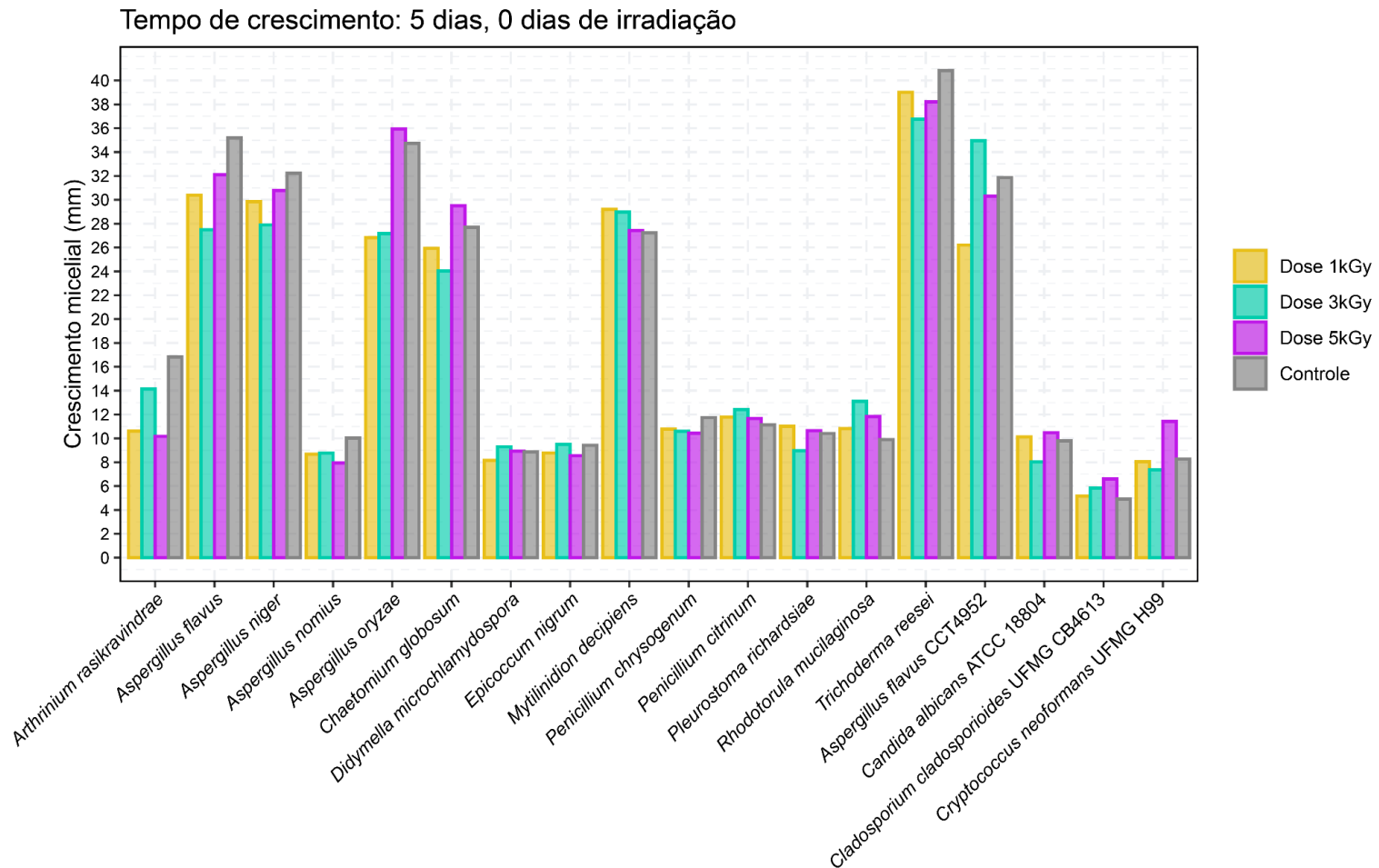
que a dose de irradiação gama aplicada aumentava, e as espécies do grupo controle positivo, as espécies *Candida albicans* ATCC 18804, *Cryptococcus neoformans* UFMG, os fungos filamentosos controle *Cladosporium cladosporioides* UFMG CB4613 e *Aspergillus flavus* CCT4952 também cresceram de modo reduzido. Tomazello (1994) relatou em seus experimentos com micélios fúngicos irradiados que *Cladosporium cladosporioides* e *Aspergillus flavus* foram inibidos à dosagem de 6 kGy. E Grillo (2016) relata que *Candida albicans* ATCC 6458645 foi inibida também à dose 6kGy. O grupo de fungos controle não submetido à irradiação cresceu normalmente. E no controle de esterilidade ocorreu conforme protocolo.

O crescimento reduzido dos micélios dos 14 fungos, ocorreram em relação direta com aumento da dosagem de irradiação empregada, possivelmente devido a metodologia desse experimento conduzido com leves alterações, inclusive o grupo controle de irradiação também apresentou o mesmo comportamento. Por exemplo, no repique a partir do *plug* de fungos crescidos e irradiados (foi realizado com palito estéril), por essa metodologia não foi possível padronizar a quantidade de esporos carregados pelo palito, ou seja, não foi possível padronizar o inóculo. Esse fato ocorrido não demonstrou uma tendência de comportamento do crescimento dos micélios fúngicos. Como os micélios irradiados apresentaram crescimento logo após o procedimento de irradiação, essa situação que demonstrou a viabilidade de algumas porções dessas células microbianas irradiadas, era esperado que o reinóculo dessas ainda apresentassem crescimento (pois esse micélio possui uma quantidade de biomassa fúngica acumulada no meio de cultura que é refratária a irradiação).

Para agilizar a interpretação dos dados alcançados nesse ensaio foi confeccionado um gráfico *bar plot* com crescimento de micélios de todas as espécies selecionadas com 5 dias crescimento e 0 dias irradiação conforme FIGURA 27. Esse 1º gráfico demonstra como os micélios que todas as placas contendo micélios a serem submetidos à irradiação gama Co-60 estavam com esses ativos em crescimento (como é possível observar pelas placas separadas para 1 kGy (na cor amarelo ocre), 3kGy (em verde claro), 5 kGy (cor roxa) e os controles de crescimento (em cinza escuro). Já o 2º gráfico, FIGURA 28, refere-se ainda aos micélios crescidos, separados anteriormente, porém submetidos à irradiação nas dosagens 1kGy, 3 kGy e 5 kGy, que foram mensurados com 10 dias de crescimento e 5 dias após de irradiação. É possível notar que nas três dosagens (1kGy, 3 kGy e 5 kGy) os micélios continuaram crescendo a uma velocidade grande pois (só tinham 5 dias de diferença entre a primeira e a segunda mensuração) principalmente os micélios submetidos a 1kGy, (representados na cor amarelo

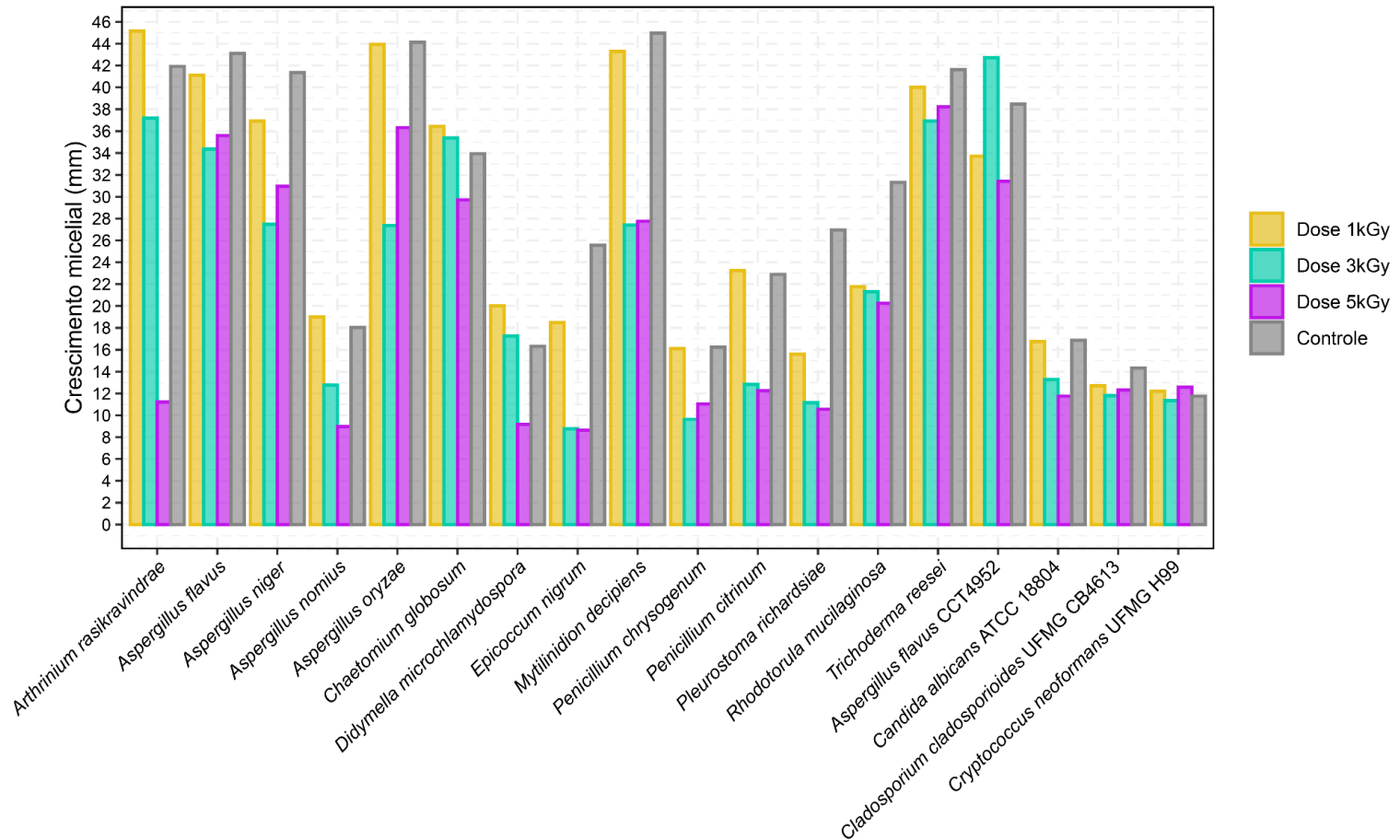
ocre), demonstrando que essa dose não é suficiente para inibir o crescimento fúngico das espécies testadas na forma de micélios, e o grupo micélios controles de crescimento (não irradiado) (na cor cinza escuro) cresceram normalmente. E as outras duas doses de 3kGy, (representado na cor verde clara), e 5 kGy (na cor roxa), são capazes de sensibilizar e reduzir um pouco o crescimento fúngico em micélio perceptível (comparando-se o gráfico 1 e o gráfico 2). O 3º gráfico relativo aos micélios irradiados reinoculados com 7 dias de crescimento e 12 dias de irradiação. É possível perceber que nas três dosagens (1kGy, 3 kGy e 5 kGy) FIGURA 29 e FIGURA 30 os micélios continuaram crescendo a uma velocidade acentuada pois (só tinham 7 dias de crescimento gráfico 3, porém no gráfico 4, haviam 21 dias de crescimento). Principalmente os micélios submetidos a 1kGy, (representados na cor amarelo ocre), demonstrando que essa dose não é suficiente para inibir o crescimento fúngico das espécies testadas na forma de micélios (mesmo reinoculados), e os micélios grupo controle de crescimento (não irradiado), (representados na cor cinza escuro), cresceram normalmente. E as doses de 3kGy, (representado na cor verde clara), e 5 kGy, (na cor roxa), são capazes de sensibilizar o crescimento fúngico em micélio perceptível (comparando-se o gráfico 3 e o gráfico 4), porém essas não capazes de inibir o crescimento desses microrganismos em micélios. Talvez essas doses ajudem no crescimento modulado (porém não completamente inibido). É importante ressaltar que algumas cepas de fungos possuem a capacidade metabólica de produzir melanina, (um biopolímero tipo um corante), que se acumula no micélio fúngico e protege esse microrganismo contra radiação UV e radiação ionizante (DADASHOVA et al., 2007). E alguns desses autores associam a radiorresistência ao processo de melanização das células microbianas, demonstram ainda, que algumas espécies de fungos podem ser radiotróficas, ou seja, podem usar a melanina produzida para converter radiação gama e beta em energia química para crescimento (POINTING et al., 1996; DADASHOVA et al., 2007 e 2008).

Figura 27: gráfico *bar plot* micélios mensurados com 5 dias de crescimento antes da irradiação



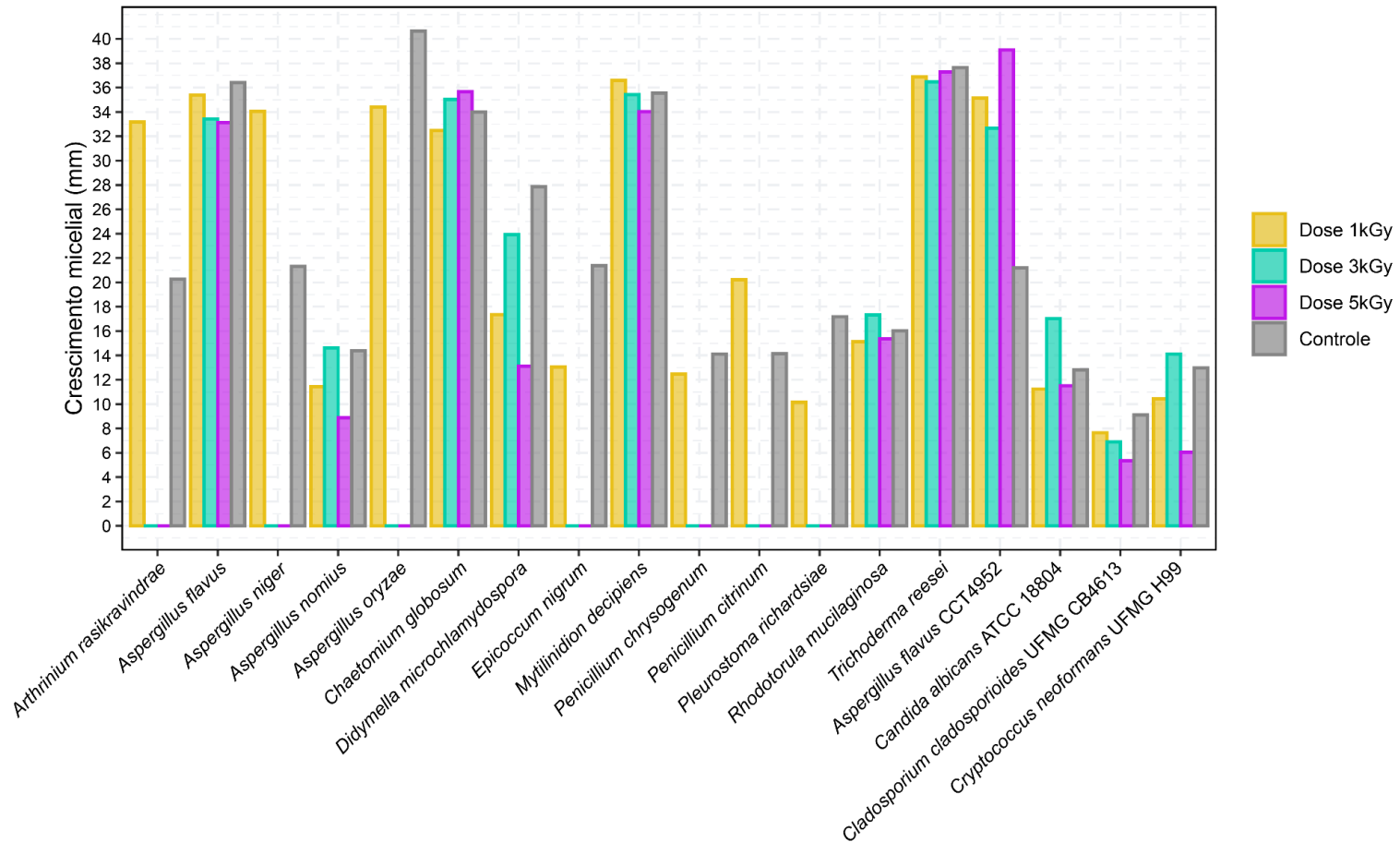
Fonte: elaborado pela a partir dos resultados do ensaio de irradiação dos micélios

Figura 28: gráfico bar plot micélios mensurados com 10 dias de crescimento e 5 dias de irradiação  
 Tempo de crescimento: 10 dias, 5 dias de irradiação



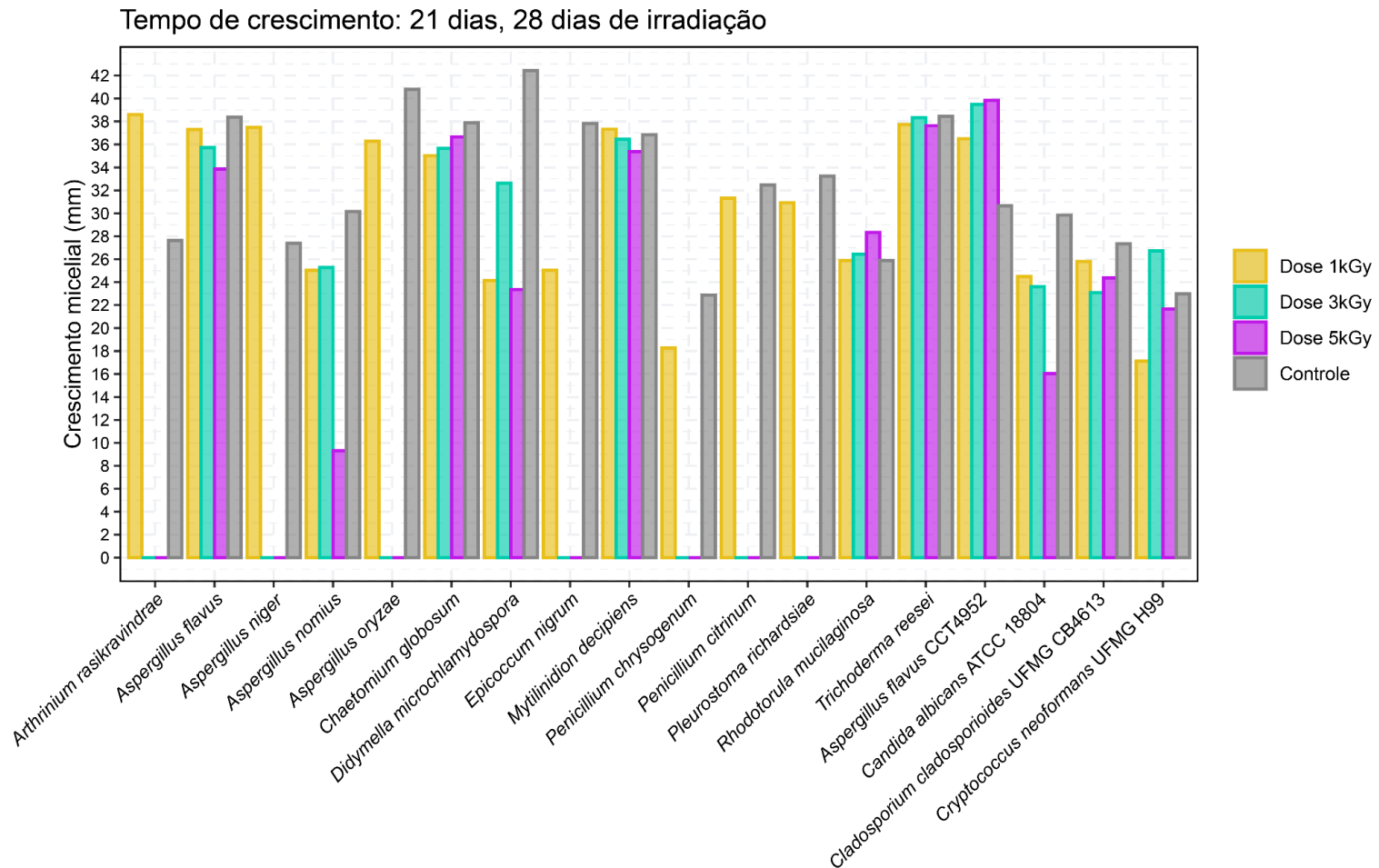
Fonte: elaborado pela autora a partir dos resultados do ensaio de irradiação dos micélios

Figura 29: gráfico *bar plot* micélios irradiados reinoculados com 7 dias de crescimento e 12 dias de irradiação  
 Tempo de crescimento: 7 dias, 12 dias de irradiação



Fonte: elaborado pela autora a partir dos resultados do ensaio de irradiação dos micélios

Figura 30: gráfico bar plot micélios irradiados reinoculados com 21 dias de crescimento e 28 dias de irradiação



Fonte: elaborado pela autora a partir dos resultados do ensaio de irradiação dos micélios

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A análise da estratigrafia pictórica foi essencial para conhecer a morfologia das camadas da pintura e para a confirmação da hipótese de que a obra possui uma parte inacabada e outra acabada (pois a obra foi encomendada em 1961, e Portinari faleceu 1962, antes de terminá-la), sendo essa pintura a última elaborada pelo artista,
- A caracterização físico-química da pintura por espectroscopia no IV, Raman e por MEV foram fundamentais para o conhecimento do substrato ao qual os fungos estão associados e para proposição de faixas de dosagens de irradiação gama cobalto 60 que descontaminem a obra, porém que causem o mínimo de danos aos componentes da obra,
- As análises químicas empregadas (estratigrafia, IV, Raman e MEV) forneceram dados que se complementam físico-quimicamente no nível de diagnóstico de materiais empregados na execução da obra estudada. Elas auxiliam também na confirmação das hipóteses científicas como emprego do aglutinante (óleo de linhaça), de pigmentos compostos por metais pesados (Cd, Co, Pb e Ti) usados tanto na base de preparação, quanto nas camadas pictóricas. Os pigmentos (Cd, Co, Pb) foram reportados na historiografia da arte moderna brasileira no que tange os materiais e técnicas empregados e também há registros em compêndios médicos como possível causa de intoxicação do artista por uso de tintas contendo esses elementos químicos tóxicos aos humanos,
- A identificação do aglutinante e dos pigmentos são achados que subsidiam um direcionamento das dosagens permissíveis de radiação gama Cobalto-60 que promovam a desinfecção sem ocasionar danos nos pigmentos inorgânicos (metálicos) e orgânicos,
- A identificação de 14 isolados fúngicos e a identificação dos componentes químicos constantes na superfície pictórica da obra demonstram a complexidade de materiais componentes do substrato da obra “Frevo”, e, corroboram ainda para a hipótese preliminar, que era de se encontrar fungos mais associados às pinturas à óleo e ao suporte em madeira conforme comparação de gêneros e/ou espécies de fungos reportados em pinturas sob substratos similares na literatura,
- O conhecimento dos isolados fúngicos favoreceu ainda a seleção de dosagens de irradiação gama Cobalto 60 a serem empregadas com a finalidade de desinfecção da obra original embasada na literatura correlata,

- A triagem enzimática permitiu conhecer um pouco sobre o perfil de produção de enzimas pelo isolados fúngicos testados frente aos meios avaliados,
- Os ensaios de concentração inibitória mínima fundamentado nos pigmentos encontrados na pintura de Portinari a partir dos exames físico-químicos frente aos isolados identificados possibilitou o entendimento que o substrato pode fornecer nutrientes para os fungos,
- Os experimentos em que os fungos foram submetidos à irradiação gama cobalto 60 frente aos isolados foram importantes para entender quais fungos são sensíveis as dosagens empregadas nessa pesquisa de irradiação gama.

## 8 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados apresentados nos experimentos de irradiação, pretende-se expandir os testes de irradiação gama Cobalto 60 para os 6 microfragmentos (5, 10 e 12) e (6, 13 e 14) da obra analisados anteriormente aos exames físico-químicos ao IV, Raman e MEV, realizando testes nas mesmas dosagens em que os microrganismos cultiváveis foram submetidos (1kGy, 3 kGy e 5 kGy). Haverá o controle negativo da irradiação para cada dosagem empregada para fragmento e será avaliada a variação no padrão de cor dos fragmentos antes e após a irradiação (para a avaliação será empregado um espectrofotômetro/colorímetro ou metodologia de gerenciamento de padrão de cor por microscopia).

Os ensaios de triagem enzimática dos isolados fúngicos demonstram o potencial biotecnológico desses microrganismos e os resultados desses testes mostram que ensaios futuros de biodegradação são interessantes para aplicação biotecnológica no tratamento de resíduos da indústria têxtil por exemplo com ensaios empregando esses isolados fúngicos na degradação de corantes têxteis.

Pretende-se ainda que os 14 isolados fúngicos cultiváveis identificados nesse trabalho sejam cultivados em meio líquido e submetidos a extração de compostos voláteis orgânicos em sistema fechado para captura desses voláteis e identificação desses por análise em Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Por fim, as 14 amostras microbiológicas que foram coletadas em swabs nas mesmas regiões em que foram coletados os microfragmentos da pintura serão submetidas às análises metagenômicas. Essas amostras estão armazenadas em freezer -80°C e serão submetidas a

extração, amplificação (região ITS) e sequenciamento de amplicons e serão feitas análises metagenômicas para identificação e abundância relativa dos fungos não-cultiváveis presentes na pintura “Frevo”.

## BIBLIOGRAFIA

ADAMO, M., BRIZZI, M., MAGAUDDA, G., MARTINELLI, G., PLOSSI-ZAPPALÀ, M., ROCCHETTI, F., & SAVAGNONE, F. Gamma radiation of paper in different environmental conditions: chemical, physical and microbiological analysis. **Restaur. - Int. J. Preserv. Libr. Arch. Mater.**, 22(2), 107–131. DOI: 10.1515/ REST.107, 2001.

ADAMO, M., MAGAUDDA, G., TRIONFETTI NISINI, P & TRONELLI, G. (2003). Susceptibility of cellulose to attack of cellulolytic microfungi after g-rays irradiation and ageing. **Restaur. - Int. J. Preserv. Libr. Arch. Mater rest.**, 24(3), 145–151. REST, 2003.

ADAMO, M., BACCARO, S., e CEMMI, A. Radiation processing for bio-deteriorated archived materials and for consolidation of porous artefacts. Rome: **ENEA**. (Report RT/2015/5/ENEA). 2015.

AGRAWAL, O.P.; DHAWAN, S.; GARG, K.L.; SHAHEEN, F.; PATHAK, N.; MISRA, A. Study of biodeterioration of the Ajanta wall paintings. **Int. Biodeterior.**, 24, 121–129. 1988.

ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland – Scots pine (*Pinus Sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 1121-1132. 2003.

ALEXOPOULOS, C. J. (Constantine John); MINS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. 4th. ed. **New York, USA**: John Wiley & Sons, x, 869 p. 1996.

ALLSOPP, D.; SEAL, K.; GAYLARD, C., Introduction to Biodeterioration, 2.<sup>a</sup> ed., **Cambridge University Press**, Cambridge, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A. A, ZHANG, Z, MILLER, W and LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs Oxford University Press **Nucleic Acids Research**, Vol. 25, No. 17. 1997.

ARVANITOYANNIS, I.S. Irradiation of Food Commodities: Techniques, Applications, Detection, Legislation, Safety and Consumer Opinion. 5ed. **Elsevier**. 707p. 2010.

AZIZ N.H., MOUSSA L. A. A. Reduction of fungal and mycotoxins formation in seeds by gamma radiation. PhD Th esis, Faculty of Science, Ain Shams **University, Egypt**. 2004.

AZIZ NH, EL-FAR FM, SHAHIN AAM, ROUSHY SM. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B 1 in seeds by gamma-irradiation. **Food Control** 18:1337 – 1342. 2007.

- AZIZ NH, EL-FOULY MZ, ABU-SHADY MR, MOUSSA IA. Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal fl orae contaminating medicinal plants. **Applied Radiation and Isotope** 48:71– 76. 1997.
- BACCARO, S., CEMMI, A., FERRARA, G., e FIORE, S. Calliope gamma irradiation facility at ENEA – Casaccia R.C. (Rome). Rome, Italy: **ENEA**. (RT/2015/13/ENEA). 2015.
- BALBI, Marilia. Portinari: o pintor do Brasil. 1. Ed. São Paulo: **Boitempo Editorial**, 174 p. 2003.
- BANK, T.L., KUKKADAPU, R.K., MADDEN, A.S., GINDER-VOGEL, M.A., BALDWIN, M.E, JARDINE, P.M. Effects of gamma-sterilization on the physico-chemical properties of natural sediments. **Chemical Geology** 251, 1-7. 2008.
- BARBOSA, LCA. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. **Viçosa: UFV**. 189 p. 2011.
- BASTIN, F, ALABOUVETTE, C. Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: The case of Lascaux Cave. **International Journal of Speleology**. Bologna. 55-60p. 2009.
- BASTIAN, F., JURADO, V., NOVAKOVA, A., ALABOUVETTE, C. & SAIZ-JIMENEZ, C. The microbiology of Lascaux Cave. **Microbiology** 156, 644–652 .2010.
- BATISTA, C. M. Memória e Identidade: Aspectos relevantes para o desenvolvimento do turismo cultural. **Caderno Virtual de Turismo**: 1677-6976 Vol. 5, N° 3. 2005.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 355–383, 2000.
- BECKER, T. W., KRUMBEIN, W. E., WARSCHEID, TH., RESENDE, M. A. Investigations into Microbiology. Bianchi, H.K., IDEAS (Investigations into devices against Environmental Attack on Stones. Final Report. **GKSS-Forschungszentrum, Geesthacht**, v.1, p.147-190, 1994.
- BERTRAND, L., SCHÖEDER, S., ANGLOS, D., BREEZE, M. B. H., JANSSENS, K., MOINI, M., & SIMON, A. Mitigation strategies for radiation damage in the analysis of ancient materials. **TRAC-Trends Anal. Chem.**, 66, 128–145. 2015.
- BOLLINGER, N., HASSETT, D. J., IGLEWSKI, B. H., COSTERTON, J. W. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. **J. Bacteriol**, v. 183, p. 1990-1996, 2001.
- BONETTI, M.; GALLO, F.; MAGAUDDA, D.; MARCONI, C; MONTANARI, M. Essais sur l'utilisation des rayons y pour la sterilisation des matériaux libraires. **Studies in Conservation**, London, 24:59-68, 1979.
- BONIEK D, BONADIO L, SANTOS DE ABREU C, DOS SANTOS AFB, DE RESENDE STOIANOFF, M.A.. Fungal bioprospecting and antifungal treatment on a deteriorated Brazilian contemporary painting. **Lett appl microbiol**. oct;67(4):337-342. 2018.

BUFFETEAU, T.; DESBAT, B.; EYQUEM, D. Attenuated total reflection Fourier transform infrared microspectroscopy: Theory and application to polymer samples. **Vibrational Spectroscopy**, v.11, p. 29-36, 1996.

BRACCO, G; HOLST, B. Surface Science Techniques. Berlim. **Springer**, 653p. 2013.  
BRASIL. Constituição (1988). Constituição da república federativa do Brasil. Brasília, DF: **Senado**, 1988.

BROCK, T. D., MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, **Englewood**, NJ. 2010.

BURGI, Sérgio; MENDES, Marylka; BATISTA, Antonio Carlos Nunes. Banco de Dados: Materiais empregados em conservação – restauração de bens culturais. Rio de Janeiro. **Abracor**. 257p. 2011.

BURGIO, L; CLARK, RJ. Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**. Jun, 57(7):1491-521. 2001.

BUTI D, ROSI F, BRUNETTI BG, MILIANI C. In-situ identification of copper-based green pigments on paintings and manuscripts by reflection FTIR. **Anal Bioanal Chem**. Mar; 405(8):2699-711. 2013.

BUTLER, J.M., DAY, A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology** 44, 1115–1136. 1998.

BRUNETTI, COSTANZA MILIANI (Editor). (Org.). Science and Art: the Painted Surface. 1ed. **London: Royal Society of Chemistry**, 644ed. Londres: Royal Society of Chemistry, p. 460-474. 2014.

CALLADO, A; XAVIER, F.F; PORTINARI; J.C. Candido Portinari: o lavrador de quadros. Rio de Janeiro, RJ: **Projeto Portinari**, 312 p. il. 2003.

CALLOL, MILAGROS V. Biodeterioração do patrimônio histórico documental: alternativas para sua erradicação e controle. Rio de Janeiro. **Fundação Casa de Rui Barbosa**, 139p. 2013.

CANEVA, G. Pitting of marble roman monuments and the related microflora. In: **International Congress on Deterioration and Conservation of Stone**, v.1, p, 521-526, 1991.

CANEVA, G.; NUGARI, M. P.; SALVADORI, O. La biología en la restauración. Traducción de Rosalía Gómez. 2 ed. Sevilla: **NEREA**, 274 p. 2000.

CANEVA, G.; NUGARI, M.P.; NUGARI, M.P.; SALVADORI, O. Plant Biology for Cultural Heritage: Biodeterioration and Conservation; **Getty Publications**: Los Angeles, CA, USA, 2008.

CARDENAS, F. CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M. SINISTRERRA, J.V. VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novels microbial lipases: catalytic

activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology** V.28, 145–154. 2001.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO -ALVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; SINI STERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic**. V. 14, p. 111-123, 2001.

CARTA DE ATENAS, Escritório Internacional dos Museus Sociedade das Nações. **Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional**, 1931.

CARTA DE RESTAURO, Escritório Internacional dos Museus Sociedade das Nações, **Ministério do Instrução Público do Governo da Itália**, 1972.

CAPPITELLI F. SORLINI C. Paper and Manuscripts. In: Mitchell R. McNamara C. Cultural Heritage Microbiology: Fundamental Studies in Conservation Science. **ASM Press**, 45-59. 2010.

CASADEVALL, A., CORDERO, R.J., BRYAN, R., NOSANCHUK, J., DADACHOVA, E. Melanin, radiation, and energy transduction in fungi. **Microbiol. Spectr.** 5. 2017.

CASELLI, E, PANCALDI S, BALDISSEROTTO C, PETRUCCI F, IMPALLARIA A, et al., Characterization of biodegradation in a 17<sup>th</sup> century easel painting and potential for a biological approach. **PLOS ONE** 1-12. 2018.

CASTELVECCHI, D. Dark power: pigment seems to put radiation to good use. **Science News**, vol. 171, no. 21, 26 May 2007.

CAPODICASA, S., FEDI, S., PORCELLI, A.N., ZANNONI, D. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting. **International Biodeterioration & Biodegradation** 64. 2010.

CHAPIN, F. S.; MATSON, P. A.; MOONEY, H. A. Principles of terrestrial Ecosystem ecology. Nova York: **Springer**, 455 p. 2002.

CIFERRI, Orio. Microbial Degradation of Painting. **Applied and Environmental Microbiology**. 65(3): 879–885. 1999.

*CODEX ALIMENTARIUS*. Codex Alimentarius Code of Practice for Radiation Processing of Food (CAC/RCP 19–1979, Rev.2–2003b); Editorial Correction 2011; Food Standards Program; Secretaria to the Codex Alimentarius Commission; FAO/WHO: Rome, Italy, 2011.

COLNAGO, A; BRANDÃO, J. Tintas: Materiais de arte. Espírito Santo. **EDUFES**. 2003. 114p. 2003.

CONNELL, S.; LI, J.; SHI, R. Synergistic bactericidal activity between hyperosmotic stress and membrane-disrupting nanoemulsions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62 (Pt 1), p. 69 – 77, 2013.

- COROADO, J.P.F; COSTA, F.M.C; SILVA, R.B; MATEUS, D.M.R. Diversidade microbiológica do edifício da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e avaliação do seu controlo por biocidas. **Conservar Patrimônio** 17 11-20. 2013.
- CRISPIM, C. A., GAYLARDE, P. M., GAYLARDE, C. C. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. **Curr. Microbiol.** v. 46, p. 79-82, 2003.
- DA SILVA, R., FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no Processamento de Alimentos: **Revisão. Boletim da SBCTA**, v. 31, p. 249 - 260, 1997.
- DADACHOVA, EKATERINA, RUTH A. BRYAN, XIANCHUN HUANG, TIFFANY MOADEL, ANDREW D. SCHWEITZER, PHILIP AISEN, JOSHUA D. NOSANCHUK, AND ARTURO CASADEVALL. Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. **PloS One** 2.5.2007.
- DE FELICE B, PASQUALE V, TANCREDI N, SCHERILLO S, GUIDA M. Genetic fingerprint of microorganisms associated with the deterioration of an historical tuff monument in Italy. **Journal Genetic** 89(2):253–257. 2010.
- DE SILVA M., MORAES A.M.L, NISHIKWA M.M., GAHI M.J.A, VALLIM DA ALENCAR M.A., BRANDÃO, L.E., NOBREGA, A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. **International Journal of Biodeterioration and Biodegradation** 57:163 – 167. 2006.
- DEMONT, M.H.; STRASSER, A.; HASSELMANN, C.; MARCHIONIE, E.; HAUSSER, F. Les traitements ionisants des aliments. In *Traitement Ionisants et Hautes Pressions des Aliments*; Federighi, M., Tholozan, J.L., Eds. **Economica**: Paris, France, pp 1-20. 2001.
- DI CARLO, E.; CHISESI, R.; BARRESI, G.; BARBARO, S.; LOMBARDO, G.; ROTOLO, V.; PALLA, F. Fungi and bacteria in indoor Cultural Heritage environments: Microbial-related risks for artworks and human health. **Environ. Ecol. Res.**4, 257–264. 2016.
- DHAWAN, S.; MISRA, A.; GARG, K.L.; PATHAK, N. Laboratory evaluation of ortho-phenyl-phenol and p-chloro-m-cresol for the control of some fungal forms of Ajanta wall paintings. In **Biodeterioration of Cultural Property**; Agrawal, O.P., Dhawan, S., Eds.; Macmillan. New Delhi, India; pp. 313–338.1991.
- DHAWAN, S. Microbial deterioration of mural paintings. In **Biodeterior. Mater.**, 2, 95–105. 2002.
- DHAWAN, S.; GARG, K.L.; PATHAK, N. Microbial analysis of Ajanta wall paintings & their possible control in situ. In **Biodeterioration of Cultural Property, Proceedings of the 2nd International Conference, Yokohama, Japan, 5–8 October 1992**; **International Communications Specialists**: Tokyo, Japan. Volume 2, pp. 245–262.1993.
- DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745 –2749, 2006.

- DOCAMPO, S.; TRIGO, M. M.; RECIO, M.; MELGAR, M.; GARCÍA-SÁNCHEZ, J.; CABEZUDO, B. Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): Diversity and origin. **Science of the Total Environment**. 409, p835-843, 2011.
- DORNIEDEN, T.; GORBUSHINA, A.A.; KRUMBEIN, W.E. Biodecay of cultural heritage as a space/time-related ecological situation—An evaluation of a series of studies. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 46, 261–270.2000.
- DUAN Y, WU F, WANG W, HE D, GU J-D, FENG H, *et al.* The microbial community characteristics of ancient painted sculptures in Maijishan Grottoes, China. **PLoS ONE** 12(7). 2017.
- DUPONT, J.; JACQUET, C.; DENNETIERE, B.; LACOSTE, S.; BOUSTA, F.; ORIAL, G.; CRUAUD, C.; COULOUX, A.; ROQUEBERT, M.F. Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, 99, 526–533. 2007.
- ELHAGRASSY, A.F. Isolation and characterization of actinomycetes from mural paintings of Snu Sert-Ankh tomb, their antimicrobial activity, and their biodeterioration. **Microbiol. Res.** 216, 47–55. 2018.
- EVANGELISTA e SILVA. FONTES DE CONTAMINAÇÃO PELO CHUMBO (Pb). IN: VIII MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU, 8, **Pontifícia Universidade Católica (PUC)**, Goiás, GO, ISSN 2176-0705. 2013.
- FDA. Sec. 179.26 Ionizing Radiation for the Treatment of Food 2019; **FDA: Washington, DC, USA**, 2019.
- FERNANDES, A. P. Avaliação do Potencial Enzimático de Fungos Filamentosos Isolados de Diferentes Fontes. Dissertação apresentada como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, **Universidade Federal de Lavras**. Minas Gerais, 2009.
- FERNANDES, L.; LEITE, C. L.; ESPOSITO, E.; REIS, MM. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.55, p.187-193, 2005.
- FABRIS, ANNATERESA. *Candido Portinari*- São Paulo, SP: **Edusp**. 191 p. 1996.
- FINCH, R.G; Greenwood, D; Norrby, R.S; Whitley, R.J. Antibiotics and Chemotherapy. **Elsevier Health Sciences**. 9 ed. 916 p. 2003.
- FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme Research**, p.1-7, 2012.
- FRAZIER, W. C; WESTHOFF, D. C. Microbiología de los alimentos 4. **Ed.Zaragoza: Acribia**, 1993.
- GALLO, F. Biodeterioramento di Libri e Documenti. *C`entro di St`udi per la Conservazi`one della Carta*, **ICCROM**, Rome, p. 128, 1992.

GAMBINO, M.; AHMED, M.A.A.A.; VILLA, F.; CAPPITELLI, F. Zinc oxide nanoparticles hinder fungal biofilm development in an ancient Egyptian tomb. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 122, 92–99. 2017.

GAYLARDE, C. C.; GAYLARDE, P. M. Biodeterioration of Historic Buildings in Latin America. *Dept. Biophysics & MIRCEN, Federal Uni Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, Brazil, 2002.

GAYLARDE, C. C., MORTON, L. H. G. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. **Biofouling**, v.14, p. 59-74, 1999.

GAYLARDE, C. C., MORTON, L. H. G., LOH, K., SHIRAKAWA, M. A. Biodeterioration of external architectural paint films: a review. **International Biodegradation & Biodeterioration**, v. 64, 1189-1198, 2011.

GAYLARDE, P. M., CRISPIM, C. A., NEILAN, B. A., GAYLARDE, C. C. Cyanobacteria from Brazilian building walls are distant relatives of aquatic genera. **OMICS**, v. 9, p. 30-42, 2005.

GAYLARDE, P. M., GAYLARDE, C. C., GUIAMET, P. S., DE SARAVIA, S. G. G., VIDELA, H. A. Biodeterioration of Mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. **Biofouling**, v. 17, p. 41-45, 2001.

GARG, K.L.; JAIN, K.K.; MISHRA, A.K. Role of fungi in the deterioration of wall paintings. **Sci. Total Environ.** 167, 255–271. 1995.

GIACOBINI C; PEDICA M; SPINUCCI M. Problems and future projects on the study of biodeterioration: mural and canvas paintings Proceedings of the 1st International Conference on the Biodeterioration of Cultural Property. New Delhi, India: **Macmillan India Limited**; 31.; pp. 275–286. 1991.

GIL, M ; MARTINS, M ; CARVALHO, M ;SOUTO, C ; LONGELIN, S ; CARDOSO, A ; MIRAIO, J ;CANDEIAS, A. Microscopy and Microanalysis of an Extreme Case of Salt and Biodegradation in 17th Century Wall Paintings. **Microsc Microanal.** 606-616. 2015.

GLUSZEWSKI, W., BORUC, B., KUBERA, H., & ABBASOWA, D. The use of DRS and GC to study the effects of ionizing radiation on paper artifacts. **Nukleonika**, 60(3), 665–668. 2015.

GOMBRICH, Ernst Hans. A história da arte. 16. ed. Rio de Janeiro: **LTC**, 1999.

GORBUSHINA, AA, Jeroen Heyrman, T DORNIEDEN, M GONZALEZ-DELVALLE, WE KRUMBEIN, L LAIZ, K PETERSEN, C SAIZ-JIMENEZ, and SWINGS J. Bacterial and Fungal Diversity and Biodeterioration Problems in Mural Painting Environments of St. Martins Church (Greene-Kreiensen, Germany). **International Biodeterioration & Biodegradation** 53 (1): 13–24. 2004.

GOLDSTEIN, Joseph I; NEWBURY, Dale E; ECHLIN, Patrick; JOY, David C.; FIORI, Charles; LIFSHIN, Eric. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists. New York; London: **Plenum Press**, 690 p, 2003.

GOMOIU, I.; ENACHE, M.; MOHANU, I.; COJOC, R.; NEAGU, S.; MOHANU, D. COLONIZAREA MORTARELOR DE CATRE BACTERII SI FUNGI/THE Colonization of Mortars by Bacteria and Fungi. **Revista Romana de Materiale**, Vol.47(1), pp.424-430. 2017.

GOMOIU, I.; COJOC, R.L.; ENACHE, M.I.; NEAGU, S.E.; MOHANU, D.; MOHANU, I. Microbial ability to colonize mural painting and its substrate. **Acta Phys. Polo.** 134, 383–386. 2018.

GOMEZ, M. L. La restauracion: examen cientifico aplicado a la conservacion de obras de arte.4 ed. **Madrid. Catedra**, 488p. 2005.

GREIF, M.D., CURRAH, R.S. Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. **Mycologia** 99, 7–19. 2007

GRIMM, L, H., KELLY, S., KRULL, R, HEMPEL, D. C. Morphology and production of filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnonology**, v. 69, p. 375-384, 2005.

GRILLO, MICHEL RODRIGUES FERREIRA. Efeito da radiação ionizante Cobalto 60 na morfologia e metabolismo de leveduras e clamidoconídios de *Candida albicans*. **Dissertação (Mestrado). São Paulo**, 2016.

GUGLIELMINETTI M, DE GIULI Morghen C, RADAELLI A, BISTONI F, CARRUBA G, SPERA G, CARETTA G. Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in frescos of the monastery of St. Damian in Assisi. **Int Biodeterior Biodegrad.**;34:269–283. 1994.

GUMUS T, GECGEL U, SUKRU DEMIRCI A, ARICI M. Eff ects of gamma irradiation on two heat resistant moulds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* isolated from margarine. **Radiation Physics and Chemistry** 77:680 – 683. 2008.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia, New York**, v. 67, n. 3, Nov/Dec. 1975.

HE, D.; WU, F.; MA, W.; ZHANG, Y.; GU, J.-D.; DUAN, Y.; XU, R.; FENG, H.; WANG, W.; LI, S.-W. Insights into the bacterial and fungal communities and microbiome that causes a microbe outbreak on ancient wall paintings in the Majjishan Grottoes. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 163, 105250. 2021.

HELMI, F.M.; ELMITWALLI, H.R.; RIZK, M.A.; HAGRASSY, A.F. Antibiotic extraction as a recent biocontrol method for *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* fungi in ancient Egyptian mural paintings. **Mediterr. Archaeol. Arc.** 11, 1–7. 2011.

HERRERA, L. K., VIDELA, H. A. The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 125-134, 2004.

HOFBAUER, W., FITZ, C., KRUS, M., SEDLBAUER, K., BREUER, K., 2006. Assesment procedure for microbial growth of algae and mould on the basis of physical and biological investigations. Hrsg.: Fraunhofer-Institut für Bauphysik eIBP-, Holzkirchen; **Bauforschung für die Praxis Band.** 77. 2006.

- HEINZEL, M. Phenomena in biocide resistance in microorganisms. **International Biodeterioration and Biodegradation** 41, 225–234. 1998.
- HU, Y., ZHAO, K., QU, Y., SONG, X., ZHAO, J., QUIN, Y. Penicillium oxalicum S-adenosylmethionine synthetase is essential for the viability of fungal cells and the expression of genes encoding cellulolytic enzymes. **Fungal Biology** 125, 1e11. 2021.
- HUECK, H. J. The biodeterioration of materials as part of hydrobiology. **Material und Organisms**, n.1, p.5-34. 1965.
- HUMBER, R.A., HANSEN, K.S. ARSEF Index: Host-by-fungus. **USDA-ARS collection of entomopathogenic fungal cultures**. Ithaca, NY. 2005.
- IAEA. Manual of Good Practice in Food Irradiation: Sanitary, Phytosanitary and Other Applications; Technical Reports Series; International **Atomic Energy Agency**: Vienna, Austria, 2015.
- IONITA, I. Contributions to the study of the biodeterioration of the work of art and of historic monuments. II. Species of fungi involved in the deterioration of mural paintings from the monasteries of Moldavia. *Rev. Roum. Biol. Série Bot.*, 18, 179–189. 1973.
- JANDERA, P.; HENZE, G. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry: Liquid chromatography in **1. Fundamentals, history, instrumentation, materials**, 2000.
- JUNG, KWANG-WOO, SANGYONG LIM, AND YONG-SUN BAHN. Microbial Radiation-resistance Mechanisms." **The Journal of Microbiology** 55.7. 499-507. 2017.
- KECK. Interdisciplinary Surface Science. Center, Northwestern University.
- KHALAPHALLAH, R.; EL-DERBY, A.A. The effect of nano-TiO<sub>2</sub> and plant extracts on microbial strains isolated from Theban ancient Egyptian royal tomb painting. **Afr. J. Microbiol. Res.** 9, 1424–1430. 2015.
- KIEL, G., AND GAYLARDE, C. Bacterial diversity in biofilms on external surfaces of historic buildings in Porto Alegre. **World J. Microbiol. Biotechnol.** Vol. 22, 293–297. 2006.
- KIM, M. J., SHIN, H. K., CHOI, Y. S., KIM, G. C., & KIM, G. H. An aeromycological study of various wooden cultural heritages in Korea. **Journal of Cultural Heritage**. 1- 8. 2015.
- KRUMBEIN, W. E. Microbial interactions with mineral materials, **Biodeterioration**, v. 7, p.78-100, 1988.
- KRUMBEIN, W. E., DIAKUMAKU, E., PETERSEN, K., WARSCHEID, TH., URZI, C. E. Interactions of Microbes With Consolidants And Biocides Used In Conservation of Rocks And Mural Paintings. **Conservation of Stone and Other Materials**, v. 2, p. 589-596, 1993.
- KORPI, A.; PASANEN, A. L.; PASANEN, P.; & KALLIOKOSKI, P. Microbial growth and metabolism in house dust. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 40, p19–27, 1997.

LEITE, J.G. Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro-Espectroscopia com focal Raman aplicada à Preservação do Patrimônio. Portugal, **Universidade do Porto**. 76p. 2008.

LYND LR, WEIMER PJ, VAN ZYL WH, PRETORIUS IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 66, p. 506–577, 2002.

LOPEZ-MIRAS MdM, MARTIN-SANCHEZ I, YEBRA-Rodríguez A, ROMERO-NOGUERA J, BOLIVAR-GALIANO F, et al., (2013) Contribution of the Microbial Communities Detected on an Oil Painting on Canvas to Its Biodeterioration. **PLoS ONE** 8(11). 2013.

LUTTERBACH, M.T.S; OLIVEIRA, A.L.C; ZANATTA, E.M; COSTA, A.C.A. A berlinda de aparato do imperador D. Pedro II: identificação de fungos em partes selecionadas e sua relação com biodeterioração e aerobiologia. **Conservar Patrimônio** 17 p 59-72. Portugal. 2013.

MA, Y.; ZHANG, H.; DU, Y.; TIAN, T.; XIANG, T.; LIU, X.; WU, F.; AN, L.; WANG, W.; GU, J.-D.; et al., The community distribution of bacteria and fungi on ancient wall paintings of the Mogao Grottoes. **Sci. Rep.**, 5, 7752. 2015.

MA, W.; WU, F.; TIAN, T.; HE, D.; ZHANG, Q.; GU, J.-D.; DUAND, Y.; MAE, D.; WANG, W.; FENG, H. Fungal diversity and its contribution to the biodeterioration of mural paintings in two 1700-year-old tombs of China. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 152, 104972. 2020.

MACEDO, M.F., CABRITA, E.J., SEQUEIRA, S. Antifungals on paper conservation: An overview. **Journal International Biodeterioration e Biodegradation**. V 74 67-86. 2012.

MAGAUDA, G. Review The recovery of biodeteriorated books and archive documents through gamma radiation: some considerations on the results achieved. **Journal of Cultural Heritage. Elsevier**. 113–118. 2004.

MAITY JP, CHAKRABORTY A, SAHA A, SANTRA SC, CHANDA S. Radiation induced effects on some common storage edible seeds in India infested with surface microflora. **Radiation Physics and Chemistry** 71:1065 – 1072. 2004.

MAITY, J.P., A. CHAKRABORTY, S. CHANDA, AND S.C. SANTRA. Effect of Gamma Radiation on Growth and Survival of Common Seed-borne Fungi in India. **Radiation Physics and Chemistry** 77.7 - 907-12. 2008.

MAITY, JYOTI PRAKASH, SANDEEP KAR, SHASHWATA BANERJEE, MATHUMMAL SUDERSHAN, ANINDITA CHAKRABORTY, AND SUBHAS C. SANTRA. Effects of Gamma Radiation on Fungi Infected Rice (in Vitro). **International Journal of Radiation Biology** 87.11 - 1097-102. 2011.

MACKENZIE E. MALO, RUTH A. BRYAN, IGOR SHURYAK, EKATERINA DADACHOVA, Morphological Changes in Melanized and non-melanized cryptococcus neoformans cells post exposure to sparsely and densely ionizing radiation demonstrate protective effect of melanin. **Fungal Biology**, Volume 122, Issue 6.2018.

MAYER, R. Manual do artista. **Martins Fontes**. 838p. 2002.

MANEA, MIHAELA M., IOAN V. MOISE, MARIAN VIRGOLICI, CONSTANTIN D. NEGUT, OLIMPIA-HINAMATSURI BARBU, MIHALIS CUTRUBINIS, VIOREL FUGARU, IOANA R. STANCULESCU, AND CORNELIU C. PONTA. Spectroscopic Evaluation of Painted Layer Structural Changes Induced by Gamma Radiation in Experimental Models. **Radiation Physics and Chemistry**. 81.2: 160-6.2012.

MANNHEIMER, W. A. Microscopia dos Materiais - Uma introdução. Rio de Janeiro: **E-papers Serviços Editoriais**, 2002.

MARENGO. E, LIPAROTA M.C., ROBOTTI, E., BOBBA M. Multivariate calibration applied to the field of cultural heritage: analysis of the pigments on the surface of a painting. **Analytica chimica acta** 553 (1-2), 111-122. 2005.

MARTINS, R.; FIALHO, S.; LIMA, M.; TAVARES, D.; MIRÃO, J.; VALADAS, S.; CANDEIAS, A.E. Biodegradation assessment of a 16th century fresco from Southern Portugal. **Microsc. Microanal**, 15, 65–66. 2009.

MATTEINI M, MOLES, A. La química en la restauración los materiales del arte pictórico. Espanha. **Nerea**. 508p. 2001.

MARTIARENA, Javier. Conservación y Restauración. Cuadernos de la sección de Artes Plásticas y Documentales, p.177-224. **Navarra**.1992.

MAZZOLI, R., GIUFFRIDA, M.G, PESSIONE, E. Back to the past: Bfind the guilty bug microorganisms involved in the biodeterioration of archeological and historical artifacts. **Applied Microbiology and Biotechnology** 102:6393–6407. 2018.

MEILUNAS, R. J.; BENTSEN, J. G.; STEINBERG, A. **Stud. Conserv.** 35, 33. 1990.0

MICHAELSEN, A., PINZARI, F., RIPKA, K., LUBITZ, W., AND PIÑAR, G. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. **Int Biodeterior Biodegradation**. 58: 133– 141. 2006.

MOHAMOUD, E.F. Abdel-Haliem. et al., Efficiency of antibiotics and gama radiationin eliminating Streptomyces strains isolate from paintings of ancient Egyptian tombs. **Science Direct. Journal of Cultural Heritage**. 2013.

MONTEIRO, V.N; SILVA, R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v.3, p. 9-23, 2009.

MOREIRA RG, EKPANYASKUN N, BRABY LA. Theoretical approach for the calculation of Radiation D 10 -value. **Journal of Food Process Engineering** 33:314– 340. 2010.

MOZA M. L., MIRONESCU M., GEORGESCU C, FLOREA, A. Isolation and characterization of moulds degrading mural paintings. **Annals of the Romanian Society for Cell Biology** 17(1). 2010.

MUNIR MT, FEDERIGHI M. Control of Foodborne Biological Hazards by Ionizing Radiations. **Foods**. 9(7):878. 2020.

NEIVA, A. C; DRON, J. Caracterização de bens culturais por espectroscopia de fluorescência de raios X. **Revista CPC**, São Paulo, n. 6, p. 188-197, 2008.

NÓBREGA, R. S. Um pensamento crítico sobre classificações climáticas: de Köppen até Strahler. Pernambuco: **Revista Brasileira de Geografia Física**, UFPE, 2010.

NUNES, I; N, MESQUITA., N, VERDE., S.C, CAROLINO, M.M, Portugal, A.; BOTELHO, M.L. Bioburden assessment and gamma radiation inactivation patterns in parchment documents. **Elservier. Radiation Physics and Chemistry** v 88 / 82–89. 2013.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 26, n. 4, p. 853-860, out./dez, 2006.

OLIVEIRA, W. F., MACHADO, L. P., FILHO, A. C. O. Efeito de diferentes concentrações de benomyl e PCNB sobre o crescimento radial de *Fusarium solani* e *Pythium* sp., *in vitro*. **Curso de Agronomia da Universidade Federal de Goiânia – GO**. 1999.

OLIVEIRA, L F C, BOSEAN, J C R P, SANTOS, P.S, TEMPERINI, M. L.A. Identificação por microscopia raman de pigmentos da pintura a óleo “retrato de murilo mendes” de Cândido Portinari. **Química Nova** v. 21, n. 2, p. 172-175, 1998.

OKPALANOZIE O.E., SUNDAY A.A., TROIANO F, POLO A, CAPPITELLI, F., ILORI, M.O.B. Evaluating the microbiological risk to a contemporary Nigerian painting: Molecular and biodegradative studies. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 114. 184-192. 2016.

PALLA, F.; BILLECI, N.; MANCUSO, F.P.; PELLEGRINO, L.; LORUSSO, L.C. Microscopy and molecular biology techniques for the study of biocenosis diversity in semi-confined environments. **Conserv. Sci. Cult. Herit.**, 10, 185–194. 2010.

PANGALLO D, CHOVANOVÁ K, ŠIMONOVÍČOVÁ A, FERIANC P. Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and air environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing. **Can J Microbiol**, 55(3):277–287. 2009.

PANGALLO, D. et al., Analysis and comparison of the microflora isolated from fresco. surface and from surrounding air environment through molecular and biodegradative assays. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 28, 2015–2027. 2012.

PEIXOTO, Clarissa F. Limpeza superficial de documentos hstóricos em papel empregando laser Nd: YAG. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Processos Químicos e Metalúrgicos) **PUC-Rio**. 2012.

PEPE. O., SANNINO. L, PALOMBA. S, ANASTASIO. M, BLAIOTTA. G, VILLANI.F, MOSCHETTI. G. Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches. **Microbiological Research** .165 21—32. 2010.

PETIT, JEAN. Niemeyer: Poeta na arquitetura. **Fidia Edizione d'Arte**, p. 26. 1995.

PIÑAR, G., SAIZ-JIMENEZ, C., SCHABEREITER-GURTNER, C., BLANCO-VARELA, M.T., LUBITZ, W., ROLLEKE, S. Archaeal communities in two disparate deteriorated ancient wall paintings: detection, identification and temporal monitoring by denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 37, p. 45-54, 2001.

PIÑAR G, DALNODAR D, VOITL C, RESCHREITER H, STERFLINGER K. Biodeterioration Risk Threatens the 3100 Year Old Staircase of Hallstatt (Austria): Possible Involvement of Halophilic Microorganisms. **PLoS ONE** 11(2) 1-21. 2016.

PITARCH A, . RAMÓN A, . ÁLVAREZ-PÉREZ .A, CASTRO K, MADARIAGA JM & QUERALT I. Multispectroscopic Characterization of Oil on Copper Painting. **Spectroscopy Letters**, 47:38–51. 2014.

POINTING, S., JONES, E. B. G., AND JONES, M. Radiosensitivity of Fungi Isolated From Waterlogged Archaeological Wood. *Mycoscience* 37 (4): 455. 1996.

PORTNOY, J. M; FLAPPAN, S; BARNES, C. S. A procedure for evaluation of the indoor environment. **Aerobiology**, 17, p. 43–48, 2001.

PORTILLO, M. C., GONZALEZ, J. M., SAIZ-JIMENEZ, J. M. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 681-691, 2008.

PORTINARI, Candido. Candido Portinari: catálogo raisonné. Org. João Candido Portinari, Christina Penna. Rio de Janeiro, RJ: **Projeto Portinari**, 5 v. il. 2004.

PROENÇA, Graça. História da Arte. São Paulo: **Ed. Ática**, 2010.

RAMIREZ, J. L., SANTANA, M. A., GALINDO-CASTRO, I., GONZALEZ, A. The role of biotechnology in art preservation. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 584-596, 2005.

REBRICOVA, N.L. Micromycetes taking part in deterioration of old Russian wall paintings. In Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation. **Biodeterioration of Cultural Heritage**; Naya Prokash: Calcutta, India, Volume 1, pp. 205–232. 1993.

RESENDE, M. A. Biodeterioração de monumentos históricos. Cap. 15, In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. editores, Microbiologia Ambiental, **Hamburg Gráfica Editora**, São Paulo, p. 335-356, 1997.

RESENDE, M. A., DE CASTRO REZENDE, G., VIANA, E. M., BECKER, T. W., WARSCHEID, TH. Acid production of fungi isolated from stones of historical monuments of state of Minas Gerais, Brazil. In: **Second LABS (Latin American Biodeterioration Symposium)**, Gramado, Brazil, p. 65-67, 1996.

RESENDE, M. A. Biodeterioração de monumentos históricos. Cap. 22, In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. editores, Microbiologia Ambiental, 2 Ed. **Hamburg Gráfica Editora**, São Paulo, p. 501-520,.647p. 2008.

REYS, A.C.; LAMA, E.A. DEHIRA K. L. Monumentos da cidade de São Paulo: Formas de alteração e conservação. **Revista Monumentos**, São Paulo, n. 5, p. 93-122, 2008.

RICETTO, L. Pintura - Arte, Técnica e História. **Companhia Editora Nacional**. Brasil 111p. 2010.

RIZZO, M.M., MACHADO, L.D.B., BORRELY, S.I., SAMPA M.H.O., RELA, P.R., FARAH, J.P.S., SCHUMACHER, R.I. Effects of gamma rays on a restored painting from the XVIIth century. **Radiation Physics and Chemistry** 63, 259–262 M.M. 2002.

RODRIGUES FILHO, MÁRIO – *A infância de Portinari*, **Edições Bloch**, Rio de Janeiro – 1962.

ROSADO, T.; GIL, M.; MIRÃO, J.; CANDEIAS, A.; CALDEIRA, A.T. Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms—A comprehensive study. **Int. Biodeter. Biodegr**, 85, 1–7. 2013.

ROSADO, T.; MARTINS, M.R.; PIRES, M.; MIRÃO, J.; CANDEIAS, A.; CALDEIRA, A.T. Enzymatic monitorization of mural paintings biodegradation and biodeterioration. **Int. J. Conserv. Sci.** 4, 603–612. 2013.

ROSADO, A.; MENDES, I. M. de Castro; MOTTA JUNIOR, E. TEIXEIRA, C. V. SOUZA, L. A. C. Material and Technical Studies of a Selected Group of Paintings by Candido Portinari, a Major Brazilian Modernist Painter. In: Antonio Sgamellotti, Brunetto Giovanni. 2014.

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. **Anal Bioanal Chem** 406:887–895. 2014.

ROSADO, T.; GIL, M.; CALDEIRA, A.T.; MARTINS, M.D.R.; DIAS, C.B.; CARVALHO, L.; MIRÃO, J.; CANDEIAS, A.E. Material characterization and biodegradation assessment of mural paintings: Renaissance frescoes from Santo Aleixo Church, Southern Portugal. **Int. J. Architect. Herit.** 8, 835–852. 2015.

ROSADO T, SILVA M, DIAS L, CANDEIAS A, GIL M, MIRÃO J, et al., Microorganisms and the integrated conservation-intervention process of the renaissance mural paintings from Casas Pintadas in Évora—Know to act, act to preserve. **J King Saud Univ Sci**; 29(4):478–86. 2017.

ROSADO, T, FALÉ, A, GIL, M, MIRÃO, J, CANDEIAS, A, CALDEIRA, AT. Understanding the influence of microbial contamination on colour alteration of pigments used in wall paintings—The case of red and yellow ochres and ultramarine blue. **Color Res Appl.**; 44: 783–789. 2019.

RUSU R.D., SIMIONESCU B., OANCEA A.V., GEBA M., STRATULAT L., SALAJAN D., URSU L.E., POPESCU M.C., DOBROMIR M., MURARIU M., COTOFANA C., OLARU M. Analysis and structural characterization of pigments and materials used in Nicolae Grigorescu heritage paintings. **Spectrochim Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** **Elsevier** .168:218-229. 2016.

SAAD, D. S., KINSEY, G.C., PATERSON, R., GAYLARDE, C. Ergosterol analysis for the quantification of fungal growth on paint films. Proposal for standard method. *Surface Coatings International. Part B: Coatings Transactions*. Springer. v.86, p.131-134, 2003.

SÁIZ-JIMÉNEZ, C.; SAMSON, R.A. Microorganisms and environmental pollution as deteriorating agents of the frescoes of the Monastery of “Santa María de la Rábida”, Huelva, Spain. In Proceedings of the ICOM, **Committee for Conservation, 6th Triennial Meeting**, Ottawa, ON, Canada, 21–25 September 1981.

SAIZ-JIMENEZ, C. Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms. *Aerobiology* 11, 166-175. 1995.

SALA, Oswaldo. Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho. **Ed. UNESP**, SP, 1996.

SALVADOR, C, BORDALO, R., SILVA, M, ROSADO, T, CANDEIAS, A, CALDEIRA, A.T. On the conservation of easel paintings: evaluation of microbial contamination and artists materials. **Applied Physics**. Volume 123, 2016.

SANTOS A, CERRADA A, GARCÍA S, SAN ANDRÉS M, ABRUSCI C, MARQUINA D. Application of molecular techniques to the elucidation of the microbial community structure of antique paintings. **Microb ecol.** nov;58(4):692-702. 2009.

SCHABEREITER-GURTNER C, PIÑAR G, LUBITZ W, RÖLLEKE S.J. An advanced molecular strategy to identify bacterial and fungi communities on art objects. **J Microbiol Methods**. 2001.

SALEH, N. A.; AZIZ, N. H. Incidence of mycotoxins in feedstuffs and effects of gamma irradiation and sodium propionate on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Journal of the Egyptian Medical Association**, v. 56, p. 281-299, 1996.

SEAN C. Sweetman. Martindale Guía Completa de Consulta Farmacoterapéutica. 33ª Ed. London: **Pharmaceutical Press Pharma Editores S.L.** Barcelona. 2003.

SENBUA, W.; WICHITWECHKARN, J. Molecular identification of fungi colonizing art objects in Thailand and their growth inhibition by local plant extracts. **Biotech** 9, 356. 2019.

SHEIKH, N., R. BETESHO BABRUD, AND F. KHATAMIFAR. The Effect of Gamma Irradiation to Eliminate Fungal Contamination on Two Model Colors of Iranian Paintings. **Radiation Physics and Chemistry** 189. 2021.

SHIRAKAWA, M. A. Biodeterioração de argamassas por fungos: desenvolvimento de testes acelerados para avaliação de bioreceptividade. Tese de doutorado. **Escola Politécnica Universidade de São Paulo**. São Paulo, 1999.

SHIRAKAWA, M. A., GAYLARDE, C. C., GAYLARDE, P., JOHN, V. M., GAMBALE, W. Fungi Colonization and succession on newly painted building. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p. 165-173, 2002.

SHIRAKAWA, M. A., GAYLARDE, C. C., GAYLARDE, P., JOHN, V. M., GAMBALE, W. A biodeterioração de materiais de construção civil. **Revista Técnica**. A revista de tecnologia da construção civil. Editora PINI. São Paulo, v.5, nº33, p. 36-39, 1998.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. Micologia Médica A Luz Dos Autores Contemporâneos. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. **Guanabara. Koogan**, 396p. 2004.

SLAIBI, T. H.A.; MENDES, M.; GUIGLEMETI, D. O.; GUIGLEMETI, Wallace A. Materiais empregados em conservação-restauração de bens culturais. 2 ed. rev. e ampl. Rio de Janeiro: **ABRACOR**. 372 p. 2011.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8<sup>a</sup> Edição norte-americana, **Editora Thomson**, São Paulo-SP, 2006.

SILVA, V. O; BONIEK, D.; BONADIO, L.; CASTRO, I. M.; STOIANOFF, M. A. R.; Pereira, M.T. Estudo e Avaliação de tratamentos Experimentais de desinfestação a partir de uma pintura colonizada por fungos. In: 3<sup>o</sup> Congresso Iberoamericano (COIBRECOPA) y la XI Jornada de Técnicas de Restauración y Conservación del Patrimonio 2013, La Plata/ Argentina: **LEMIT**, V. topico. P. 1-12. 2013.

SILVA, V. O. Emprego de biocidas e radiação gama na desinfecção de protótipos elaborados a partir de uma pintura colonizada por fungos: subsídios para a conservação da obra original. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas ênfase Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas-UFMG. Belo Horizonte. 2016.

STERFLINGER, K., KRUMBEIN, W. E. Dematiaceous fungi as a major agent for biopitting on marbles and limestones. **Geomicrobiol. J.**, v. 14, p. 219-230, 1997.

STERFLINGER, K. Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. **Fungal Biol. Rev.**, 24, 47–55. 2010.

STERFLINGER, K.; PIÑAR, G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art—Tilting at windmills? **Appl. Microbiol. Biot.**, 97, 9637–9646. 2013.

STERLIC, M., Kolar, J., SCHOLTEN, S. Paper and durability. In: Sterlic, M., Kolar, J. (Eds). Ageing and Stabilization of Paper. **National and University Library**, Ljubljana, Slovenia, pp. 3 e 8. 2005.

STOYANCHEVA, G.; KRUMOVA, E.; KOSTADINOVA, N.; MITEVA-STALEVA, J.; GROZDANOV, P.; GHALY, M.F.; SAKR, A.A.; ANGELOVA, M. Biodiversity of contaminant fungi at different coloured materials in ancient Egypt Tombs and Mosques. **Cr. Acad. Bul. Sci.**71, 907–915. 2018.

SUGIYAMA, J.; KIYUNA, T.; AN, K.D.; NAGATSUKA, Y.; HANDA, Y.; TAZATO, N.; HATA-TOMITA, J.; NISHIJIMA, M.; KOIDE, T.; YAGUCHI, Y.; et al., Microbiological survey of the stone chambers of Takamatsuzuka and Kitora tumuli, Nara Prefecture, Japan: A milestone in elucidating the cause of biodeterioration of mural paintings. In Proceedings of the 31st International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property—Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures, **Tokyo, Japan**, vol 5–7, pp. 51–73. 2008.

SUGIYAMA, J.; KIYUNA, T.; NISHIJIMA, M.; AN, K.D.; NAGATSUKA, Y.; TAZATO, N.; HANDA, Y.; HANDA-TOMITA, J.; SATO, Y.; KIGAWA, R.; et al., Polyphasic insights into the microbiomes of the Takamatsuzuka tumulus and Kitora tumulus. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 63, 63–113. 2017.

SZOSTAK-KOTOW J. Biodeterioration of textiles. *Int Biodeterior Biodegrad* 53:165–170. **Springer**. 2004.

THERMO Nicolet. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry. Thermo Nicolet Corporation © Disponível em <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>. 2001.

TOMAZELLO, M.G.C., 1994. A aplicabilidade da radiação gama no controle de fungos que afetam papéis. Tese de Doutorado, IPEN-CNEN/SP, USP. 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiology: an introduction. **E. Pearson**, 8 ed., 2004.

UNKOVIC, N.; LJALJEVIC GRBIC, M.; SUBAKOV-SIMIC, G.; STUPAR, M.; VUKOJEVIC, J.; JELIKIC, A.; STANOJEVIC, D. Biodeteriogenic and toxigenic agents on 17th century mural paintings and facade of the old church of the Holy Ascension (Veliki Kr̄cimir, Serbia). *Indoor Built Environ*, 25, 826–837. 2015.

UNKOVIC, N.; GRBIC, M.L.; STUPAR, M.; SAVKOVIC, Z.; JELIKIC, A.; STANOJEVIC, D.; VUKOJEVIC, J. Fungal-induced deterioration of mural paintings: In situ and mock-model microscopy analyses. *Microsc. Microanal.* 22, 410–421. 2016.

UNKOVIĆ, N; ERIC, S.P, MILKOVIĆ ŠARIĆ. K, STUPAR. M; SAVKOVIĆ Z, STANKOVIĆ K.S., STANOJEVIĆ O, DIMKIĆ I. Z., VUKOJEVIĆ J.B.AND LJALJEVIĆ GRBIĆ M. Biogenesis of secondary mycogenic minerals related to wall paintings deterioration process. *Micron* 100: 1-9. 2017.

UNKOVIC, N.; DIMKIC, I.; STUPAR, M.; STANKOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; LJALJEVIC, GRBIC, M. Biodegradative potential of fungal isolates from sacral ambient: In vitro study as risk assessment implication for the conservation of wall paintings. *PLoS ONE* 2018.

URZI, C. E., KRUMBEIN, W. E. Microbiological impacts on the cultural heritage. Wiley, **Chichester**, p.107-135, 1994.

VENERANDA M, IRAZOLA.M, PITARCH A, MAITANE OLIVARES, A I, CASTRO, K and MADARIAGA JM. In-situ and laboratory Raman analysis in the field of cultural heritage: the case of a mural painting. *J. Raman Spectrosc.*, 228. 2014.

VENERANDA, M., PRIETO-TABOADA, N., de VALLEJUELO, S.FO. et al., Biodeterioration of Pompeian mural paintings: fungal colonization favoured by the presence of volcanic material residues *Environ Sci Pollut Res.* 1-24. 2017.

VAHUR,S., TEEARU, A., LEITO, I. ATR-FT-IR spectroscopy in the region of 550-230 cm<sup>-1</sup>) for identification of inorganic pigments. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* Mar;75(3):1061-72. 2010.

VAHUR, S., TEEARU, A., PEETS, P., JOOSU, L., LEITO, I. ATR-FT-IR spectral collection of conservation materials in the extended region of 4000-80 cm<sup>-1</sup>. **Anal Bioanal Chem** 408:3373–3379. 2016.

VASQUEZ, P. A. S., NAGAI, M. L. E. The contribution of gamma ionization technology to the recovery of cultural heritage collections. **Revista do Arquivo**. São Paulo, Ano VI, Nº 11, p. 101-110. 2020.

VIETO, SOFÍA, EFRAÍN ESCUDERO-LEYVA, ROBERTO AVENDAÑO, NOELIA RECHNITZER, MELISSA D. BARRANTES-MADRIGAL, GERALDINE CONEJO-BARBOZA, OSCAR A. HERRERA-SANCHO, PRISCILA CHAVERRI, AND MAX CHAVARRÍA. Biodeterioration and Cellulolytic Activity by Fungi Isolated from a Nineteenth-century Painting at the National Theatre of Costa Rica. **Fungal Biology** 126.2: 101-12. 2022.

VUJCIC, IVICA, SLOBODAN MASIC, MINA MEDIC, BOJANA MILICEVIC, AND MIROSLAV DRAMICANIN. The Influence of Gamma Irradiation on the Color Change of Wool, Linen, Silk, and Cotton Fabrics Used in Cultural Heritage Artifacts. **Radiation Physics and Chemistr** 156: 307-13. 2019.

WHAAP, F. The treatment of two Coptic tapestry fragments V&A. **Conservation Journal**, v. 55, p. 11-13, 2007.

WAKELIN S.A., WARREN R.A., HARVEY P.R. & RYDER M.H. - Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, 40: 36–43. 2004.

World Heritage Encyclopedea. Candido Portinari. 2018.

WHO. High dose radiation: wholesomenes of food with doses above 10kGy. **Geneva**, p. 1-97. 1999.

WILSON, K; J, WALKER. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology, 7ed. **Cambridge University Press**, 736p. 2010.

YOON, MINCHUL, DAE-WOON KIM, JONG-IL CHOI, YONG-JAE CHUNG, DAI-ILL KANG, GWANG HOON KIM, KWANG-TAE SON, HAE-JUN PARK, AND JU-WOON LEE. Effect of Gamma Irradiation on Korean Traditional Multicolored Paintwork. **Radiation Physics and Chemistry**. 112-18. 2015.

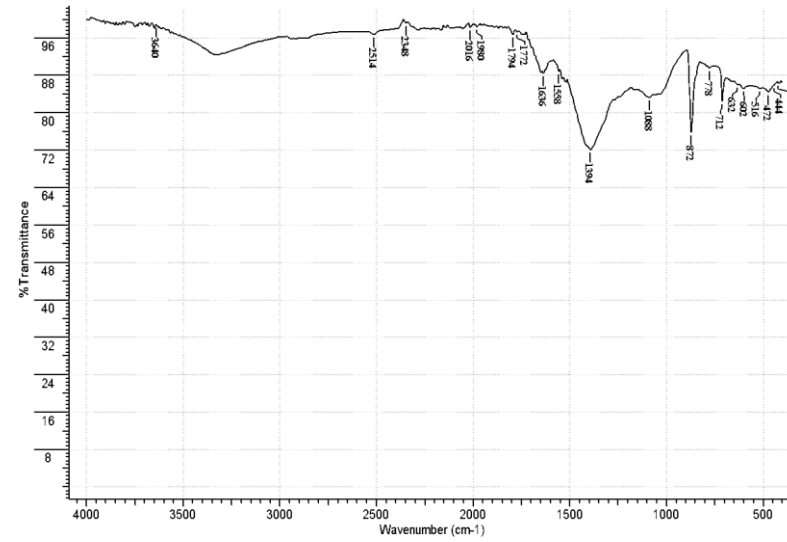
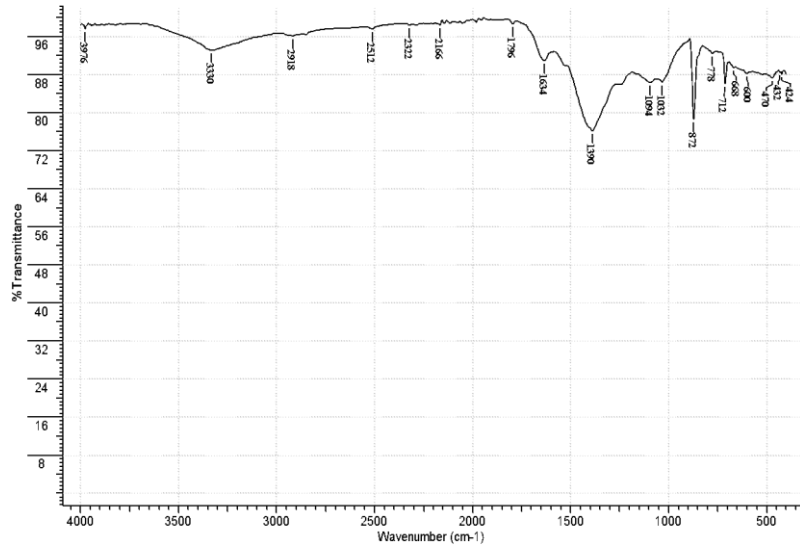
ZAITS. C, RUIZ, L. R. B., FRAMIL, V.M.S. Compêndio de Micologia Médica. 2ª ed. Rio de Janeiro. **Guanabara. Koogan**, 416p. 2010.

ZANNONI, Davide. et al., The microbial community dwelling on biodeteriorated 16 th century painting. *International Biodeterioration & Biodegradetion*. **Science Direct**. 2010.  
ZUCCONI, L.; CANINI, F.; ISOLA, D.; CANEVA, G. Fungi Affecting Wall Paintings of Historical Value: A Worldwide Meta-Analysis of Their Detected Diversity. **Appl. Sci.**12, 2988. 202.

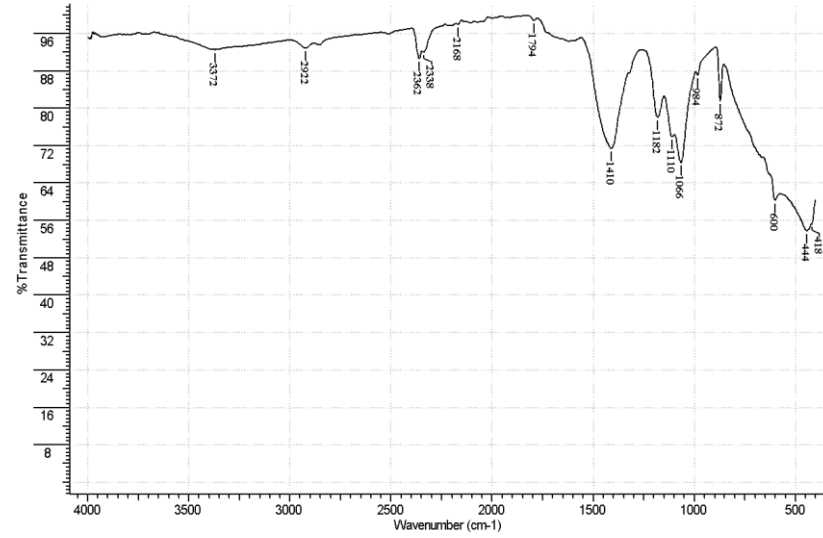
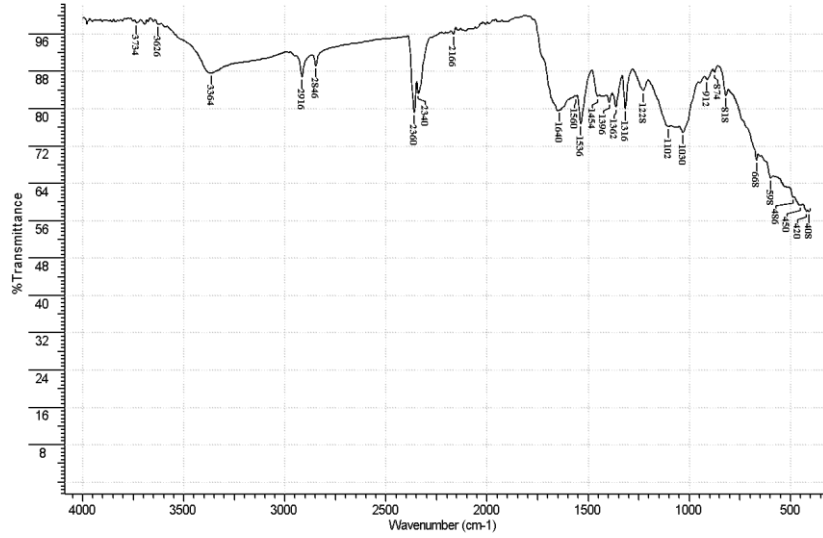
## ANEXOS

### Anexo A Espectros dos fragmentos ao exame Infravermelho

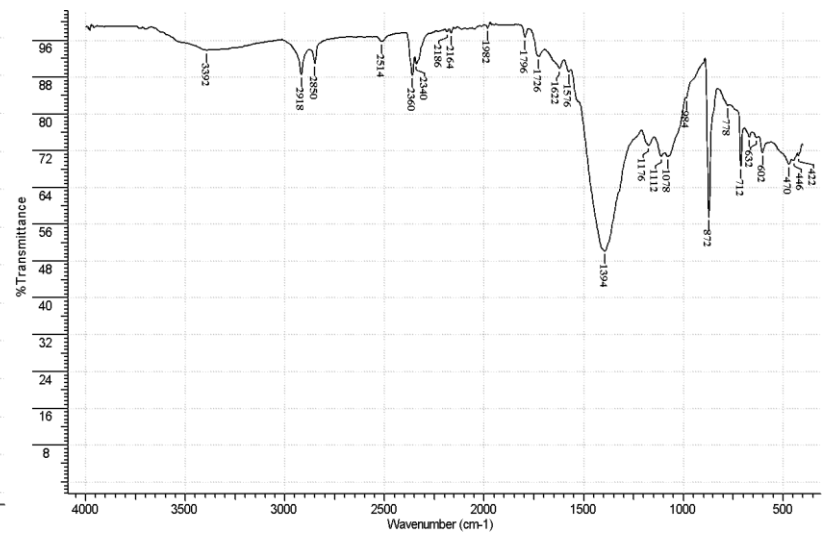
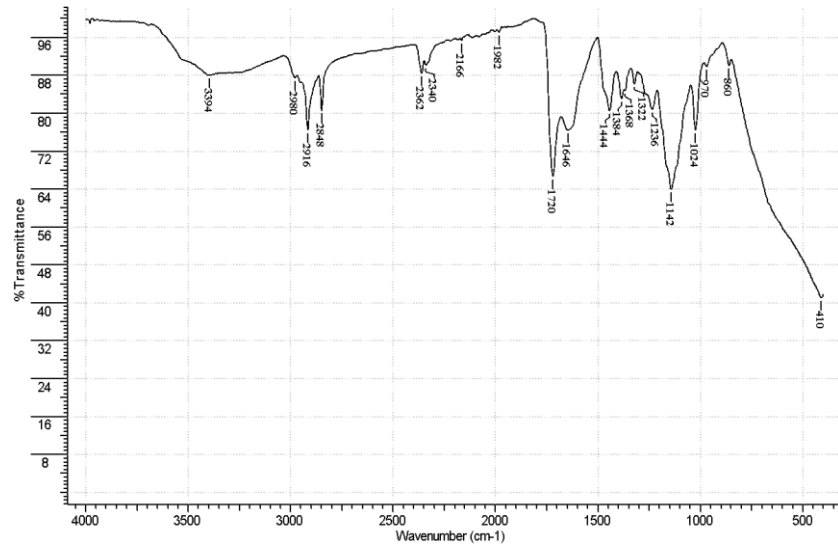
#### Espectros no IV do fragmento 5 \*F e \*V



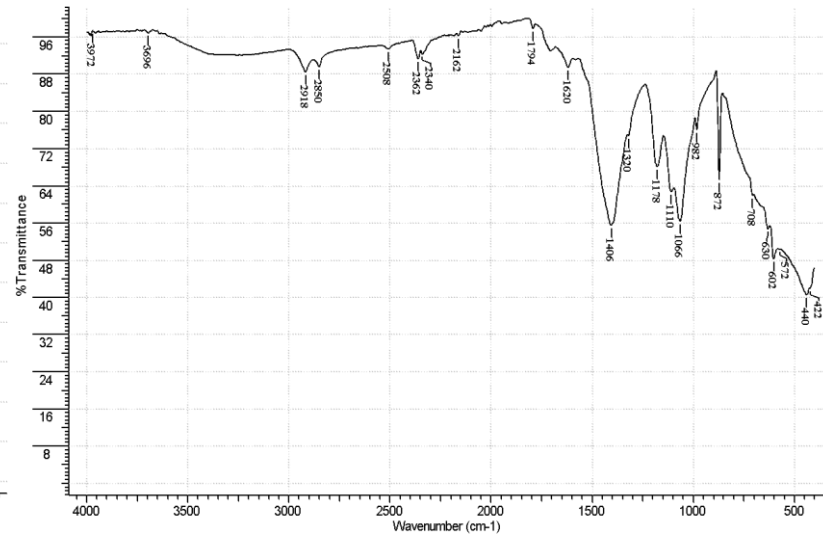
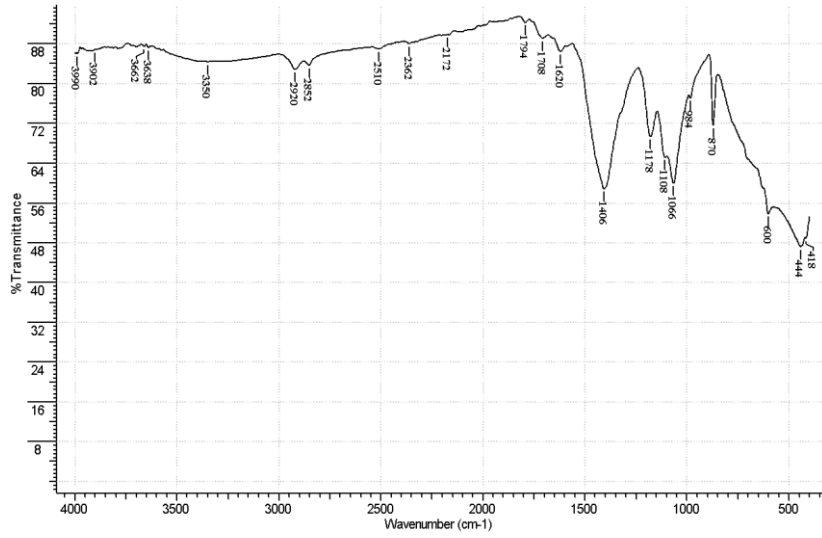
Espectros no IV do fragmento 10 \*F e \*V



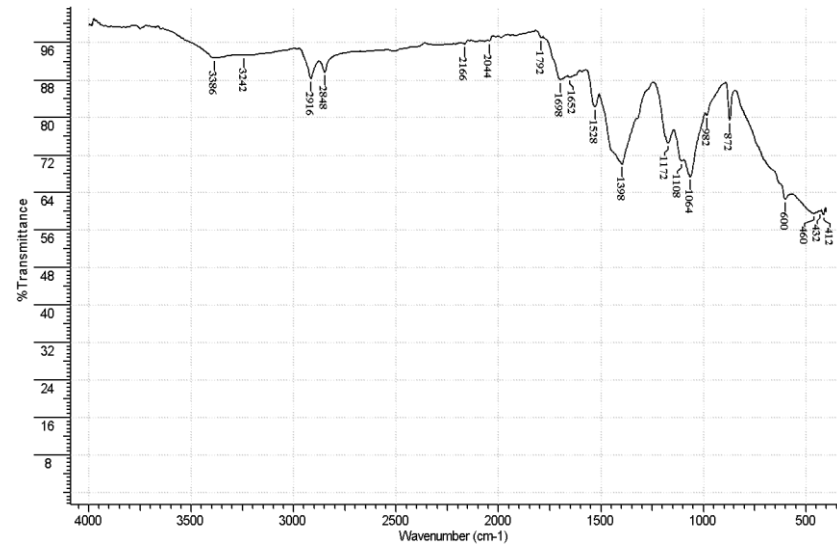
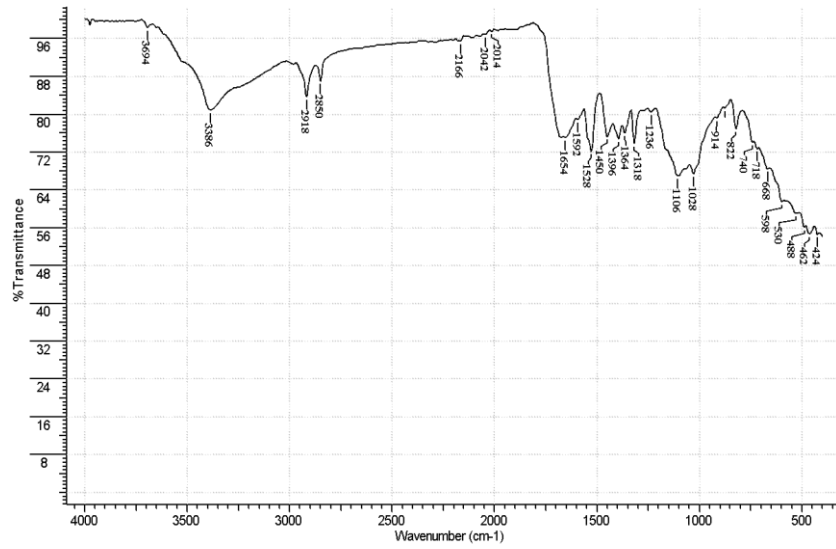
Espectros no IV do Fragmento 12 \*F e \*V



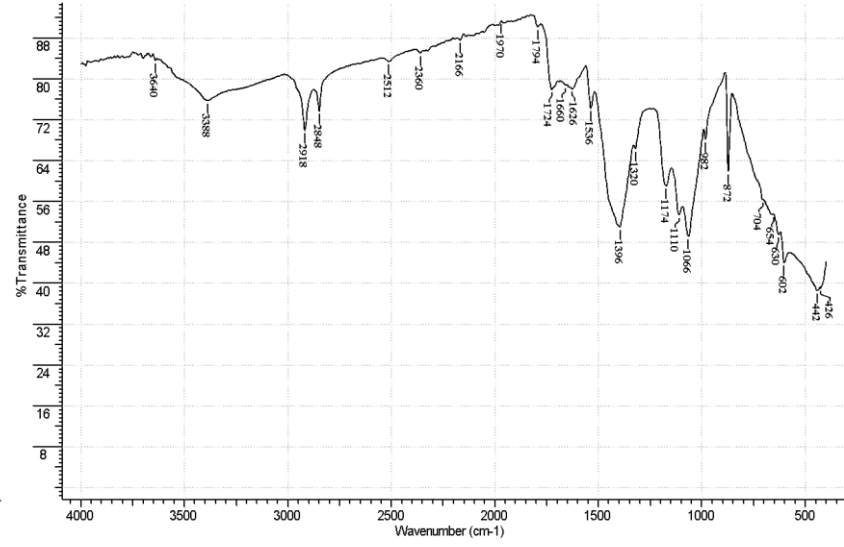
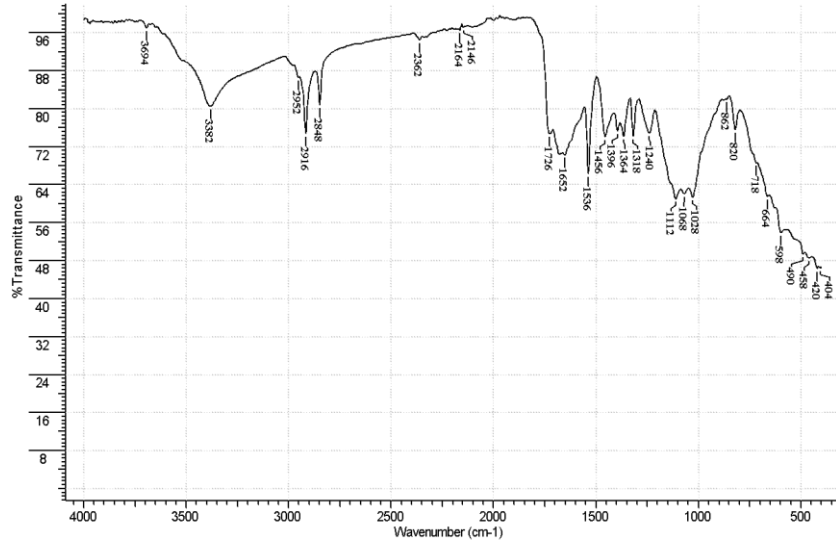
Espectros no IV do Fragmento 6 \*F e \*V



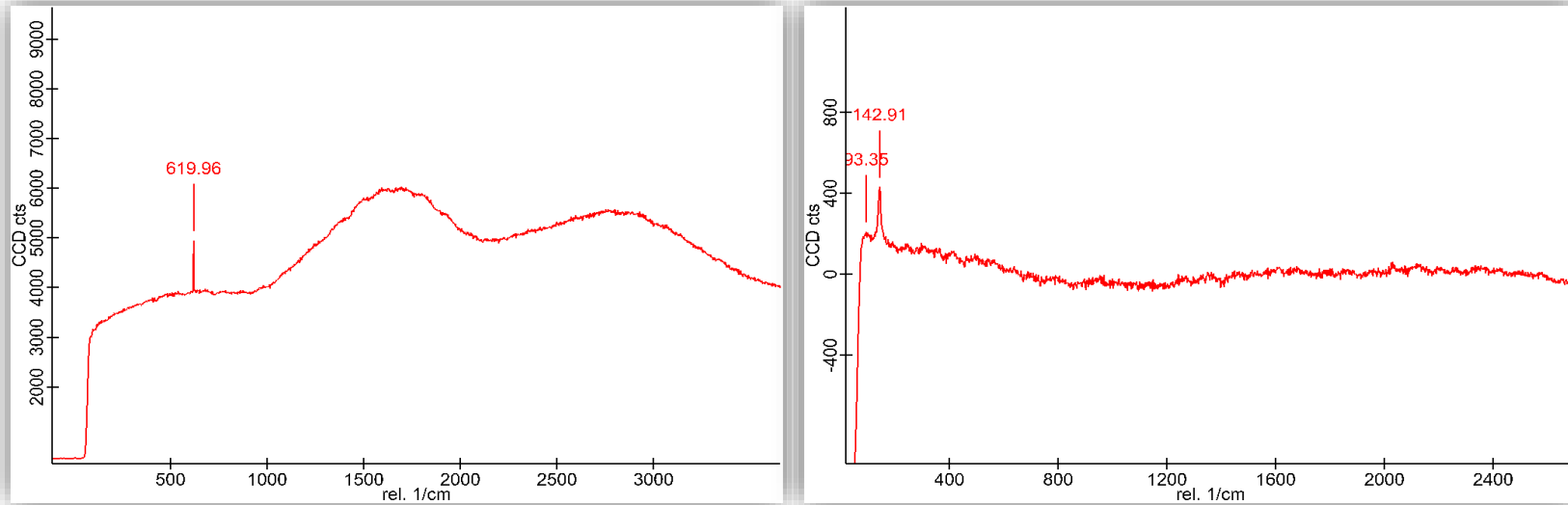
Espectros no IV do Fragmento 13 \*F e \*V



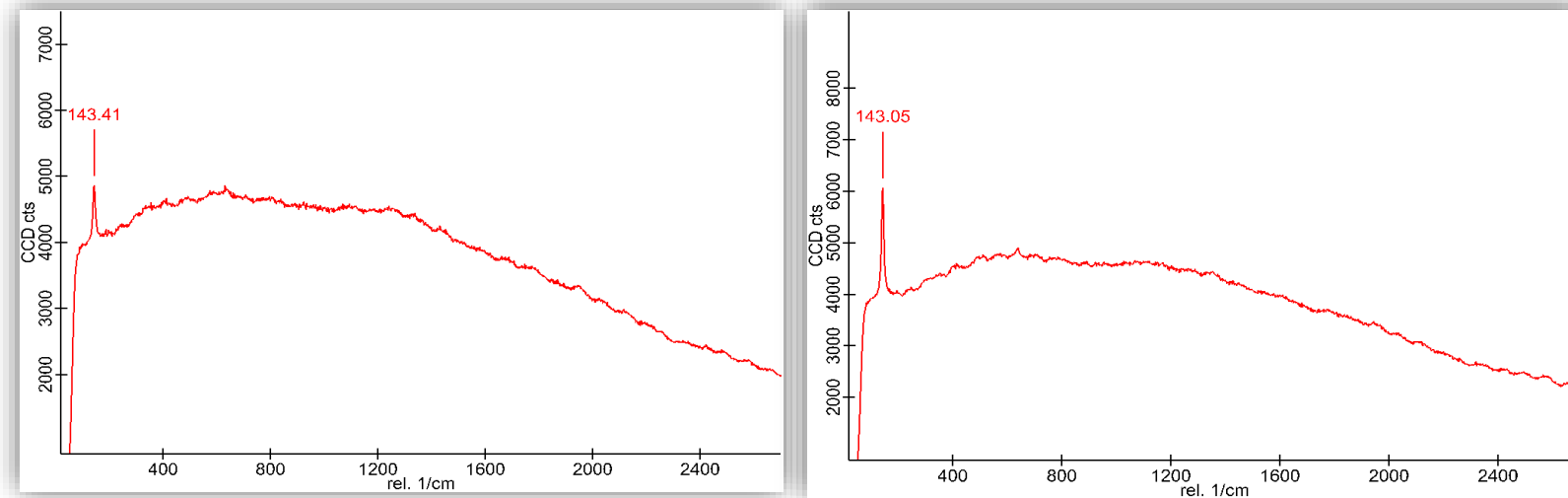
Espectros no IV do Fragmento 14 \*F e \*V



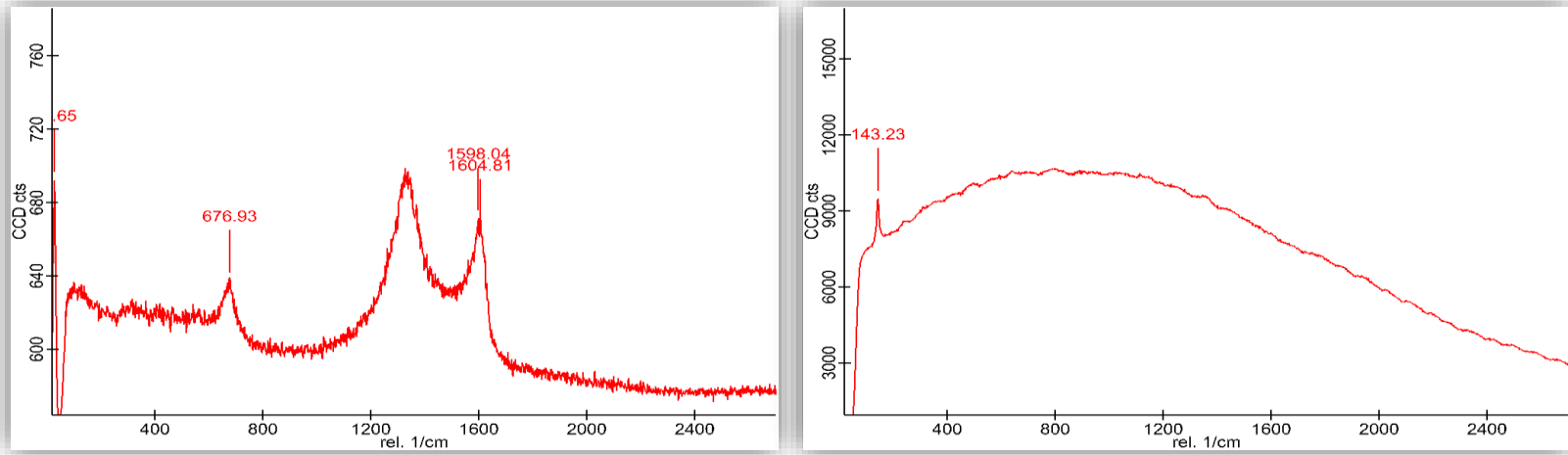
Anexo B Espectros dos fragmentos ao exame Raman  
Espectros Raman AM5 \*F e \*V



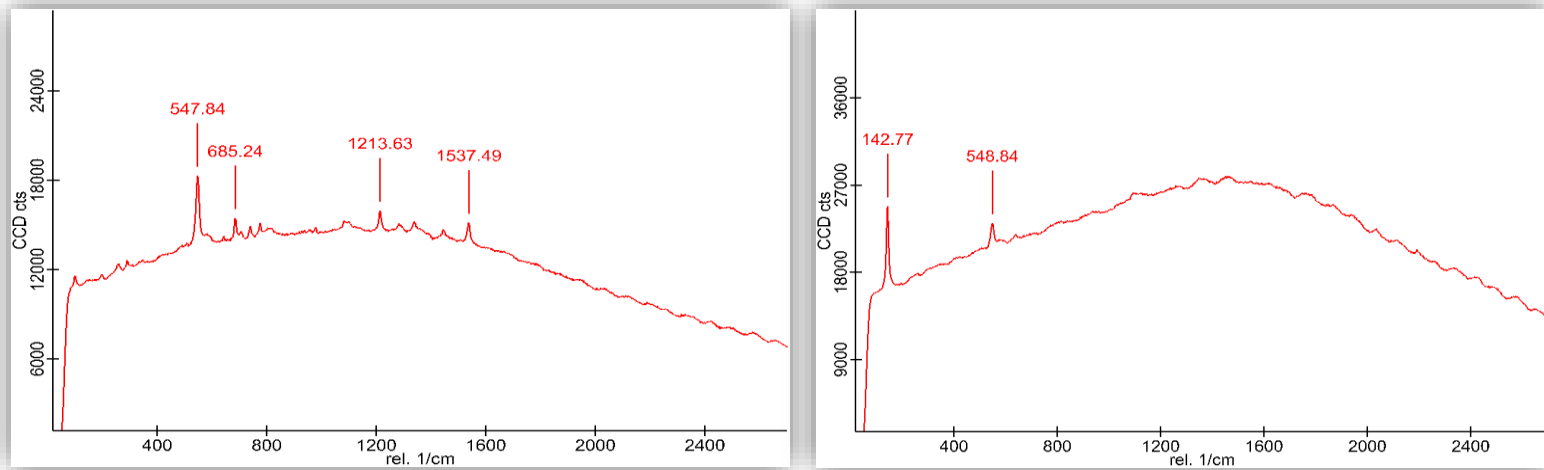
Espectros Raman AM10 \*F e \*V



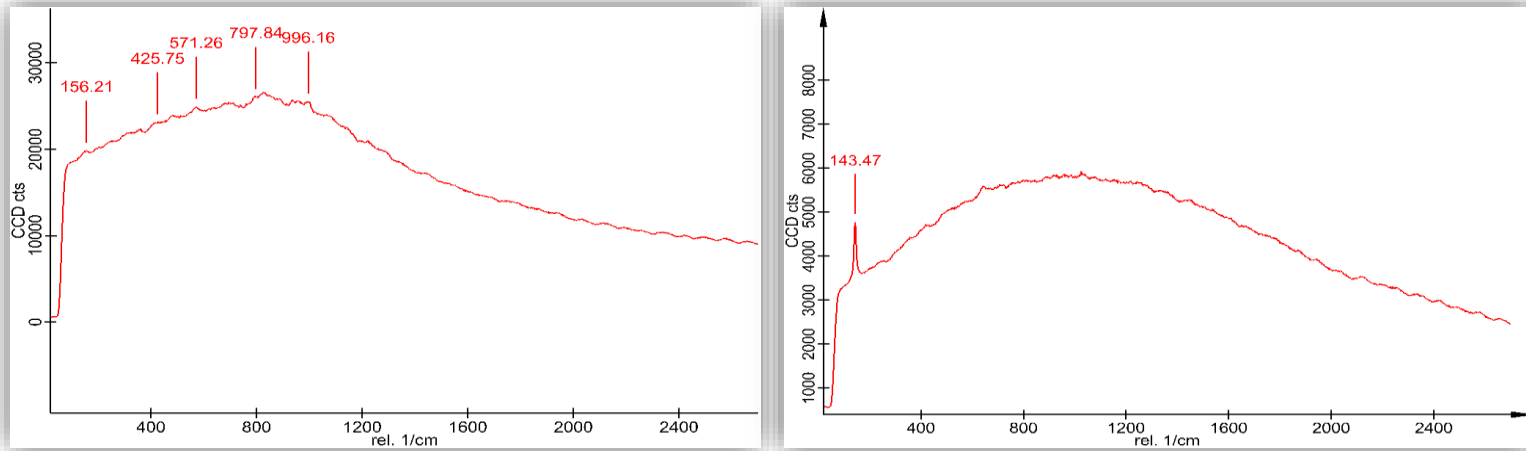
Espectros Raman AM12 \*F e \*V



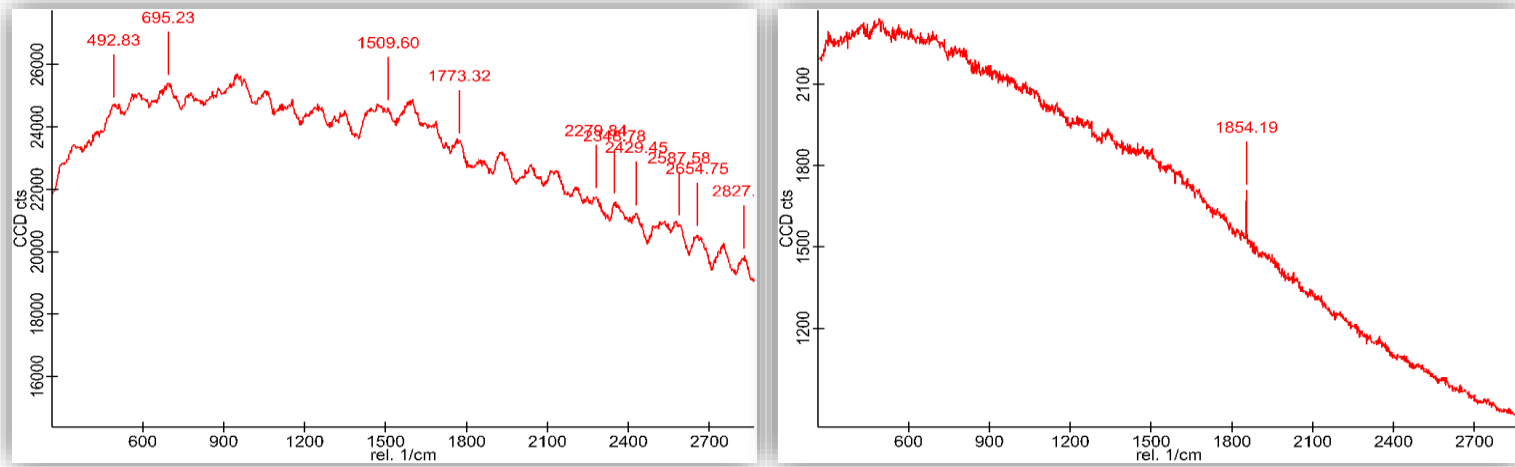
Espectros Raman AM6 \*F e \*V



Espectros Raman AM13 \*F e \*V

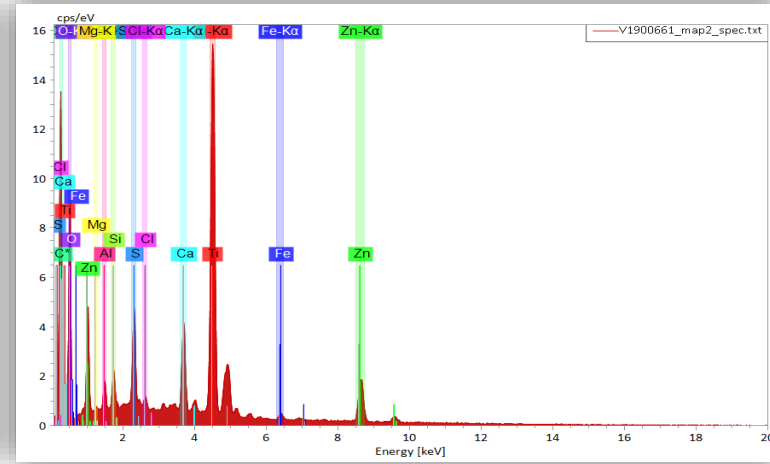
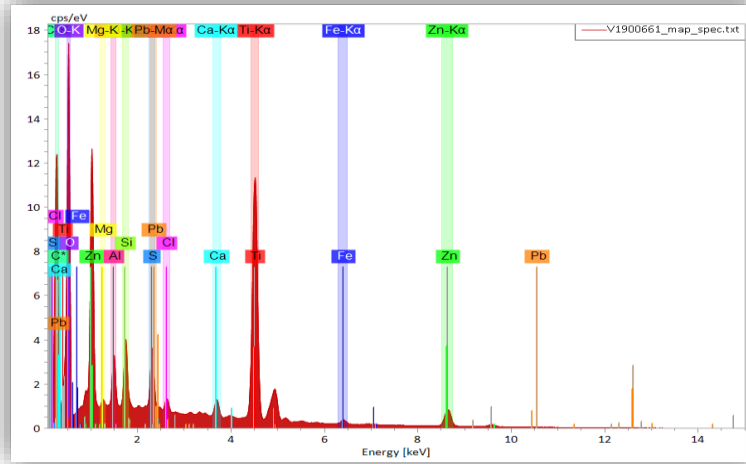


Espectros Raman AM14 \*F e \*V

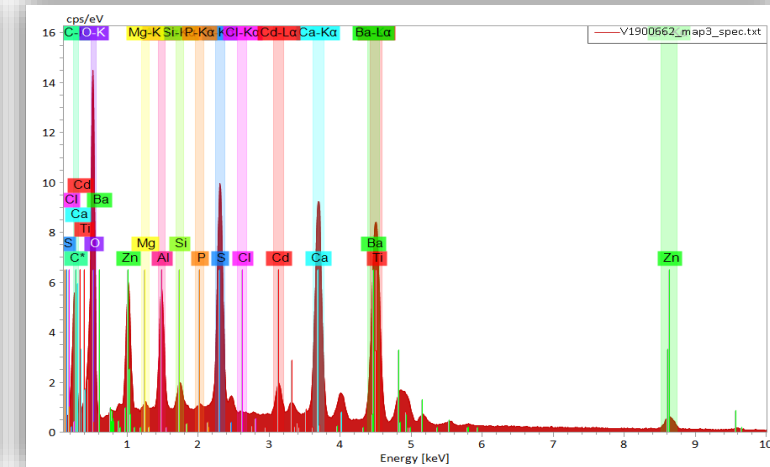
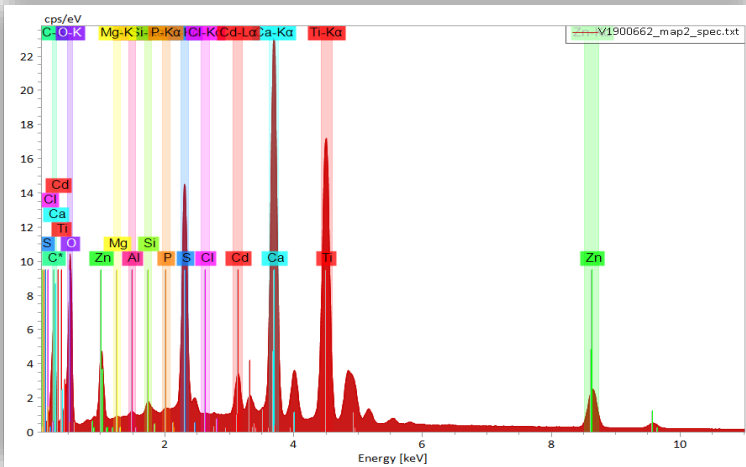


Anexo C Espectros dos fragmentos ao MEV no modo EDS

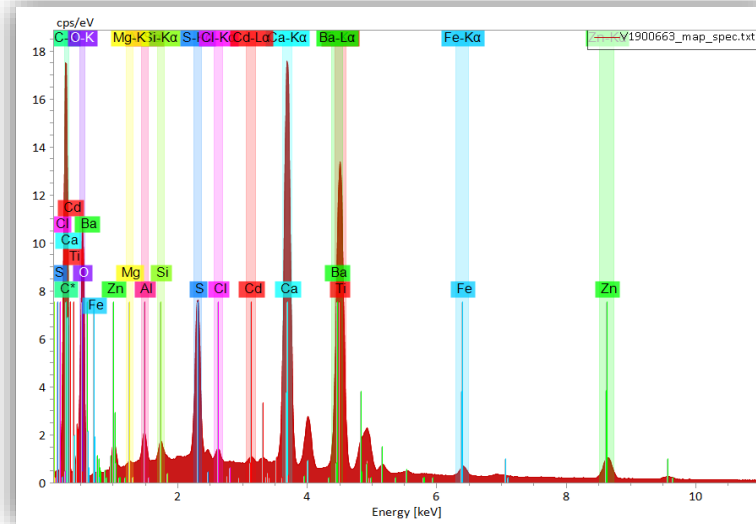
Espectros EDS AM5 \*F



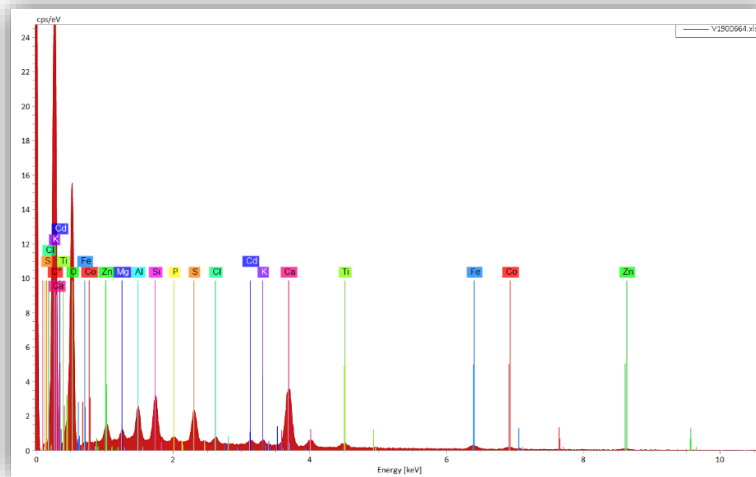
Espectros EDS AM10 \*F



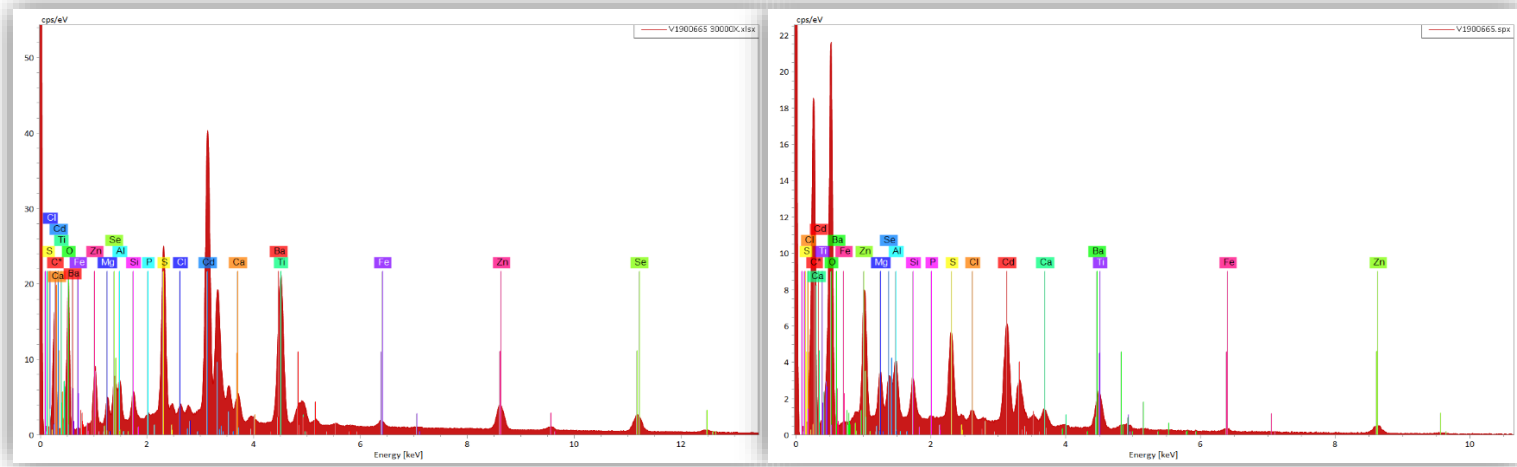
Espectros EDS AM 12\*F



Espectros EDS AM 6\*F



Espectros EDS AM13\*F



Espectros EDS AM14\*F

