



CATÓLICA
ESCOLA DAS ARTES

PORTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE
ÓLEOS ESSENCIAIS POR ENCAPSULAMENTO
EM CICLODEXTRINA.**

**Potencial de aplicação e efeitos de tratamento
em pintura a óleo.**

Maria Augusta de Magalhães Sarmiento Albuquerque da Quinta

Porto, 2016



CATOLICA
ESCOLA DAS ARTES

PORTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE
ÓLEOS ESSENCIAIS POR ENCAPSULAMENTO
EM CICLODEXTRINA.**

**Potencial de aplicação e efeitos de tratamento
em pintura a óleo.**

Maria Augusta de Magalhães Sarmiento Albuquerque da Quinta

Dissertação de Mestrado em Conservação e Restauro de Bens Culturais

Orientadora: Prof. Doutora Maria Aguiar

Co-Orientadora: Prof. Doutora Patrícia Moreira

Porto, 2016

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Maria Aguiar, por todo o apoio e estima demonstrados não só durante este projecto, mas também nos anos em que me acompanhou na Universidade.

À Prof. Doutora Patrícia Moreira, por me ter confiado este projecto que lhe é tão querido e por ter acreditado que eu estaria á altura do desafio. Por todo o apoio, paciência, dedicação e amizade sem fim.

Aos colaboradores e investigadores do Centro de Biotecnologia e Química Fina da Universidade Católica do Porto, por toda a ajuda prestada durante os ensaios deste projecto.

Ao Professor Arlindo Silva e ao Professor José Frade, pela colaboração imprescindível neste trabalho.

Ao Ricardo, pilar insubstituível da minha vida, que aceitou e apoiou incondicionalmente esta minha jornada, incentivando-me sobretudo nos momentos mais difíceis, e mostrando-me mais a cada dia a sorte que tenho em ter a meu lado uma pessoa tão incrível.

Às minhas ND, Inês, Chica e Maria, minhas irmãs de coração, por tolerarem a minha prolongada ausência, mantendo-se ainda assim sempre a meu lado.

À Maria GT, que se revelou a melhor aquisição deste mestrado, por sempre me acompanhar, ajudar e aconselhar, tornando estes últimos dois anos muito mais fáceis e leves.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por todo o apoio e amor do mundo, que me deram as bases necessárias para que fosse capaz de levar a bom porto esta fase da minha vida.

Aos Flykters, Luís, Tiago, Hélder e Duarte, por me acolherem como uma de vocês e tornarem os dias tão alegres.

Às meninas de restauro, por toda a ajuda e companheirismo durante estes dois anos intensos.

SUMÁRIO

A biodeterioração é um dos grandes factores de degradação de obras de arte, em particular por microorganismos como fungos filamentosos em variadas técnicas de pintura, incluindo pintura a óleo sobre tela. Esta dissertação teve como objectivo a realização de testes *in vitro* de inibição de crescimento de estirpes de fungos dos géneros *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Alternaria sp.*, através da volatilização de compostos antifúngicos de óleos essenciais de alfazema, sálvia e manjerição encapsulados em ciclodextrina, e de sálvia não encapsulado. Apenas foi detectada actividade anti-fúngica com a aplicação do óleo essencial não encapsulado, sendo que no geral, os resultados de inibição de crescimento com óleos encapsulados não foram significativos. Aplicou-se uma suspensão de esporos da estirpe de *Penicillium sp.* sobre provetes de pintura a óleo, para determinar a capacidade de inibição de crescimento de ciclodextrinas de óleo essencial de manjerição, mas devido a uma questão metodológica, os resultados não foram significativos. Testou-se também os efeitos dos componentes voláteis do óleo essencial não encapsulado de sálvia sobre provetes de pintura, avaliando as alterações através da colorimetria, microscopia óptica, FTIR e por inquérito social. Tais análises demonstraram haver alterações superficiais na camada cromática dos provetes, a nível de cor, brilho e superfície, não tendo sido detectadas alterações mais profundas na análise por FTIR. Apesar dos resultados obtidos, ficou patente o potencial de aplicação dos óleos essenciais na inibição da biodeterioração em pintura a óleo.

ABSTRACT

One of the main factors of the degradation of art work is biodeterioration, by microorganisms as filamentous fungi in various painting techniques, including oil painting on canvas. This project intended to evaluate the effect on the growth of selected fungal strains, namely *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* and *Alternaria sp.*, through volatilization of antifungal compounds in essential oils, extracted from lavender, sage and basil encapsulated in cyclodextrin, as well as non-encapsulated sage. Antifungal activity was detected only in the application of non-encapsulated essential oil, and overall, the results of growth inhibition with encapsulated oils were not considerable. A suspension of spores from the strain of *Penicillium sp.* was placed over the mock paintings, to determine the growth inhibition ability of encapsulated basil essential oil, but due to a methodological matter, the results were not significant. Also, the effects of the volatile components of non-encapsulated sage essential oil were tested on the mock paintings, and the changes were evaluated by colorimetry, optical microscopy, FTIR and social inquiry. Such analyses have shown there are superficial changes in the chromatic layer, but no deeper changes were detected by FTIR analysis. Despite the results obtained, the potential application of essential oils for biodeterioration inhibition in oil painting was patent.

INDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	1
I. INTRODUÇÃO	4
II. MATERIAIS E METODOLOGIAS	15
1. PROVETES DE PINTURA A ÓLEO	15
1.1. Materiais constituintes dos provetes	15
1.1.1. Suporte	15
1.1.2. Aglutinante	15
1.1.3. Pigmentos	17
1.1.4. Verniz	20
1.2. Preparação dos provetes	22
1.3. Envelhecimento artificial dos provetes	24
1.3.1. Secagem dos provetes	24
1.3.2. Envelhecimento Foto-Hidrotérmico	24
1.3.3. Envelhecimento com luz ultravioleta (UV)	27
2. FUNGOS FILAMENTOSOS	29
2.1. Estirpes Fúngicas	29
2.1.1. <i>Aspergillus versicolor</i>	29
2.1.2. <i>Penicillium chrysogenum</i>	30
2.1.3. <i>Alternaria alternata</i>	31
3. OLEOS ESSENCIAIS ENCAPSULADOS EM CICLODEXTRINA	32
3.1. Óleos essenciais	32
3.1.1. Alfazema (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.)	32
3.1.2. Sálvia (<i>Salvia officinalis</i>)	32
3.1.3. Manjerição (<i>Ocimum basilicum</i>)	33
3.2. Ciclodextrina	34
4. ENSAIOS LABORATORIAIS	36
4.1. Protocolos	36
4.1.1. Efeito dos voláteis do óleo essencial de sálvia em provetes de pintura a óleo	36
4.1.1.1. Análise de alterações dos provetes	36

4.1.2. Crescimento fúngico na presença de óleos essenciais encapsulados em ciclodextrina_.....	39
4.1.3. Crescimento fúngico sobre provetes de pintura na presença de óleo essencial encapsulado em ciclodextrina	41
III. ANÁLISE DE RESULTADOS	42
1. Efeito dos compostos voláteis do óleo essencial de sálvia na superfície de provetes de pintura	42
1.1. Análise por colorimetria	42
1.2. Análise por Microscopia Óptica	43
1.3. Avaliação de alterações visíveis a olho nu por inquérito	45
1.4. Cruzamento e discussão de resultados	50
1.4.1. Análise por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	52
2. Reactivação das estirpes fúngicas	53
3. Crescimento fúngico na presença de óleos essenciais encapsulados em ciclodextrina_.....	57
4. Crescimento fúngico sobre provetes de pintura na presença de óleo essencial encapsulado de manjerição em ciclodextrina	60
IV. CONCLUSÃO	65
FONTES COMPUTORIZADAS E BIBLIOGRAFIA	67
APENDICES	78

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de disposição das faixas de cor nos provetes.

Figura 2 - Exemplo de provete de pintura dentro da placa de Petri.

Figura 3 - Vista geral da sala durante o inquérito (A). Pormenor da mesa com os grupos de provetes (B).

Figura 4 - Exemplo de aplicação de H₂O na proximidade das ciclodextrinas (A); Exemplo de H₂O em contacto com as ciclodextrinas (B).

Figura 5 - Observação por microscopia óptica da amostra de negro de ossos do grupo B. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

Figura 6 - Observação por microscopia óptica da amostra de ocre amarelo do grupo B. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

Figura 7 - Observação por microscopia óptica da amostra de ocre amarelo do grupo C. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

Figura 8 - Observação por microscopia óptica da amostra de vermelhão do grupo C. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

Figura 9 - Avaliação quantitativa de alteração na cor: valores médios e respectivo desvio-padrão (A). Avaliação do tipo de alteração observado e respectiva zona de cor em cada grupo de provetes (B) (C) (D).

Figura 10 - Avaliação quantitativa de alteração na superfície: valores médios e respectivo desvio-padrão (A). Avaliação do tipo de alteração observado e respectiva zona de cor em cada grupo de provetes (B) (C) (D).

Figura 11 - Avaliação quantitativa de alteração no brilho: valores médios e respectivo desvio-padrão (A). Avaliação do tipo de alteração observado e respectiva zona de cor em cada grupo de provetes (B) (C).

Figura 12 - Espectros de FTIR do negro de ossos do grupo B. Duplicados de teste (B1 e B2) e controlo (B3).

Figura 13 - Espectros de FTIR do vermelhão do grupo C. Duplicados de teste (C1 e C2) e controlo (C3).

Figura 14 - Espectros de FTIR do ocre amarelo (grupo C). Duplicados de teste (C1 e C2) e controlo (C3).

Figura 15 - Crescimento das estirpes fúngicas seleccionadas a 30° C em PDA.

Figura 16 - Crescimento das estirpes fúngicas seleccionadas a 25° C em PDA.

Figura 17 - Crescimento de *Penicillium chrysogenum*, em PDA, na presença de ciclodextrinas (CD) e óleo essencial (OE) de sálvia.

Figura 18 - Crescimento de *Aspergillus versicolor*, em PDA, na presença de ciclodextrinas (CD).

Figura 19 - Crescimento de *Alternaria alternata*, em PDA, na presença de ciclodextrinas (CD).

Figura 20 - Registo fotográfico no momento de incubação do inoculo da estirpe de *Penicillium chrysogenum* sobre os provetes do grupo C, na presença de ciclodextrina de óleo essencial de manjeriço. Placas de teste (A e B) e placas de controlo (C e D).

Figura 21 - Registo fotográfico após 168 horas de incubação do inóculo da estirpe de *Penicillium chrysogenum* sobre os provetes do grupo C, na presença de ciclodextrina de óleo essencial de manjeriço. Placas de teste (A e B) e placas de controlo (C e D).

Figura 22 - Microscopia óptica de Negro de Ossos. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Figura 23 - Microscopia óptica de Vermelhão. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Figura 24 - Microscopia óptica de Ocre Amarelo. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Figura 25 - Microscopia óptica de Negro de Ossos. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Figura 26 - Microscopia óptica de Vermelhão. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Figura 27 - Microscopia óptica de Ocre Amarelo. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Figura 28 – Divisão por grupos etários da avaliação quantitativa de alteração na cor: valores médios e respectivo desvio-padrão.

Figura 29 - Divisão por área profissional da avaliação quantitativa de alteração na cor: valores médios e respectivo desvio-padrão.

Figura 30 - Divisão por grupos etários da avaliação quantitativa de alteração na superfície: valores médios e respectivo desvio-padrão.

Figura 31 - Divisão por área profissional da avaliação quantitativa de alteração na superfície: valores médios e respectivo desvio-padrão.

Figura 32 - Divisão por grupos etários da avaliação quantitativa de alteração no brilho: valores médios e respectivo desvio-padrão.

Figura 33 - Divisão por área profissional da avaliação quantitativa de alteração no brilho: valores médios e respectivo desvio-padrão.

Figura 34 - Espectros de Ftir do negro de ossos (grupo B). Duplicados de teste (A, B, C, D).

Figura 35 - Espectros de Ftir do negro de ossos (grupo B). Duplicados de controlo (A, B).

Figura 36 - Espectros de Ftir do vermelhão (grupo C). Duplicados de teste (A, B, C, D).

Figura 37 - Espectros de Ftir do vermelhão (grupo C). Duplicados de controlo (A, B).

Figura 38 - Espectros de Ftir do ocre amarelo (grupo C). Duplicados de teste (A, B, C, D).

Figura 39 - Espectros de Ftir do ocre amarelo (grupo C). Duplicados de controlo (A, B).

Figura 40 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Figura 41 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Figura 42 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Figura 43 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Figura 44 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

TABELAS

Tabela 1 - Valores ΔE^* representativos da variação total da cor (e respectivo desvio-padrão) dos provetes expostos ao óleo essencial de sálvia.

Tabela 2 - Cruzamento de resultados das técnicas analíticas realizadas.

Tabela 3 – Taxa média calculada de crescimento TMC (mm/h) das estirpes fúngicas na presença de compostos voláteis de óleo essencial encapsulado (CD) e não encapsulado (OE), e respectivas percentagens de inibição (% inib.) de crescimento calculadas.

Tabela 4 - Crescimento da estirpe fúngica *Penicillium chrysogenum* sobre provetes de pintura na presença de óleo essencial de manjerição encapsulado em ciclodextrina.

Tabela 5 - Medição de intensidade luminosa.

Tabela 6 - Valores $L^*a^*b^*$ do negro de ossos do grupo B.

Tabela 7 - Valores $L^*a^*b^*$ do vermelhão do grupo C.

Tabela 8 - Valores $L^*a^*b^*$ do ocre amarelo do grupo C.

I. INTRODUÇÃO

O conceito de conservação preventiva de obras de arte define-se como a protecção de um objecto, ou um grupo de objectos, de diversos riscos¹, ou seja, como um conjunto de acções destinadas a aumentar a esperança de vida de uma obra de arte. É uma componente importante na gestão de colecções de um museu, criando e mantendo condições protectoras para os objectos, seja em exposição, em reserva ou em trânsito². As pinturas que chegaram aos dias de hoje estão em grande parte albergadas em museus, quer expostas ao público, quer armazenadas em salas de acesso restrito conhecidas como reservas. Os museus têm como missão partilhar conhecimento sobre as obras que detêm, assim como garantir a sua preservação ao longo dos tempos.

De facto, muitas obras de arte pertencentes a um museu passam a maior parte da sua existência nas salas de reserva onde, idealmente, o ambiente é favorável à prevenção de riscos³, sendo locais onde a conservação preventiva ocorre activamente. A preocupação mais consciente de preservação dos objectos desenvolveu-se no ultimo século, sobretudo através dos conservadores-restauradores. Estes, há cem anos atrás, eram apenas vistos como restauradores, com o papel de reparar e reconstituir obras, mas após se terem apercebido da necessidade de prevenir danos e riscos, passaram a aplicar determinadas metodologias dirigidas à colecção, como um todo, dando origem ao conceito de conservação preventiva⁴. A par desta noção, surgiu também o princípio da intervenção mínima no âmbito do restauro, que em conjunto foram extremamente

¹ DESVALLÉES, A., & MAIRESSE, F. (2010). *Key concepts of museology*. Armand Colin.

² LEWIS, G. (2004). *The role of museums and the professional code of ethics*. Em ICOM/UNESCO., *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM- International Council of Museums. pp. 9.

³ LADKIN, N. (2004). *Collections management*. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook* . Paris: ICOM- International Council of Museums. pp. 24.

⁴ MICHALSKY, S. (2004). *Care and Preservation of Collections*. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 57.

importantes para a salvaguarda de obras de arte, nomeadamente de pinturas. Danos escusáveis e, por vezes, irreversíveis, eram evitados, formando a consciência de que, como afirma Alarcão, “a autenticidade de um bem cultural é inversamente proporcional ao número de intervenções a que foi sujeito”⁵.

Historicamente, o tema da conservação preventiva deu os seus primeiros passos, como uma preocupação mais consciente e generalizada, no século XIX, havendo em 1888 registos de estudos realizados por Russell e Abney sobre os efeitos da luz artificial em aguarelas⁶. Apesar de se notar uma evolução neste campo durante os anos que se seguiram (sobretudo potenciada pela extrema poluição que se fazia sentir em Londres), esta foi pouco significativa. Foi já na década de 1970 que Garry Thomson, conhecido como grande impulsionador desta vertente da conservação, referiu a importância de controlar o meio ambiente num espaço museológico para preservação das colecções⁷. Ainda assim, o termo - conservação preventiva - só mais tarde começou a ser usado com Gäel de Guichen⁸, quando em 1995 afirmou que:

*“Where yesterday one saw objects, today one should see collections. Where one saw rooms, one should see buildings. Where one saw a person, one should see teams. Where one saw short-term expenditure, one should see long-term investment. Where one saw day-to-day actions, one should see programme and priorities. Preventive conservation means taking out a life insurance for museum collections”*⁹.

⁵ ALARCÃO, C. (2007). *Prevenir para preservar o património museológico*. Faro: Museal: Revista do Museu Municipal de Faro, nº2.

⁶ BROMMELLE, N. (1964). *The Russell and Abney report on the action of light on water colours*. Studies in Conservation, vol. 9, nº 4. pp. 140-152.

⁷ LOPES, A. (2011). *Conservação preventiva: construção de uma "checklist" aplicada às áreas de exposição e reservas*. Lisboa: Dissertação de mestrado em Museologia da Universidade Nova de Lisboa. pp. 9.

⁸ ALARCÃO, C. (2007). *Prevenir para preservar o património museológico*. Faro: Museal: Revista do Museu Municipal de Faro, nº2.

⁹ GUICHEN, G. (1995). *La conservation préventive: un changement profond de mentalité*. Cahiers d'Étude, ICOM-CC. pp. 4-6.

Apesar disto, o próprio reconhece que já no século XIX Adolphe Napoléon Didron¹⁰ terá escrito “*Conservar o mais possível, reparar o menos possível, não restaurar a qualquer preço*”¹¹. Mais recentemente, Stefan Michalsky tem-se destacado, dedicando grande atenção à prática da conservação preventiva e à minimização da degradação de obras de arte em museus. A sua vasta lista de publicações foca-se, entre outras temáticas, em torno da problemática da preservação^{12,13}, da iluminação^{14,15,16} e das condições climáticas em museus¹⁷.

Graças a estes impulsionadores, nos dias que correm, existe uma consciência de conservar, que deve partir não só do conservador e do curador de um museu, mas de todos os intervenientes directos e indirectos do espaço museológico, tais como o director do museu, o arquitecto e o conservador-restaurador, bem como educadores e guias, que têm o papel fundamental de transmitir ao público em geral esta consciência de preservação do património¹⁸. Apesar de dependerem de factores geográficos e museológicos, existem já metodologias e objectivos

¹⁰ Adolphe Napoléon Didron foi um historiador, iconógrafo e arqueólogo, que dedicou o seu trabalho a encontrar um equilíbrio entre a arquitectura contemporânea e achados arqueológicos. Tal como Augustus Pugin e Viollet-le-Duc, o seu trabalho levantou a questão de uma possível apreciação da arquitectura medieval e da herança cultural. Os seus esforços (ao contrário de Viollet-le-Duc), resultaram numa diminuição de restauro arquitectónico excessivo. Apesar disso, a adopção de uma nova arquitectura baseada no estudo exacto das heranças passadas não foi tao bem-sucedida. (In <https://dictionaryofarthhistorians.org/didrona.htm>)

¹¹ GUICHEN, G. (1995). *La conservation préventive: un changement profond de mentalité*. Cahiers d'Étude, ICOM-CC. pp. 4-6.

¹² MICHALSKY, S. (2004). Colletion preservation. Em ICOM-UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 51-90.

¹³ MICHALSKY, S. (2007). *The Ideal Climate, Risk Management, the ASHRAE Chapter, Proofed Fluctuations, and Toward a Full Risk Analysis Model*. Participação no "Experts' Roundtable on Sustainable Climate Management Strategies" em Tenerife, Spain.

¹⁴ MICHALSKY, S. (1987). *Damage to Museum Objects by Visible Radiation (Light) and Ultraviolet Radiation (UV)*. Londres: Museums Association, UKIC, and Group of Designers and Interpreters for Museums. pp. 3-16.

¹⁵ MICHALSKY, S. (1997). *The lighting desision*. Ottawa: em, Fabric of an Exhibition, Preprints of Textile Symposium 97. pp. 97-104.

¹⁶ MICHALSKY, S. (s.d.). *Agent of Deterioration: Light, Ultraviolet and Infrared*. Canadian Conservation Institute. Disponível em <http://canada.pch.gc.ca/eng/1444925073140>.

¹⁷ MICHALSKY, S. (2011). *Museum climate and global climate: Doing the right thing for both*. in Reflections on Conservation. pp. 9-11.

¹⁸ ALARCÃO, C. (2007). *Prevenir para preservar o património museológico*. Faro: Museal: Revista do Museu Municipal de Faro, nº2.

definidos para uma regulação internacional dos parâmetros de conservação preventiva de colecções, propostos por organismos internacionais como o *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers* (ASHRAE), *Canadian Conservation Institute* (CCI), *Getty Conservation Institute* (GCI) e o *International Council of Museums* (ICOM), entre outros, cujas comissões de trabalho desenvolvem vários tipos de actividades e publicações de artigos e normas, contribuindo assim para a evolução da área da conservação preventiva.

De uma forma geral, uma grande parte destas publicações dedica-se à questão da realização e aplicação de um plano de avaliação de risco das colecções museológicas¹⁹, isto é, um plano de estratégico de diminuição do risco de degradação ou perda de valor de um objecto (ou conjunto de objectos) pertencentes a um museu, seja em exposição, em reserva ou em transit^{20,21,22}. A avaliação de riscos consiste na identificação de factores presentes num determinado espaço (museu, biblioteca ou arquivo) que podem influenciar ou contribuir para a degradação activa de bens culturais, após a qual é necessário fazer uma gestão dos riscos e criar soluções²³. O conhecimento detalhado das situações possibilita a avaliação dos possíveis riscos, devendo-se considerar vários factores de degradação, como o ambiente, a iluminação e as pragas.

As pragas (ou pestes), e mais especificamente a acção dos microrganismos, são uma constante preocupação aquando da preservação de obras de arte, sobretudo

¹⁹ MICHALSKY, S. (2004). Care and Preservation of Collections. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 57.

²⁰ FRANCE, F. (2009). *Best practice and standards in environmental preservation for cultural heritage institutions: goals, knowledge, gaps*. Advances in Paper Conservation Research. pp. 16-26.

²¹ VODOPIVEC, J. (2008). *Preservation Management in archives*. Ljubljana: European Board of National Archivists.

²² PAVLOGEORGATOS, G. (2003). *Environmental parameters in museums*. Building and Environment nº 38. pp. 1457–1462.

²³ VODOPIVEC, J. (2008). *Preservation and risk assessment in archival depos*. Trieste: Atlanti, vol. 18. pp. 181-186.

de pintura^{24,25,26}. Este cenário é comum em espaços não institucionais, e também em acervos museológicos que, muitas vezes por falta de meios económicos^{27,28}, não dispõem de divisões de exposição e reserva devidamente preparadas para a correcta preservação das obras.

Na década de 2000 foi criado um Grupo de Trabalho de Controlo Integrado de Pestes (IPM-WG)²⁹. O conceito de controlo de pestes diz respeito à regulação ou gestão de um grupo de espécies consideradas prejudiciais para a saúde do ser humano e para o bem-estar de obras de arte. Este grupo de espécies abrange os roedores (como ratos e ratazanas), insectos, pássaros (como pombos, corvos ou morcegos)³⁰ e microorganismos. A gestão de pestes implica que seja feito um delineamento de estratégias de actuação e gestão de riscos, que aumentam a capacidade de prevenir e actuar correctamente. Tendo sido desenvolvido a par da avaliação de riscos, mostra-se como um guia de gestão de ataques de pestes nas colecções e divide-se em quatro fases principais, sendo elas prevenção, monitorização, identificação e actuação³¹. No que diz respeito à presença de microorganismos num contexto museológico, as estratégias de prevenção da biodeterioração incidem, sobretudo, no controlo do ambiente, nomeadamente

²⁴ LOPEZ-MIRAS, M., PIÑAR, G., ROMERO-NOGUERA, J., & et. al. (2012). *Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potencial*. In *Aerobiologia*, pp. 1-13. Obtido de www.springerlink.com

²⁵ MIRONESCU, M., & GEORGESCU, C. (2010). *Activity of some essential oils against comon spoilage fungi of buildings*. In *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food technology* vol XIX nº2, pp. 41-46.

²⁶ PANER, C. (2012). *Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the universe of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences*. In *Prime Journal of Microbiology Research* vol. 2, pp. 114-120.

²⁷ DICUS, D. (2013). *One Response to a Collection-Wide Mold Outbreak: How Bad can it be—How Good can it Get?* *Journal of the American Institute for Conservation*, vol. 39, nº1. pp. 85-105.

²⁸ PANER, C. (2012). *Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the universe of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences*. *Prime Journal of Microbiology Research* vol. 2, pp. 114-120.

²⁹ Grupo formado na sua maioria por vários conservadores-restauradores, curadores de museus, etimologistas, entre outros, sendo um projecto apoiado por instituições como o *American Institute for Conservation* (AIC) e *Society for the Preservation of Natural History Collections* (SPNHC).

³⁰ Geralmente os morcegos não são considerados pestes, mas regra geral são portadores de doenças e os seus excrementos atraem outras pestes, criando-se um ciclo perigoso para os materiais das obras de arte e para as pessoas.

³¹ <http://museumpests.net>

sobre a luz, humidade relativa e temperatura, entre outros³². Estudos recentes^{33,34} reforçam estas ideias, como por exemplo Sterflinger³⁵, que defende que haja um contínuo controlo climático, aliado a limpezas sistemáticas dos espaços e uma constante monitorização das obras.

A herança cultural mostra-se então como um nicho ecológico com componentes químicos, que podem ser explorados por uma enorme variedade de microorganismos³⁶. A biodeterioração é um dos grandes factores de degradação de obras de arte, em particular por fungos, que têm capacidade para subsistir em variadas técnicas de pintura, incluindo a de óleo sobre tela³⁷. O facto de estas conterem materiais orgânicos na sua composição, tais como suportes celulósicos, colas de origem animal ou aglutinantes vegetais, aliado a condições ambientais não controladas, (humidade relativa, temperatura, luz), faz com que os microorganismos disponham de condições ideais de crescimento e de reprodução³⁸. Nas últimas décadas tem-se assistido a grandes desenvolvimentos na tentativa de erradicação e de prevenção do crescimento de microorganismos nas obras de arte. A partir da década de 1950 realizaram-se as primeiras conferências nacionais e internacionais no sentido de determinar a extensão deste problema e, assim estruturar um conjunto de soluções organizadas e sensatas de prevenção e de actuação perante obras afectadas por microorganismos³⁹.

³² FERNANDES, P. (2007). *A biotecnologia na conservação do património cultural*. Revista Lusófona de Arquitectura e Educação nº2. pp. 119-126.

³³ KOESTLER, R., KOESTLER, V., CHAROLA, A., & et. al. (2003). *(2003) Art, biology and conservation: biodeterioration of works of art*. Nova Iorque: The Metropolitan Museum of Art.

³⁴ DICUS, D. (2013). *One Response to a Collection-Wide Mold Outbreak: How Bad can it be—How Good can it Get?* Journal of the American Institute for Conservation, vol. 39, nº1. pp. 85-105.

³⁵ STERFLINGER, K. (2010). *Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage*. Fungal Biology Reviews, nº 24. pp. 47-55.

³⁶ CAPPITELLI, F., & SORLINI, C. (2008). *Microorganisms Attack Synthetic Polymers in Items Representing Our Cultural Heritage*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 74, nº . pp. 564-569.

³⁷ RAVIKUMAR, H. R., RAO, S. S., & KARIGAR, C. S. (2012). *Biodegradation of paints: a current status*. Indian Journal of Science and Technology, vol. 5, nº 1. pp. 1977-1987.

³⁸ LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. (2013). *Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration*. Plos One, vol. 8, pp. 1-13.

³⁹ CIFERRI, O., TIANO, P., & MASTROMEI, G. (2000). *Of microbes and art : the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Das várias espécies de fungos passíveis de colonizar uma pintura, as de identificação mais comum pertencem aos géneros *Aspergillus sp.*^{40,41}, *Penicillium sp.*^{42,43} e *Alternaria sp.*^{44,45}. Os ataques fúngicos produzem transformações químicas e físicas sobre os materiais constituintes de uma pintura, uma vez que contêm enzimas que catalisam as composições da matéria orgânica e produzem durante o seu metabolismo um conjunto de ácidos orgânicos^{46,47}. Os danos causados são numerosos e, geralmente, manifestam-se a nível estético (pigmentação, manchas, patines, biofilme, etc.) e estrutural (estalados, desagregação da pintura do suporte, desaparecimento de material por digestões enzimáticas, entre outros)⁴⁸. Dois factores, altamente responsáveis pela proliferação de microrganismos em obras de arte são a natureza química do substrato (disponibilidade de nutrientes) e as condições ambientais a que estão expostas⁴⁹. Os fungos têm a capacidade de se alimentar de celulose, proteínas, amidos e pó, nutrientes que se encontram presentes nos materiais que constituem

⁴⁰ VUKOJEVIC, J., & GRBIC, M. (2010). *Moulds on paintings in Serbian fine arts museums*. African Journal of Microbiology Research. vol. 4. pp. 1453-1456.

⁴¹ CIFERRI, O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, nº3, pp. 879-885.

⁴² LOPEZ-MIRAS, M.; PIÑAR, G; ROMERO-NOGUERA, J.; et. al. (2012). Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential. *Aerobiologia*. pp. 1-13.

⁴³ LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. (2013). Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration. *Plos One*, vol. 8, pp. 1-13.

⁴⁴ STERFLINGER, K. (2010). *Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage*. Fungal Biology Reviews, nº 24. pp. 47-55.

⁴⁵ INOUE, M., & KOYANO, M. (1991). *Fungal contamination of oil paintings in Japan*. International Biodeterioration, nº 28. pp. 23-35.

⁴⁶ STERFLINGER, K. (2010). *Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage*. Fungal Biology Reviews, nº 24. pp. 47-55.

⁴⁷ LOPEZ-MIRAS, M.; MATÍN-SANCHEZ, I.; YEBRA-RODRIGUEZ, A.; et. al. (2013). Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration. *Plos One*, vol. 8. pp. 1-13.

⁴⁸ CIFERRI, O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, nº3. pp. 879-885.

⁴⁹ LOPEZ-MIRAS, M., PIÑAR, G., ROMERO-NOGUERA, J., & et. al. (2012). *Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potencial*. *Aerobiologia*. pp. 1-13. Obtido de www.springerlink.com

uma pintura sobre tela^{50,51}, levando ao aumento de porosidade e conseqüentemente uma diminuição da resistência mecânica. Os seus esporos podem ser transportados na roupa, animais ou ar, e desenvolvem-se em ambientes de humidade relativa a partir de 65% e a temperatura entre 20-35°C⁵².

Até recentemente, a prevenção e tratamento deste ataque foram realizados com recurso a fungicidas comerciais^{53,54}. No entanto, a sua eficácia e uso têm sido colocados em causa pelo aumento da resistência dos organismos aos componentes dos biocidas⁵⁵, para além da sua elevada interacção com os constituintes da pintura⁵⁶ e da sua toxicidade para os humanos⁵⁷. Posto isto, nos últimos anos têm sido estudadas alternativas para prevenir e tratar a biodegradação e têm surgido opções como o bio-restauro^{58,59} ou o uso de óleos essenciais^{60,61}. Esta segunda alternativa consiste na utilização de óleos essenciais provenientes

⁵⁰ CIFERRI, O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, nº3, pp. 879-885.

⁵¹ PANER, C. (2012). Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the universe of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences. *Prime Journal of Microbiology Research* vol. 2, pp. 114-120.

⁵² LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. . (2012). Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potencial. *Aerobiologia*, pp. 1-13. Obtido de www.springerlink.com

⁵³ STERFLINGER, K., & PINAR, G. (2013). *Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills?* Applied Microbiol Biotechnol, nº 97. pp. 9637–9646.

⁵⁴ INOUE, M., & KOYANO, M. (1991). *Fungal contamination of oil paintings in Japan*. International Biodeterioration, nº 28. pp. 23-35.

⁵⁵ KISHORE, G., & PANDE, S. (2007). *Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut*. Plant Disease, nº 91. pp. 375-379.

⁵⁶ BARBABIETOLA, N., GRIMALDI, M., TASSO, F., & et. al. (2011). *Development of microbial-based restoration techniques*. Contribution to the "Italy in Japan 2011" initiative: Science, Technology and Innovation .

⁵⁷ PANER, C. (2012). *Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the universe of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences*. In Prime Journal of Microbiology Research vol. 2, pp. 114-120.

⁵⁸ Os microorganismos são usualmente considerados prejudiciais para as obras de arte, mas estudos recentes mostram que podem ser utilizados a favor da conservação e restauro, o que deu origem ao termo "Bio-Restauro".

⁵⁹ Embora as aplicações variem bastante consoante cada caso, tem-se comprovado que o uso destes agentes é bastante eficaz para a eliminação de depósitos de difícil remoção, tais como colas ou resinas em pinturas murais, assim como para tratar lacunas ou defeitos de suporte em materiais pétreos.

⁶⁰ VUKOJEVIC, J., & GRBIC, M. (2010). *Moulds on paintings in Serbian fine arts museums*. African Journal of Microbiology Research. vol. 4. pp. 1453-1456.

⁶¹ AGUIAR, M. (2002). *Evaluation of the effectiveness of six essential oil and two alcohols for mould inhibition and assessment of their effects on easel painting surfaces*. Research project in MA Conservation in fine art.

do processo metabólico de plantas e obtidos por extração química ou por processos de destilação. Os óleos essenciais são bastante utilizados nas áreas farmacêutica, médica e cosmética⁶², e vários estudos tem comprovado a sua eficácia anti-fúngica e antibacteriana^{63,64,65}. Os modos de aplicação de óleos essenciais propostos têm sido a sua integração e dissolução em meios de cultivo *in vitro* (PDA – Potato Dextrose Agar)⁶⁶ ou a volatilização dos seus compostos fungicidas feita na proximidade dos microorganismos⁶⁷. Este último é o modo de utilização mais discutido e aceite pela comunidade restauradora, em função dos resultados satisfatórios obtidos nos últimos anos e, sobretudo, por se apresentar como uma alternativa de fácil obtenção e aplicação, economicamente viável e isenta de toxicidade para os humanos, em comparação com fungicidas comerciais^{68,69}.

Nas ultimas décadas tem-se assistido a um aumento de agentes poluentes no ar^{70,71}, que criam novos mecanismos de degradação (diminuição da qualidade do ar e aumento de fumos de queima de combustível, por exemplo), para além de

⁶² HAMMER, K., CARSON, C., & RILEY, T. (1999). *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Journal of Applied Microbiology. pp. 985-990.

⁶³ SOKOVIC, M., VUKOJEVIC, J., MARIN, P., & et. al. (2009). *Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities*. Molecules, vol. 14, nº1. pp. 238-249.

⁶⁴ PIEROSAN, M., PAULETTI, G., ROTA, L., & et. al. (2007). *Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species*. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, vol. 24, nº 4. pp. 764-770.

⁶⁵ CALVO, M. A., & et. al. (2011). *Antimicrobial activity of plant natural extract and essential oils*. Formatex Research Center. pp. 1179-1185.

⁶⁶ TULLIO, V., NOSTRO, A., MANDRAS, N., & et. al. (2007). *Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods*. Journal of Applied Microbiology, nº 102. pp. 1544–1550.

⁶⁷ AGUIAR, M. (2002). *Evaluation of the effectiveness of six essential oil and two alcohols for mould inhibition and assessment of their effects on easel painting surfaces*. Research project in MA Conservation in fine art.

⁶⁸ LOPEZ-MIRAS, M., PIÑAR, G., ROMERO-NOGUERA, J., & et. al. (2012). *Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potencial*. Aerobiologia. pp. 1-13. Obtido de www.springerlink.com

⁶⁹ VUKOJEVIC, J., & GRBIC, M. (2010). *Moulds on paintings in Serbian fine arts museums*. African Journal of Microbiology Research. vol. 4. pp. 1453-1456.

⁷⁰ BONADUCE, I., ODLYHA, M., GIROLAMO, F., & et. al. (2013). *The role of organic and inorganic indoor pollutants in museum environments in the degradation of dammar varnish*. Analyst, nº 138. pp. 487-500.

⁷¹ BRIMBLECOMBE, P. (1990). *The composition of museum atmospheres*. Atmospheric Environment, vol. 24 B, nº 1. pp. 1-8.

potenciarem os já existentes⁷². Portanto, é natural que assistamos também a um aumento de ataques de deterioração por parte de microorganismos, e conseqüentemente, uma maior necessidade de interdisciplinaridade entre a biotecnologia e a arte para a criação de novas soluções de combate a estes ataques. Esta interdisciplinaridade tem-se manifestado através da identificação de agentes biológicos degradadores (aspecto essencial para o sucesso de qualquer intervenção) e pelo desenvolvimento de métodos e ferramentas adequadas ao combate dos agentes de degradação⁷³.

Nas áreas farmacêutica, alimentar e cosmética, tem-se explorado a possibilidade de encapsular óleos essenciais em ciclodextrinas (CD), compostos orgânicos (oligosacáridos cíclicos) formados pela degradação enzimática (enzima CD glicosiltransferase) de amido⁷⁴. Este encapsulamento de óleos essenciais permite a salvaguarda da sua estabilidade química, ao protegê-los de factores externos como luz e temperatura, e reduz a volatilidade dos seus componentes, libertando-os sob condições controladas^{75,76,77}. Embora esta técnica tenha sido utilizada em várias áreas, não foram encontrados quaisquer registos da sua aplicação em conservação e restauro, quer para a prevenção, quer para o tratamento de ataques de microorganismos, requisito de inovação inerente a este trabalho de investigação.

Esta dissertação propõe-se avaliar os efeitos dos compostos anti-fúngicos de óleos essenciais, extraídos de alfazema, sálvia e manjerição, encapsulados em ciclodextrina, sobre os fungos *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Alternaria sp.*,

⁷² FERNANDES, P. (2007). "A biotecnologia na conservação do património cultural". *Revista Lusófona de Arquitectura e Educação*, nº2.

⁷³ *Idem. Ibidem.*

⁷⁴ AGUIAR, U., & et. al. . (2014). *Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de Croton zehnteri com B-ciclodextrina*. *Quimica Nova*, vol. 37. pp. 50-55.

⁷⁵ VENTURINI, C., & et. Al. . (2008). *Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas*. *Quimica Nova*, Vol. 31, nº2. pp-360-368.

⁷⁶ MARQUES, H. (2010). *A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles*. *Flavour and Fragrance Journal*. pp. 313-326.

⁷⁷ TORO-SANCHEZ, C., & et. al. (2010). *Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, nº 67. pp. 431-441.

realizando testes in vitro de inibição do crescimento das estirpes fúngicas, bem como, proceder à avaliação do seu impacto em provetes de pintura a óleo sobre tela. Este teste será fundamental para detectar quaisquer influências ou alterações provocadas pelos componentes voláteis dos óleos essenciais na camada de protecção, na camada pictórica e no suporte.

II. MATERIAIS E METODOLOGIAS

Tal como referido anteriormente, o objectivo deste trabalho é a avaliação dos efeitos anti-fúngicos de óleos essenciais de alfazema, sálvia e manjerição, encapsulados em ciclodextrina, sobre os fungos *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum* e *Alternaria alternata*, bem como a avaliação do seu impacto em provetes de pintura a óleo sobre tela.

1. PROVETES DE PINTURA A ÓLEO

1.1. MATERIAIS CONSTITUINTES DOS PROVETES

1.1.1. Suporte

Como suporte, foi utilizada uma tela cartonada com camada de preparação industrial da marca Mart[®], de cor branca e com dimensões aproximadas de 36 por 48 cm. O critério da escolha recaiu no facto de ser um suporte têxtil com características adequadas a receber tintas a óleo, e permitir simular uma pintura num curto espaço de tempo. É composta por um aglomerado de cartão de cerca de 4 mm de espessura, rematada com uma tela de linho com preparação branca.

1.1.2. Aglutinante

Para estes ensaios seleccionaram-se tintas à base de óleos vegetais, mais especificamente o óleo de linhaça e o de papoila. O uso do óleo como aglutinante de pintura é conhecido desde o século XIII, mas só se tornou comum a partir da primeira metade do século XV, revolucionando a arte pictórica e prolongando-se

até aos dias de hoje⁷⁸. De facto, grande parte do espólio museológico actual é constituído por pinturas a óleo sobre tela^{79,80}.

Os óleos vegetais, como o de linhaça, noz ou papoila têm a capacidade de secarem rapidamente quando expostos ao ar, formando um filme sólido, designando-se por isso de óleos secativos⁸¹. Dos três óleos referidos, o de linhaça foi o mais utilizado^{82,83,84,85}. Caracteriza-se por ser um líquido límpido⁸⁶ e cujo tempo de secagem é bastante inferior aos outros, atributo que se deve à elevada concentração de ácido linoleico (este possui maior número de insaturações na cadeia alifática, aumentando assim a capacidade para se desencadarem processos de oxidação)⁸⁷; já o óleo de noz, caracteriza-se por ser menos secativo, mas mais brilhante quando misturado com pigmentos (devido ao facto de não amarelecer tanto com o tempo)⁸⁸, enquanto o óleo de papoila é o menos secativo e brilhante⁸⁹, tendo sido usado sobretudo no final do século XIX.

⁷⁸ ANTUNES, V. (2014). *Técnicas e materiais de preparação na pintura portuguesa dos séculos XV e XVI*. Tese de Doutoramento em História da Universidade de Lisboa. pp. 243.

⁷⁹ DRAGO, F., & CHIBA, N. (2004). *Painting canvas synthesis*. The Visual Computer, nº 20. pp 314-328.

⁸⁰ SANTOS, S. (2014). *Francisco Correia, o mesmo nome para dois pintores maneiristas. Estudo artístico e técnicos-material das suas obras, documentadas e atribuídas*. Porto: Tese de Doutoramento em Estudos do Património, Universidade Católica do Porto.

⁸¹ BONADUCE, I., CARLYLE, L., COLOMBINI, M., & et. al. (2012). *New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study*. Plos One, Vol. 7, nº 11. pp. 1-14.

⁸² CHURCH, A. (1915). *The chemistry of paints and painting*. Londres: Seeley, Service and Co., Lda.

⁸³ CHURCH, A. (1915). *The chemistry of paints and painting*. Londres: Seeley, Service and Co., Lda.

⁸⁴ MALLEGOL, J., GARDETTE, J.-L., & LEMAIRE, J. (2000). *Long-Term Behavior of Oil-Based Varnishes and Paints. Photo- and Thermooxidation of Cured Linseed Oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, Vol. 77, n. 3. pp. 257-263.

⁸⁵ BONADUCE, I., CARLYLE, L., COLOMBINI, M., & et. al. (2012). *New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study*. Plos One, Vol. 7, nº 11. pp. 1-14.

⁸⁶ PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.

⁸⁷ LAZZARI, M., & CHIANTORE, O. (1999). *Drying and oxidative degradation of linseed oil*. Polymer Degradation and Stability, nº 65. pp. 303-313.

⁸⁸ CALVO-MANUEL, A. (2003). *Conservación y restauración: materiales, técnicas y procedimientos de la A a la Z*. Barcelona: Ediciones del Serbal.

⁸⁹ MANZANO, E., NAVAS, N., CHECA-MORENO, R., & et. al. (2009). *Preliminary study of UV ageing process of proteinaceous paint binder by FT-IR and principal component analysis*. Talanta, nº 77. pp. 1724-1731.

1.1.3. Pigmentos

No que diz respeito à selecção de pigmentos, foram considerados os vários utilizados ao longo da história da pintura, tendo sido seleccionados para estas experiências o negro de ossos, o vermelhão e o ocre amarelo. Foram estipulados vários requisitos para as características de cada pigmento, tais como a sua relevância histórica e disponibilidade actual, a sua origem e composição química, o seu grau de resistência ou sensibilidades a fungos, assim como a possibilidade de ter alterações visuais mais perceptíveis (a olho nu e microscopicamente).

Os três pigmentos seleccionados são conhecidos desde tempos antigos^{90,91} e as suas tonalidades são ainda muito apreciadas pelos artistas actualmente. Embora o ocre amarelo e o negro de ossos sejam conhecidos desde a Antiguidade, cerca de 15000 a. C. e 2300 a. C.⁹², respectivamente, o vermelhão surgiu no panorama artístico apenas por volta do século XI⁹³, tendo tido uma larga utilização até metade do século XX^{94,95}. Apesar das composições e origens dos pigmentos não serem exactamente as mesmas daquelas usadas antigamente, procurou-se obter versões de cada pigmento o mais aproximadas possível, através da tabela universal de referências de composição de tintas⁹⁶. Com esta tabela confirmamos que a referência PBk9 do negro de ossos corresponde a osso animal calcinado, a PR106 do vermelhão corresponde a sulfureto de mercúrio sintético e a PY43 do ocre

⁹⁰ CRUZ, A. (2007). *Os pigmentos naturais utilizados em pintura*. in DIAS, A.; CANDEIAS, E. (org). *Pigmentos e corantes naturais. Entre as artes e as ciencias*. Évora: Universidade de Évora. (pp. 5-23)

⁹¹ CRUZ, J. (2006). *Para que serve à história da arte a identificação dos pigmentos utilizados numa pintura?* ARTIS - Revista do Instituto de Historia de Arte da Faculdade de Letras de Lisboa, nº5. pp. 445-462.

⁹² PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.

⁹³ Idem. *Ibidem*.

⁹⁴ Apesar de ter sido pouco utilizado depois da primeira metade do século XX, muito devido ao aparecimento do vermelho de cádmio, a sua produção só foi descontinuada na década de 1980. Em PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.

⁹⁵ PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.

⁹⁶ *The Color of Art Pigment Database*. (s.d.). Obtido de <http://www.artiscreation.com>

amarelo, a óxido férrico hidratado natural. Apesar de ter sido possível obter tubos de tinta a óleo contendo apenas óleo de linhaça no caso do negro de ossos e do vermelhão, o tubo de ocre amarelo é composto por uma mistura de óleo de linhaça e óleo de papoila⁹⁷.

Considerou-se ainda pertinente para a investigação haver diversidade de origens e composição de pigmentos, tendo sido seleccionados um pigmento natural orgânico (negro de ossos - $C+Ca_3(PO_4)_2$), um pigmento artificial (vermelhão - HgS) e um pigmento natural inorgânico (ocre amarelo - $Fe_2O_3.H_2O$)⁹⁸. Este requisito foi estipulado de modo a ser possível estudar um leque mais abrangente de situações e reacções entre os pigmentos e os microrganismos. Dada a sua composição química, os três pigmentos apresentam níveis de resistência a microrganismos bastante diferentes^{99,100}. No caso do vermelhão, o facto de ser constituído por sulfureto de mercúrio artificial (sendo, portanto, tóxico)^{101,102}, torna-o altamente resistente a ataques de microrganismos, enquanto no caso do ocre amarelo sucede o oposto, uma vez que os fungos podem degradar a terra argilosa férrica de que é composto, sendo, portanto, bastante susceptível de sofrer ataques fúngicos¹⁰³. No caso do negro de ossos, constituído na sua maioria por carbono,

⁹⁷ Percentagens não divulgadas pelo fabricante.

⁹⁸ *The Color of Art Pigment Database*. (s.d.). Obtido de <http://www.artiscreation.com>

⁹⁹ BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.

¹⁰⁰ EASTAUGH, N., WALSH, V., CHAPLIN, T., & et. al. (2004). *Pigment Compendium: a dictionary of historical pigments*. Oxford: Elsevier.

¹⁰¹ PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.

¹⁰² MARTIN-GIL, J., MARTIN-GIL, F., DELIBES-DE-CASTRO, G., & et. al. (1995). *The first known use of vermilion*. *Experientia*, nº 51. pp. 759-761.

¹⁰³ BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.

considera-se que tem uma resistência a ataques fúngicos média, quando comparado com o vermelhão e o ocre amarelo^{104,105,106}.

Finalmente, considerou-se pertinente perceber quais seriam as cores passíveis de ter mudanças visuais e estéticas mais perceptíveis ao longo desta experiência¹⁰⁷. Excluiu-se, por exemplo, os pigmentos de cor branca, considerando que o negro, o vermelho e o amarelo seriam cores suficientemente diferentes entre si e que cobriam parte da paleta artística. Por outro lado, alterações na superfície cromática, tais como esbatimento, amarelecimento ou escurecimento, entre outras, seriam facilmente detectáveis nestas tonalidades^{108,109,110,111}.

¹⁰⁴BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.

¹⁰⁵ EASTAUGH, N., WALSH, V., CHAPLIN, T., & et. al. (2004). *Pigment Compendium: a dictionary of historical pigments*. Oxford: Elsevier.

¹⁰⁶ PANER, C. (2012). *Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the universe of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences*. Prime Journal of Microbiology Research vol. 2, pp. 114-120.

¹⁰⁷ CRUZ, A. (2000). *A matéria de que é feita a cor. Os pigmentos utilizados em pintura e a sua identificação e caracterização*. Tomar: 1º Encontros de Conservação e Restauro - Tecnologias do Instituto Politécnico de Tomar.

¹⁰⁸ BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.

¹⁰⁹ ROY (ed), A. (1993). *Artists' Pigments: A handbook of their history and characteristics*. Washington: National Gallery of art, vol 2. pp. 159-181.

¹¹⁰ Museum of fine arts of Boston. (s.d.). Obtido de CAMEO: Conservation & Art Materials Encyclopedia Online: <http://cameo.mfa.org>

¹¹¹ PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.

1.1.4. Verniz

De modo a abranger os vários tipos de pintura passíveis de estarem presentes em ambiente museológico, decidiu-se pela criação de três tipos de provetes, um grupo sem verniz (grupo A), um com verniz não envelhecido (grupo B), e outro com verniz sujeito a envelhecimento artificial (grupo C).

A resina Dammar foi escolhida por ter sido bastante utilizada para fabrico de vernizes a partir do início do séc. XIX¹¹², e que mais tarde, também teve grande aceitação no mundo da conservação e restauro¹¹³. É uma resina de origem natural, proveniente de árvores resinosas adultas, da família *Dipterocarpaceae*, composta por terpenoides tetracíclicos e pentacíclicos e material polimérico¹¹⁴. É solúvel em solventes orgânicos e produz vernizes claros e de secagem rápida, sendo também compatível com pigmentos sensíveis¹¹⁵. Dentro das resinas naturais, como mástique, shellac ou sandáracas, a Dammar é considerada a menos ácida^{116,117,118}, sendo por isso a mais estável a longo prazo¹¹⁹. Como verniz mostra ser de maior qualidade, comparativamente por exemplo, com o verniz mástique, que mostra um maior enfraquecimento da camada de protecção a longo prazo, ou com shellac, que não é totalmente resistente a água, sendo por isso mais susceptível em

¹¹² FELLER, R. L. (1985). Resins and the properties of varnishes. Em R. L. FELLER, N. STOLOW, & E. H. JONES, *On pictures varnishes and their solvents* (pp. 119-167). Washington: National Gallery of Art.

¹¹³ CALVO-MANUEL, A. (2003). *Conservación y restauración: materiales, técnicas y procedimientos de la A a la Z*. Barcelona: Ediciones del Serbal.

¹¹⁴ PACHECO, F. (2010). *Remoção de vernizes de pinturas utilizando líquidos iónicos*. Lisboa: Tese de mestrado em Conservação e Restauro da Universidade Nova de Lisboa.

¹¹⁵ PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.

¹¹⁶ FELLER, R. L. (1985). Resins and the properties of varnishes. Em R. L. FELLER, N. STOLOW, & E. H. JONES, *On pictures varnishes and their solvents* (pp. 119-167). Washington: National Gallery of Art.

¹¹⁷ MANZANO, E., NAVAS, N., CHECA-MORENO, R., & et. al. (2009). *Preliminary study of UV ageing process of proteinaceous paint binder by FT-IR and principal component analysis*. Talanta, nº 77. pp. 1724-1731.

¹¹⁸ RIE, E. (1988). *Photochemical and thermal degradation of films of dammar resin*. Studies in Conservation, vol. 33, nº 2. pp. 53-70.

¹¹⁹ CALVO-MANUEL, A. (2003). *Conservación y restauración: materiales, técnicas y procedimientos de la A a la Z*. Barcelona: Ediciones del Serbal.

ambientes húmidos¹²⁰. Com o envelhecimento podem acontecer reacções de oxidação, levando à formação de produtos polares e ácidos carboxílicos. A oxidação do verniz pode provocar alterações a nível visual, com o amarelecimento do filme e aumento da sua fragilidade (aparecimento de micro e macro fissuras), assim como um aumento da sua solubilidade (a sua remoção requer solventes mais polares, em oposição aos apolares, inicialmente eficazes)¹²¹. Num estado avançado de envelhecimento é passível de ser colonizada por algumas espécies de microorganismos e fungos, em particular pelo género *Penicillium*, devido a perda de coesão e aparecimento de microfissuras¹²², sendo também esta uma razão pela qual foi seleccionada para este projecto.

¹²⁰ FELLER, R. L. (1985). Resins and the properties of varnishes. Em R. L. FELLER, N. STOLOW, & E. H. JONES, *On pictures varnishes and their solvents* (pp. 119-167). Washington: National Gallery of Art.

¹²¹ CALVO-MANUEL, A. (2003). *Conservación y restauración: materiales, técnicas y procedimientos de la A a la Z*. Barcelona: Ediciones del Serbal.

¹²² ROMERO-NOGUERA, J., MARTIN-SANCHEZ, I., LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. (2010). *Biodeterioration patterns found in dammar resin used as art material*. in *Microbial Biotechnology*, Vol. 13, nº 3.

1.2. PREPARAÇÃO DOS PROVETES

A preparação dos provetes consistiu na divisão da tela cartonada em 30 quadrados de 6 por 6 cm, utilizando lápis de carvão e régua, onde cada quadrado foi ainda dividido em três secções com 2 cm de largura (Figura 1).

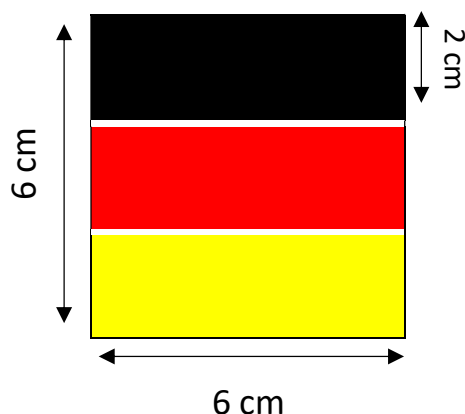


Figura 1 - Exemplo de disposição das faixas de cor nos provetes.

As tintas a óleo em tubo utilizadas foram:

- Negro de Ossos (osso animal calcinado) em óleo de linhaça, da marca Rowney Artists, nº 034, Série A, PBk9.
- Vermelhão (sulfureto de mercúrio sintético) em óleo de linhaça, da marca Rowney Artists, PR106.
- Ocre Amarelo (óxido férrico hidratado natural) em óleo de linhaça e de papoila, da marca Winsor & Newton, nº 744, Série 1, PY43.

Cada tinta foi aplicada separadamente, tendo sido aplicadas duas camadas de tinta.¹²³ Estando a camada cromática seca, fez-se a divisão dos provetes com recurso a régua e x-acto, confirmando que cada provete encaixava perfeitamente na placa de Petri (Figura 2). Durante o processo de corte da tela notou-se que, em

¹²³ A aplicação do vermelhão foi feita com luvas de nitrilo, máscara com filtro para solventes orgânicos e extractores de vapores devido ao seu elevado grau de toxicidade.

algumas zonas, a camada cromática não estava totalmente uniforme, e por esse motivo decidiu-se aplicar uma terceira camada muito fina de cada tinta, em todos os provetes.



Figura 2 - Exemplo de provete de pintura dentro da placa de Petri.

A aplicação do verniz foi feita com recurso a trincha e foi aplicada apenas uma camada fina sobre os provetes B e C. O verniz foi preparado a 20% (10 g de resina Dammar em 15 ml de Shellsol A¹²⁴ e 35 ml Shellsol D40¹²⁵). A mistura de Shellsol A e D40 foi utilizada em detrimento a terebintina¹²⁶ por apresentar um grau de toxicidade mais baixo (desejável para o operador, assim como para diminuir o risco de interferência nas experiências), mas também por ser isenta de odor e não deixar resíduos indesejáveis no filme¹²⁷.

¹²⁴ O Shellsol A é um solvente à base de hidrocarbonetos aromáticos, apresentando-se como um líquido incolor de odor característico. É utilizado como solvente de vernizes em conservação.

¹²⁵ O Shellsol D40 é um solvente incolor à base de hidrocarbonetos alifáticos saturados derivado do *White Spirit*, tendo sido sujeito a um grande processo de refinação, apresentando uma quantidade mínima de compostos aromáticos, e um ligeiro odor característico. Tal como Shellsol A, é utilizado como solvente de vernizes em conservação.

¹²⁶ A terebintina é solvente orgânico à base de hidrocarbonetos monoterpênicos cíclicos, obtido pela destilação de resinas de árvores coníferas. Caracteriza-se por ser um líquido incolor e de odor forte.

¹²⁷ Museum of fine arts of Boston. (s.d.). Obtido de CAMEO: Conservation & Art Materials Encyclopedia Online: <http://cameo.mfa.org>

1.3. ENVELHECIMENTO ARTIFICIAL DOS PROVETES

1.3.1. Secagem dos provetes

Os provetes dos grupos A, B e C foram mantidos numa estufa sem controlo de humidade relativa durante 145 horas a uma temperatura de 75°C. Apesar da bibliografia consultada referir valores mais próximos dos 100 °C como ideais para envelhecimento térmico^{128,129,130} sobretudo para provetes com verniz Dammar¹³¹, considerou-se apenas necessário realizar uma secagem das tintas a óleo e do verniz Dammar dos provetes, sem provocar uma degradação acelerada, pelo que se decidiu manter os valores de temperatura mais reduzidos¹³².

1.3.2. Envelhecimento Foto-Hidrotérmico

O objectivo do envelhecimento acelerado dos provetes do grupo C foi simular a passagem do tempo em pinturas a óleo sobre tela, em ambiente controlado de museu. Como referido anteriormente, os factores que mais influenciam o envelhecimento de pinturas são a luz, a temperatura e humidade relativa¹³³. Vários estudos têm sido realizados para determinar valores considerados ideais para

¹²⁸ FELLER, R. (1994). *Accelerated Aging - Photochemical and thermal aspects*. The Getty Conservation Institute.

¹²⁹ ELFEKY, O., & HASSAN, M. (2007). *Artificial Aging and Deterioration of oil-painted Fabriano paper and cardboard paper supports*. Journal of Applied Polymer Science, vol. 109. pp. 1594-1603.

¹³⁰ PAPLIKA, Z., ANDRIKOPOULOS, K., & VARELLA, E. (2010). *Study of the stability of a series of synthetic colorants applied with styrene-acrylic copolymer, widely used in contemporary paintings, concerning the effects of accelerated ageing*. Journal of Cultural Heritage, nº 11. pp. 381-391.

¹³¹ RIE, E. (1988). *Photochemical and thermal degradation of films of dammar resin*. Studies in Conservation, vol. 33, nº 2. pp. 53-70.

¹³² WHITMORE, P., & COLALUCA, V. (1995). *The natural and accelerated aging of an acrylic artists' medium*. Studies in Conservation, nº 40. pp. 51-64.

¹³³ MICHALSKY, S. (2004). Care and Preservation of Collections. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 57.

ambiente em museu, quer para as pinturas quer para o conforto dos visitantes^{134,135}, sendo que geralmente é referida uma temperatura desejável de 20-22°C¹³⁶ e uma humidade relativa compreendida entre 40-55%¹³⁷ ou entre 40-60%¹³⁸. Em relação à intensidade luminosa em contexto museológico, foi considerado o valor de 50 lux/h referido por Stefan Michalsky¹³⁹. Apesar de nos basearmos neste valor, percebemos que dependendo da fragilidade e composição das pinturas, este valor pode aumentar para 100 lux/h¹⁴⁰, 150 lux/h¹⁴¹ ou 200 lux/h¹⁴².

Os provetes foram introduzidas numa câmara climática FitoClima S600 PLH com sistema Clima Plus 400® durante 800 horas e sujeitas a valores de temperatura, humidade relativa e iluminação constantes, de 25°C, 50%, e 5359 lux/h respectivamente, sendo que os valores utilizados foram seleccionados de acordo com a bibliografia consultada, tendo-se considerado serem os mais adequados a esta experiência^{143,144,145}. A radiação luminosa de luz visível foi feita na horizontal

¹³⁴ SMITH, G. (2006). *Aging characteristics of a contemporary acrylic emulsion used in artists' paints*. Em G. C. Institute, *Modern Paints Uncovered*. Londres: Proceedings from the Modern Paints Uncovered Symposium. pp. 236-246.

¹³⁵ ICOM/UNESCO. (2004). *Running a museum. A practical handbook*. Paris: ICOM- International Council of Museums.

¹³⁶ MAZZEI, P., CAPOZZOLI, A., MINICHIELLO, F., & et. al. (2005). *HVAC systems to control microclimate in the museums*. Proc. of the 2nd Mediterranean Congress of Climatization.

¹³⁷ <http://www.cool.conservation-us.org/byorg/chicora/chicenv.html>

¹³⁸ INOUE, M., & KOYANO, M. (1991). *Fungal contamination of oil paintings in Japan*. International Biodeterioration, nº 28. pp. 23-35.

¹³⁹ MICHALSKY, S. (1997). *The lighting desision*. Ottawa: em, Fabric of an Exhibition, Preprints of Textile Symposium 97. pp. 97-104.

¹⁴⁰ VARGAS, H. (2008). *Estudo do envelhecimento de aglutinantes em temperas proteicas por cromatografia liquida de elevada eficiencia*. Lisboa: Dissertação de mestrado em Quimica da Universidade Tecnica de Lisboa.

¹⁴¹ ICOM/UNESCO. (2004). *Running a museum. A practical handbook*. Paris: ICOM- International Council of Museums.

¹⁴² ALARCÃO, C. (2007). *Prevenir para preservar o património museológico*. Faro: Museal: Revista do Museu Municipal de Faro, nº2.

¹⁴³ SILVA, M. (2011). *Analytical study of accelerated light ageing and cleaning effects on acrylic and PVAc dispersion paints used in Modern and Contemporary Art*. Valencia: Tese de Doutoramento da Universidade Politecnica de Valencia.

¹⁴⁴ PAIVA, R., ROCHA, J., & CAVICCHIOLI, A. (2010). *Câmaras climáticas para o envelhecimento acelerado: acção de microambientes sobre bens culturais*. Quimica Nova, vol. 33, nº1. pp. 189-194.

¹⁴⁵ WHITMORE, P., & COLACLUCA, V. (1995). *The natural and accelerated aging of an acrylic artists' medium*. Studies in Conservation, nº 40. pp. 51-64.

com 4 lâmpadas Osram 840 de 18 watts, a uma distância de cerca 50 cm dos provetes. A intensidade luminosa foi medida com recurso a um luxímetro LI-1000 Datalogger®. O sensor foi colocado em cinco zonas diferentes, nos quatro cantos e no centro do tabuleiro, onde se encontravam os provetes, e mantendo a porta da câmara fechada durante as medições para evitar interferências externas. Registaram-se os valores de intensidade a cada 10 segundos durante 1 minuto, totalizando cinco medições por zona¹⁴⁶.

Considera-se então que, segundo Michalsky¹⁴⁷, uma pintura em exposição num museu recebe 50 lux/hora durante 10 h/dia x 365 dias/ano, o que equivale a 182500 lux/ano^{148,149}. Sabendo que, conforme a teoria de energia cumulativa¹⁵⁰, os efeitos nocivos da iluminação são cumulativos¹⁵¹ e guiando-nos pela lei da reciprocidade de Bunsen-Roscoe¹⁵², podemos assumir que os provetes foram sujeitos a um envelhecimento acelerado equivalente a 23,5 anos de exposição em museu. Se considerarmos ainda que por cada 5°C acima da temperatura ambiente (20°C) a velocidade de reacção duplica^{153,154}, podemos então concluir que 800 horas de envelhecimento acelerado equivalem a 47 anos em museu¹⁵⁵.

¹⁴⁶ Ver Apêndice 1 - Medição de intensidade luminosa.

¹⁴⁷ MICHALSKY, S. (1997). *The lighting desision*. Ottawa: em, Fabric of an Exhibition, Preprints of Textile Symposium 97. pp. 97-104.

¹⁴⁷MICHALSKY, S. (2004). Care and Preservation of Collections. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 57.

¹⁴⁸ FELLER, R. (1994). *Accelerated Aging - Photochemical and thermal aspects*. The Getty Conservation Institute.

¹⁴⁹ COUTINHO, I. (2008). *Resinas epoxidicas - estudos de envelhecimento acelerado e sua aplicação em Conservação e Restauro de vidro*. Dissertação de mestrado em Conservação e Restauro da Universidade Nova de Lisboa.

¹⁵¹ ALARCÃO, C. (2007). *Prevenir para preservar o património museológico*. Faro: Museal: Revista do Museu Municipal de Faro, nº2.

¹⁵² A lei da Reciprocidade afirma que o grau de transformação fotoquímica é proporcional ao produto da intensidade luminosa pelo tempo de iluminação. MURATA, Y., & OSAKABA, M. (2013). *The Busen-Roscoe reciprocity law in ultraviolet-B-induced mortality of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae*. Journal of Insect Physiology nº 59. pp. 241-247.

¹⁵³ VARGAS, H. (2008). *Estudo do envelhecimento de aglutinantes em temperas proteicas por cromatografia liquida de elevada eficiencia*. Lisboa: Dissertação de mestrado em Química da Universidade Tecnica de Lisboa.

¹⁵⁴ ERHARDT, D., & MECKLENBURG, M. (1995). *Accelerated vs natural aging: effect of aging conditions ont the aging process of cellulose*. Materials Research Society Symposium Proceedings, vol. 352. pp. 247-270.

¹⁵⁵ O valor obtido equivale a 23 anos com 100 lux, a 15 anos com 150 lux ou a 11 anos com 200 lux, verificando-se a reciprocidade do aumento da intensidade luminosa com a diminuição do tempo de exposição.

1.3.3. Envelhecimento com luz Ultravioleta (UV)

Os provetes do grupo C foram introduzidos numa câmara de fluxo laminar Hera Safe Kendro D-63450 Type HS 12[®] durante 90 horas^{156,157,158,159} com radiação de comprimento de onda de 254 nm^{160,161}, pelo que se inserem nos UV-C (curtos ou germicidas). Vários autores afirmam que os valores de radiação UV para uma pintura, em contexto museológico, não devem ultrapassar os 75 mW/m²^{162,163,164,165,166,167}, referindo-se a valores de comprimento de onda UV-A (entre 315 e 400 nm), já que constituem 99% deste tipo de radiação que chega à Terra. Tendo em conta que os efeitos fotoquímicos das radiações sobre pinturas são tanto mais graves quanto mais curto for o comprimento de onda^{168,169}, sendo as radiações de

¹⁵⁶ COUTINHO, I. (2008). *Resinas epoxídicas - estudos de envelhecimento acelerado e sua aplicação em Conservação e Restauro de vidro*. Dissertação de mestrado em Conservação e Restauro da Universidade Nova de Lisboa.

¹⁵⁷ CORTEA, I., RADVAN, A., VASILIU, C., & et. al. (2014). *Preliminary results of accelerated ageing test on acrylic art paints*. U.P.B. Science Bulletin, series A, vol. 76, nº 1. pp. 215-222.

¹⁵⁸ MONICO, L., JANSSENS, K., MILIANI, C., & et. al. (2011). *The Degradation Process of Lead Chromate in paintings by Vincent van Gogh studied by means of Spectromicroscopic methods. Part IV: Artificial ageing of model samples of co-precipitates of lead chromate and lead sulfate*. Analytical Chemistry, vol. 83, nº 4. pp. 1214-1223.

¹⁵⁹ MANZANO, E., NAVAS, N., CHECA-MORENO, R., & et. al. (2009). *Preliminary study of UV ageing process of proteinaceous paint binder by FT-IR and principal component analysis*. Talanta, nº 77. pp. 1724-1731.

¹⁶⁰ HERASCU, N., SIMILEANU, M., & RADVAN, R. (2008). *Color change in the artwork materials aged by uv radiation*. Romanian Reports in Physics, vol. 60, nº 1. pp. 95-103.

¹⁶¹ MARENGO, E., LIPAROTA, M., ROBOTTI, E., & et. al. (2006). *Monitoring of paintings under exposure to uv light by ATR-FT-IR spectroscopy and multivariate control charts*. Vibrational Spectroscopy nº40. pp. 225-234.

¹⁶² ALARCÃO, C. (2007). *Prevenir para preservar o património museológico*. Faro: Museal: Revista do Museu Municipal de Faro, nº2.

¹⁶³ MICHALSKY, S. (1997). *The lighting desision*. Ottawa: em, Fabric of an Exhibition, Preprints of Textile Symposium 97. pp. 97-104.

¹⁶⁴ MICHALSKY, S. (2004). *Care and Preservation of Collections*. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 57.

¹⁶⁵ SAUNDERS, D. (1989). *Ultra-violet filters for artificial light sources*. National Gallery Technical Bulletin, vol. 13. pp. 61-68.

¹⁶⁶ FELLER, R. (1994). *Accelerated Aging - Photochemical and thermal aspects*. The Getty Conservation Institute.

¹⁶⁷ ELFEKY, O., & HASSAN, M. (2007). *Artificial Aging and Deterioration of oil-painted Fabriano paper and cardboard paper supports*. Journal of Applied Polymer Science, vol. 109. pp. 1594-1603.

¹⁶⁸ LAZZARI, M., LEDO-SUAREZ, A., LOPEZ, T., & et. al. (2011). *Plastic matters: an analytical procedure to evaluate the degradability of contemporary works of art*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, nº399. pp. 2939-2948.

¹⁶⁹ CASSARES, N., & PETRELLA, Y. (2003). *Influência da radiação de luz sobre acervos museológicos*. Anais do Museu Paulista, vol. 8/9. pp. 177-192.

ultravioleta de comprimento de onda entre 100 e 280 nm (UV-C) a forma de luz mais energética e destrutiva, optou-se por realizar o envelhecimento com luz ultravioleta com o valor de 254 nm (menor comprimento de onda possível da câmara de fluxo laminar utilizada).

2. FUNGOS FILAMENTOSOS

As estirpes fúngicas seleccionadas para esta investigação foram *Aspergillus Versicolor*, *Penicillium Chrysogenum* e *Alternaria Alternata*. São fungos comumente encontrados em obras de arte, e alvo de inúmeros estudos de forma a determinar quais as metodologias adequadas à prevenção do seu ataque e degradação do património artístico^{170,171}. Estas estirpes pertencem ao banco de estirpes fúngicas do Centro de Biotecnologia e Química Fina (Universidade Católica do Porto), tendo sido especificamente recolhidas e isoladas de obras de arte^{172,173}.

2.1. ESTIRPES FÚNGICAS

2.1.1. *Aspergillus versicolor*

O género *Aspergillus sp.* engloba os fungos filamentosos com hifas hialinas septadas, que pertencem à família Tricomacea, da ordem Eurotiales (classe Ascomycetes)¹⁷⁴, e é um dos géneros de fungos mais identificados em obras de arte^{175,176}. Em 1729 o sacerdote e micologista Piero António Micheli descreveu esta

¹⁷⁰ LOPEZ-MIRAS, M.; PIÑAR, G; ROMERO-NOGUERA, J.; et. al. (2012). Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their bio degradative potential. *Aerobiologia*. pp. 1-13.

¹⁷¹ INOUE, M., & KOYANO, M. (1991). *Fungal contamination of oil paintings in Japan*. *International Biodeterioration*, nº 28. pp. 23-35.

¹⁷² PALMEIRÃO, J. (2013). *Santo Aurélio - uma Imagem Relicário da Sé catedral do Porto. Estudo e Conservação Integrada*. Dissertação de mestrado em Arte - Conservação e Restauro da Universidade Católica do Porto.

¹⁷³ PEREIRA, A. (2012). *Caracterização da colonização microbiológica da pintura mural em três igrejas do Norte de Portugal. Estudo preliminar do crescimento microbiano, avaliação de biocidas e proposta de intervenção futura*. Dissertação de Mestrado em Arte - Conservação e Restauro da Universidade Católica do Porto.

¹⁷⁴ DIBA, K., KORBACHEH, P., MIREHENDI, S. H., & al., e. (2007). *Identification of Aspergillus species using morphological characteristics*. in *Pakistan Journal of Medical Sciences*, vol. 23, nº 6. pp. 867-872.

¹⁷⁵ VUKOJEVIC, J., & GRBIC, M. (2010). *Moulds on paintings in Serbian fine arts museums*. *African Journal of Microbiology Research*. vol. 4. pp. 1453-1456.

¹⁷⁶ CIFERRI, O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, nº3, pp. 879-885.

espécie, pela primeira vez, dizendo que a sua estrutura era semelhante a um hissope¹⁷⁷, atribuindo-lhe assim a nomenclatura de *Aspergillus*¹⁷⁸. Este fungo apresenta uma coloração branca-amarelada com formação de pedúnculos e uma ponta colorida, sendo seres aeróbicos presentes em ambientes ricos em oxigénio¹⁷⁹ e de crescimento mais favorável em interiores durante o Verão e o Outono¹⁸⁰.

2.1.2. *Penicillium chrysogenum*

Descoberto em 1928 por Alexander Flemming¹⁸¹, o género *Penicillium sp.* caracteriza -se por ser um fungo de crescimento rápido, de coloração verde-azulada (por vezes pode ser branca), que se multiplica vegetativamente por conídios produzidos em cadeia e conidióforos que se ramificam na extremidade¹⁸². Tal como o *A. Versicolor*, é durante as estações mais quentes do ano que se desenvolve mais intensamente¹⁸³, sendo também frequentemente causador de biodeterioração em obras de arte^{184,185}.

¹⁷⁷ “Instrumento de metal ou madeira usado em cerimonias religiosas para aspergir água benta”. In Dicionário da Língua Portuguesa com Acordo Ortográfico (2003-2016). Porto: Porto editora.

¹⁷⁸ SAMSON, R., VISAGIE, C., HOUBRAKEN, J., & et. al. (2014). *Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus*. in *Studies in Mycology* nº78. pp. 141-173.

¹⁷⁹ DIBA, K., KORDBACHEH, P., MIREHENDI, S. H., & al., e. (2007). *Identification of Aspergillus species using morphological characteristics*. in *Pakistan Journal of Medical Sciences*, vol. 23, nº 6. pp. 867-872.

¹⁸⁰ BENNDORF, D., MULLER, A., BOCK, K., & et. al. (2008). *Identification of spore allergens from the indoor mould Aspergillus versicolor*. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, nº 63. pp. 454-460.

¹⁸¹ Scielo Brasil. (2009). *Alexander Flemming e a descoberta da penicilina*. in *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* vol. 45, nº5.

¹⁸² The University of Adelaide. (s.d.). *Penicillium sp.* Disponível em: Mycology Online: www.mycology.adelaide.edu.au

¹⁸³ BENNDORF, D., MULLER, A., BOCK, K., & et. al. (2008). *Identification of spore allergens from the indoor mould Aspergillus versicolor*. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, nº 63. pp. 454-460.

¹⁸⁴ LOPEZ-MIRAS, M.; PIÑAR, G; ROMERO-NOGUERA, J.; et. al. (2012). Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential. *Aerobiologia*. pp. 1-13.

¹⁸⁵ LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. (2013). Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration. *Plos One*, vol. 8, pp. 1-13.

2.1.3. *Alternaria alternata*

O fungo do género *Alternaria sp.*, alvo de vários estudos publicados sobre biodeterioração de obras de arte^{186,187}, foi descrito pela primeira vez por Nees von Esenbeck em 1816¹⁸⁸. Tem um rápido crescimento e caracteriza-se pela sua coloração negra-acinzentada¹⁸⁹. É um fungo extremamente resistente¹⁹⁰, conseguindo sobreviver a baixos valores de temperatura e humidade relativa, durante vários meses¹⁹¹.

¹⁸⁶ STERFLINGER, K. (2010). *Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage*. Fungal Biology Reviews, nº 24. pp. 47-55.

¹⁸⁷ INOUE, M., & KOYANO, M. (1991). *Fungal contamination of oil paintings in Japan*. International Biodeterioration, nº 28. pp. 23-35.

¹⁸⁸ WOUDEBERG, J., GROENEWALD, J., BINDER, M., & et. al. (2013). *Alternaria redefined*. in Studies in Micology nº 75. pp. 171-212.

¹⁸⁹ The University of Adelaide. (s.d.). *Alternaria sp.* Disponível em: Mycology Online: www.mycology.adelaide.edu.au

¹⁹⁰ ANDERSEN, B., & THRANE, U. (1996). *Differentiation of Alternaria infectoria and Alternaria alternata based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristic*. Canadian Journal of Microbiology, nº 42. pp. 685-689.

¹⁹¹ PRADO, L. (2010). *Aspectos gerais e morfológicos de Alternaria sp.* Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.pt/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de_1889.html.

3. ÓLEOS ESSENCIAIS ENCAPSULADOS EM CICLODEXTRINA

3.1. ÓLEOS ESSENCIAIS

3.1.1. Alfazema (*Lavandula angustifolia* Mill.)

O óleo essencial de alfazema, um género da família da lavanda, é geralmente extraído através da destilação das suas flores, sendo que a composição do óleo e as suas propriedades variam consoante o local de cultivo, a época de recolha da planta e o método de extracção utilizado¹⁹². Caracteriza-se pelas suas propriedades anti-fúngicas, havendo vários estudos publicados com resultados satisfatórios da sua acção sobre diferentes estirpes fúngicas^{193,194,195,196}.

3.1.2. Sálvia (*Salvia officinalis*)

A sálvia é uma planta que pertence à família *Lamiaceae*, sendo uma das mais importantes plantas aromáticas e medicinais desta família¹⁹⁷. A sua composição química apresenta flavonóides, taninos, proteínas e o óleo essencial¹⁹⁸ e tem

¹⁹² VIUDA-MARTOS, M., MOHAMADY, M., FERNANDEZ-LOPEZ, J., & et. al. (2011). *In vitro antioxidant and antibacterial activitie of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants*. Food Control, nº22. pp. 1715-1722.

¹⁹³ PANEK, M., REINPRECHT, L., & HULLA, M. (2014). *Ten essential oils for bleech wood protection - Efficacy againts wood-destroying Fungi and moulds, and effect on wood discoloration*. BioResources, vol 9, nº 3. pp. 5588-5603.

¹⁹⁴ CAVANAGH, H., & WILKINSON, J. (2002). *Biological Activities of Lavender Essential Oil*. Phytotherapy Research, nº 16. pp. 301-308.

¹⁹⁵ INOUE, M., & KOYANO, M. (1991). *Fungal contamination of oil paintings in Japan*. International Biodeterioration, nº 28. pp. 23-35.

¹⁹⁶ RAKOTONIRAINY, M., & LAVEDRINE, B. (2005). *Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control biocontamination in libraries and archives storage areas*. International Biodeterioration and Biodegradation, nº 55. pp. 141-147.

¹⁹⁷ RUSSO, A., FORMISANO, C., RIGANO, D., & et.al. (2013). *Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions*. Food and Chemical Toxicology, nº 55. pp. 42-47.

¹⁹⁸ O óleo essencial é composto por α e β tuyonas (35 – 60%), α -terpineol (0,1 – 9%), linalol (0,5 – 12%), óxido de cariofileno (1,1%), δ -tyrpineol, entre outros.

mostrado ter propriedades antioxidantes¹⁹⁹ e anti-fúngicas^{200,201,202,203,204}. As suas propriedades podem variar consoante as condições de cultivo e de extracção, sendo esta variação menos significativa quando comparado com outros óleos essenciais²⁰⁵.

3.1.3. Manjeriço (*Ocimum basilicum*)

O óleo essencial de manjeriço é um dos mais comuns em todo o mundo, sendo produzido num elevado número de países, entre os quais se destacam os de origem europeia devido à alta qualidade do produto. Quimicamente, caracteriza-se por conter timol, metil-chavicol, linalol, eugenol, cineol e pineno²⁰⁶. Tal como os óleos essenciais descritos anteriormente, a sua composição química

¹⁹⁹ BANNWART, T., CORTEZ, L., & MELLA, E. (2008). *Avaliação das actividades biológicas e fisico-químicas do óleo essencial obtido da Salvia Officinalis frente à adubação organica*. Brasil: IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar.

²⁰⁰ FRATERNALE, D., GIAMPERI, L., BUCCHINI, A., & et. al. (2005). *Composition and antifungal activity of essential oil of Salvia sclarea from Italy*. Chemistry of Natural Compounds, vol. 41, nº 5. pp. 604-606.

²⁰¹ TIAN, X.-N., JIANG, Z.-T., & LI, R. (2008). *Inclusion interactions and molecular microcapsule of Salvia sclarea L. essential oil with b-cyclodextrin derivatives*. European Food Research and Technology, nº 227. pp. 1001–1007.

²⁰² VERMA, R., CHAURASIA, L., & KATIYAR, S. (2008). *Potential antifungal plants for controlling building fungi*. Natural Product Radiance, vol 7, nº 4. pp. 374-387.

²⁰³ FENG, W., & XIAODONG, Z. (2007). *Essential oils to control Alternaria Alternata in vitro and in vivo*. Food Control, nº 18. pp. 1126-1130.

²⁰⁴ TULLIO, V., NOSTRO, A., MANDRAS, N., & et. al. (2007). *Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods*. Journal of Applied Microbiology, nº 102. pp. 1544–1550.

²⁰⁵ COELHO, M. (2009). *Óleos essenciais para aromaterapia*. Tese de mestrado em Biotecnologia e Bio-emprededorismo em Plantas Aromaticas e Mediciniais da Universidade do Minho.

²⁰⁶ AMARAL-BAROLI, A., LAGO, J., ALMEIDA, C., & et. al. (2016). *Variability in essential oil composition produced by micropropagated (in vitro), acclimated (ex vitro) and in-field plants of Ocimum basilicum (Lamiaceae)*. Industrial Crops and Products, nº 86. pp. 180-185.

(fenilpropanóides ou terpenóides) e as suas propriedades anti-fúngicas^{207,208,209,210} dependem largamente dos locais e metodologias de cultivo utilizadas, assim como do processo de extracção²¹¹.

3.2. CICLODEXTRINA

A ciclodextrina é um composto orgânico de oligossacáridos cíclicos, constituído por seis ou mais unidades de glucopiranoses²¹². Forma-se através da degradação enzimática de amido, produzida pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase^{213,214}. O complexo de inclusão de ciclodextrina tem a característica de ser hidrofílico no exterior, mas hidrofóbico no interior²¹⁵. Por essa razão, permite o encapsulamento de óleos essenciais, salvaguardando a sua estabilidade química, ao protegê-los de factores externos, como a luz ou a temperatura, bem como reduzindo a volatilidade

²⁰⁷ OXENHAM, S., SVOBODA, K., & WALTERS, D. (2005). *Antifungal activity of the essential oil of basil (Ocimum basilicum)*. Journal of Phytopathology, nº 153. pp. 174–180.

²⁰⁸ REUVENI, R., FLEISCHER, A., & PUTIEVSKY, E. (1985). *Fungistatic activity of essential oils from Ocimum basilicum chemotypes*. Contribution to the Agricultural Research Organization, Israel.

²⁰⁹ FENG, W., & XIAODONG, Z. (2007). *Essential oils to control Alternaria Alternata in vitro and in vivo*. Food Control, nº 18. pp. 1126-1130.

²¹⁰ EDRIS, A., & FARRAG, E. (2003). *Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase*. Nahrung/Food, vol. 47, Nº 2. pp. 117–12.

²¹¹ LUPE, F. (2007). *Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia*. Campinas: Dissertação de mestrado em Química Orgânica da Universidade Estadual de Campinas.

²¹² ABARCA, R., RODRIGUEZ, F., GUARDA, A., & et. al. (2016). *Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil*. Food Chemistry nº 196. pp. 968-975.

²¹³ KFOURY, M., AUEZOVA, L., GREIGE-GERGES, H., & et. al. (2016). *Development of a total organic carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: application to essential oils*. Analytica Chimica Acta, nº 918. pp. 21-25.

²¹⁴ AGUIAR, U., & et. al. . (2014). *Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de Croton zehnteri com B-ciclodextrina*. Química Nova, vol. 37. pp. 50-55.

²¹⁵ MARQUES, H. (2010). *A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles*. Flavour and Fragrance Journal. pp. 313-326.

dos seus componentes, libertando-os sob condições controladas^{216,217}. A libertação depende do equilíbrio entre o complexo de inclusão e o composto incluído, assim como da temperatura ambiente e da humidade relativa, entre outros factores²¹⁸. Esta técnica tem sido largamente utilizada em áreas científicas, como a alimentar, médica ou farmacêutica²¹⁹, mas não foram encontrados estudos que refiram a sua utilização no contexto da conservação e restauro.

²¹⁶ VENTURINI, C., & et. Al. . (2008). *Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas*. Quimica Nova, Vol. 31, nº2. pp-360-368.

²¹⁷ TORO-SANCHEZ, C., & et. al. (2010). *Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, nº 67. pp. 431-441.

²¹⁸ BARBA, C., EGUINOVA, A., & MATÉ, J. (2015). *Preparation and characterization of B-cyclodextrin inclusion complexes as a tool of a controlled antimicrobial release in whey protein edible films*. LWT- Food Science and Technology, nº 64. pp. 1262-1369.

²¹⁹ ZHANG, J.-Q., JIANG, K.-M., XIE, X.-G., & et. al. (2016). *Water-soluble inclusion complexes of trans-polydatin by cyclodextrin complexation: preparation, characterization and bioactivity evaluation*. Journal of Molecular Liquids, nº 219. pp. 592-598.

4. ENSAIOS LABORATORIAIS

4.1. PROTOCOLOS

4.1.1. Efeito dos componentes voláteis do óleo essencial de sálvia em provetes de pintura a óleo

Foi realizado um ensaio para determinar quais seriam os efeitos dos compostos voláteis do óleo essencial de sálvia sobre a superfície dos provetes de pintura a óleo dos grupos A, B e C. Adaptando a metodologia utilizada por Tullio et al, 2007²²⁰, colocou-se 70 µl de óleo essencial de sálvia sobre uma lâmina de vidro côncava, no fundo de uma placa de Petri, sobre o qual se dispôs o provete de pintura. De modo a evitar o contacto directo do provete com o óleo essencial, elevou-se a altura do provete utilizando um pedaço de madeira esterilizada, tal como descrito no estudo de Aguiar, 2002²²¹. As placas foram seladas com Parafilm® e incubadas durante 14 dias a 25°C. Os testes foram realizados em duplicado para cada grupo de provetes e manteve-se um provete de cada grupo sem óleo essencial para controlo.

4.1.1.1. Análise de alterações dos provetes

As alterações visuais na cor foram analisadas com recurso a um colorímetro Konica Minolta, serie Chroma Meter CR-400®, que possui uma área de medição (sensor) de 8 mm de diâmetro. Após ser realizada a calibração de brancos com auxílio da referencia de branco fornecida pelo equipamento, foram feitas três medições em

²²⁰ TULLIO, V., NOSTRO, A., MANDRAS, N., & et. al. (2007). *Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods*. Journal of Applied Microbiology, nº 102. pp. 1544–1550.

²²¹ AGUIAR, M. (2002). *Evaluation of the effectiveness of six essential oil and two alcohols for mould inhibition and assessment of their effects on easel painting surfaces*. Research project in MA Conservation in fine art.

cada faixa de cor, em todos os provetes usados. Obtiveram-se valores $L^*A^*B^*$,²²² a partir dos quais se fez a média dos valores de cada faixa de cor dos dois provetes de teste. O cálculo dos resultados comparativos foi realizado através da equação

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^* + \Delta a^* + \Delta b^*}$$

sendo que ΔE^* corresponde à variação total da cor, ΔL^* corresponde à variação total do parâmetro colorimétrico L^* , Δa^* à variação total do parâmetro colorimétrico a^* e Δb^* à variação total do parâmetro colorimétrico b^* .²²³ Caso $\Delta E \geq 1$, então assume-se que deverá existir diferença suficiente entre as cores para que seja perceptível a olho nu.

Para a observação de alterações de cor, superfície e brilho dos provetes foi utilizado um microscópio digital Dino-lite Pro AM 4000®.²²⁴ Foram retiradas duas amostras em cada faixa de cor em todos os provetes utilizados no ensaio com sálvia. Para tal utilizou-se um alicate-furador de couro com 5mm de diâmetro para obter amostras uniformes entre si. A observação das amostras foi feita através do contacto directo do bocal do microscópio digital, evitando a interferência de iluminação externa.

Posteriormente, realizou-se uma avaliação subjectiva por comparação a olho nu por um grupo de pessoas exteriores à investigação, sendo o grupo constituído por cinco profissionais da área da conservação e restauro e cinco profissionais da área

²²² O espaço de cor $L^*a^*b^*$, também conhecido como CIELAB deriva da teoria das cores opostas (afirma-se que duas cores não podem ser verdes e vermelhas ou amarelas e azul ao mesmo tempo). O valor L^* indica a luminosidade e os valores a^* e b^* representam as coordenadas cromáticas, sendo a^* referente as cores vermelho e verde, e b^* as cores amarelo e azul. *Obtido de:* <https://measuretruecolor.hunterlab.com/>.

²²³ As variações de cor são definidas pela diferença numérica de cada parâmetro entre amostra e padrão. Os resultados são traduzidos em ΔL^* = diferença de claro e escuro (+ = mais claro, - = mais escuro); Δa^* = diferença de vermelho e verde (+ = mais vermelho, - = mais verde); Δb^* = diferença de amarelo e azul (+ = mais amarelo, - = mais azul).

²²⁴ O microscópio digital Dino-lite Pro AM 4000® caracteriza-se por ter uma luz LED branca e uma resolução de 1,3 megapixéis, podendo aumentar a imagem até 200x.

da biotecnologia. Para esta avaliação foi criado um inquérito²²⁵, ao qual cada indivíduo respondeu comparando o provete de controlo e um dos provetes de teste (escolhido aleatoriamente) de cada um dos três grupos de provetes, avaliando alterações a nível de cor, de superfície e de brilho. Este ensaio de comparação a olho nu foi realizado como prova cega, tendo lugar numa sala cedida nas instalações da Faculdade de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto (Pólo da Asprela). O espaço estava devidamente preparado para a situação, tendo disponível cabines de ensaio individuais, de modo a serem limitadas as distrações (Figura 3-A), sendo também isento de ruídos externos. A iluminação foi feita com luz natural (através de uma janela) e de luz artificial (lâmpadas de luz branca dispostas no tecto), sendo igual em todas as cabines de prova. Os provetes foram colocados sobre uma mesa no centro da sala, dentro de uma placa de Petri aberta para permitir que os participantes pudessem manusear os provetes, mas evitando contacto directo (Figura 3-B).



Figura 3 - Vista geral da sala durante o inquérito (A). Pormenor da mesa com os grupos de provetes (B).

²²⁵ Ver Apêndice 4 – Inquérito de avaliação de alteração visual.

Aos participantes foi pedido para avaliarem quantitativamente (de 0 a 5) a diferença entre os dois provetes, assinalando posteriormente o tipo de alteração observado e a zona de cor em que essas alterações eram perceptíveis, avaliando separadamente a cor, a superfície e o brilho dos provetes.

4.1.2. Crescimento fúngico na presença de óleos essenciais encapsulados em ciclodextrina

Adaptando a metodologia utilizada por Abarca et. Al., 2016²²⁶, realizou-se um ensaio de inibição de crescimento fungico com óleos essenciais encapsulados em ciclodextrina (CD). Estirpes de *Aspergillus versicolor*, *Penicillium Chrysogenum* e *Alternaria alternata* foram inoculadas em PDA em placas de Petri com 55 mm de diâmetro em PDA utilizando a metodologia de inoculo standard com plug de 5 mm de diâmetro. Posteriormente, as placas inoculadas foram colocadas dentro de uma placa Petri com 90 mm de diâmetro. De modo a assegurar diferenças de altura entre placas e assim criar espaço para a circulação dos compostos voláteis dentro da placa de 90 mm, optou-se por inocular a tampa da placa mais pequena (em detrimento da sua base).

Sob cada placa inoculada foi colocado um papel de filtro e no restante espaço vazio da placa grande colocou-se 0,1 g de ciclodextrinas de óleo essencial de manjeriço, sálvia e alfazema. No final, 1ml de água destilada esterilizada foi depositado próximo das ciclodextrina, evitando qualquer tipo de contacto. Apenas após as placas serem seladas com Parafilm®, foram levemente agitadas fazendo com que a água fosse absorvida pelas CD e pelo papel filtro (Figura 4), de forma a evitar a volatilização precoce dos óleos essenciais fora do ambiente da placa.

²²⁶ ABARCA, R., RODRIGUEZ, F., GUARDA, A., & et. al. (2016). *Characterization of beta-ciclodextrin inclusion complexes containing an essential oil*. Food Chemistry nº 196. pp. 968-975.

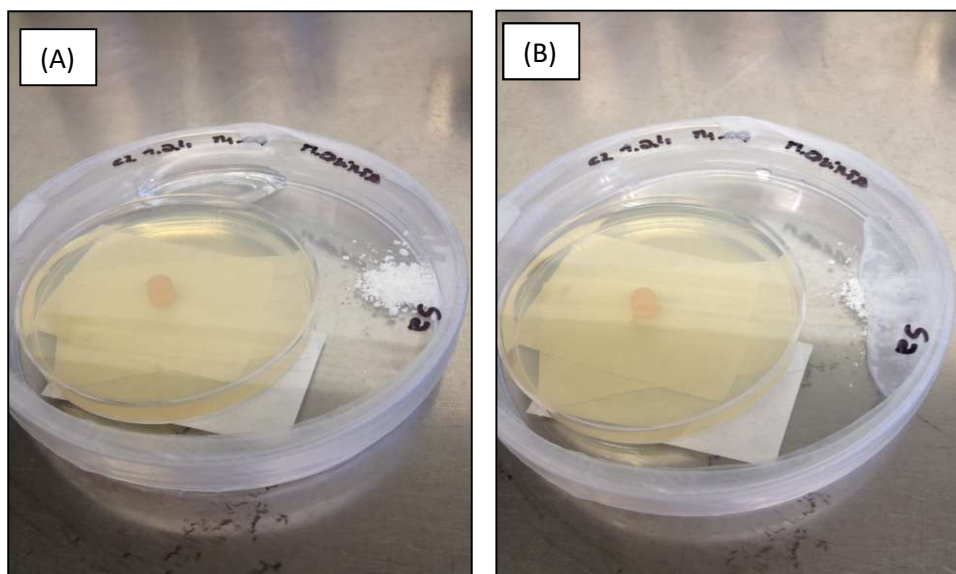


Figura 4 - Exemplo de aplicação de H₂O na proximidade das ciclodextrinas (A); Exemplo de H₂O em contacto com as ciclodextrinas (B).

De modo testar a eficácia anti-fúngica dos compostos voláteis dos óleos essenciais, inocularam-se duas placas com *Penicillium Chrysogenum* e acrescentou-se 40 µl de óleo essencial de sálvia não encapsulado no fundo da placa de Petri de 90 mm. Todos os testes foram feitos em duplicado e duas placas por espécie foram inoculadas na ausência de ciclodextrinas, para controlo, tendo sido depois incubadas a 25°C. No topo de cada placa foi desenhada uma grelha em torno do plug e foram realizados controlos de crescimento a cada 24 horas durante 7 dias, medidos em quatro pontos equidistantes do crescimento radial das estirpes, tal como foi feito por Mironescu et. Al., 2010²²⁷, sendo os valores finais uma média dos obtidos nas medições de cada duplicado.

²²⁷ MIRONESCU, M., & GEORGESCU, C. (2010). Activity of some essential oils against comon spoilage fungi of buildings. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food tecnology* vol XIX n^o2, pp. 41-46.

4.1.3. Crescimento fúngico sobre provetes de pintura na presença de óleo essencial de manjeriço encapsulado em ciclodextrina

Cinco provetes do grupo C²²⁸ foram submersos em meio líquido (PDB) durante cerca de 30 minutos. Os provetes foram introduzidos em placas de Petri de 90 mm, sobre pedaços de madeira esterilizada, tal como descrito no estudo de Aguiar, 2002²²⁹, e depositou-se 600 µl de suspensão de esporos em cada provete, colocando 200 µl em cada cor. A suspensão de esporos foi obtida adicionando uma solução de 10 ml de água desionizada estéril e 1 ml de Tween 20[®] (surfactante não iónico) a uma placa inoculada com a estirpe com cerca de três semanas de crescimento. A placa foi levemente agitada para que houvesse libertação de esporos para a solução, procedendo-se depois à recolha da quantidade necessária para depósito nos provetes. Foi contabilizada a presença de $5,0 \times 10^8$ esporos/ml com câmara de Neubauer. Adicionou-se ainda 0,3 g de ciclodextrina de óleo essencial de manjeriço junto ao provete, e depositou-se 0,3 ml de água destilada esterilizada próximo das ciclodextrinas, evitando contacto. Após ser selada com Parafilm[®], a placa foi levemente agitada fazendo com que a água entrasse em contacto com as ciclodextrinas e fosse absorvida. O ensaio foi feito em triplicado e duas placas inoculadas sem presença de ciclodextrinas foram incluídas para controlo. As placas foram incubadas a 25°C e foram realizados controlos de crescimento a cada 24 horas durante 7 dias, por observação a olho nu e registo fotográfico.

²²⁸ Foi seleccionado para este ensaio apenas o grupo de provetes sujeitos a envelhecimento artificial de modo a que o provete fosse representativo de uma pintura real envelhecida em museu.

²²⁹ AGUIAR, M. (2002). *Evaluation of the effectiveness of six essential oil and two alcohols for mould inhibition and assessment of their effects on easel painting surfaces*. Research project in MA Conservation in fine art.

III. ANÁLISE DE RESULTADOS

1. Efeito dos compostos voláteis do óleo essencial de sálvia na superfície de provetes de pintura

1.1. Análise por colorimetria

Tabela 1 - Valores ΔE^* representativos da variação total da cor (e respectivo desvio-padrão) dos provetes expostos ao óleo essencial de sálvia.

Provetes Pigmento	Grupo A (Provetes sem verniz)	Grupo B (Provetes com verniz não envelhecido)	Grupo C (Provetes com verniz envelhecido)
Negro de Ossos	0,05 (+/- 0,03)	2,10 (+/- 0,13)	0,27 (+/- 0,13)
Vermelhão	0,89 (+/- 0,10)	0,92 (+/- 0,12)	1,09 (+/- 0,22)
Ocre Amarelo	0,91 (+/- 0,08)	0,50 (+/- 0,11)	0,12 (+/- 0,11)

Os resultados obtidos mostram que, apesar de apenas haver dois pigmentos com valores de variação de cor superiores a 1 (valor de tolerância de variação), pelo menos três outros valores estão suficientemente próximos para serem representativos de uma alteração de cor que, deverá ser perceptível a olho nu. Uma análise mais profunda dos valores²³⁰ indica que, no caso do negro de ossos do grupo B, a variação deveu-se sobretudo nos parâmetros L^* e b^* , que indicam ter havido um escurecimento e um amarelecimento da zona testada comparativamente

²³⁰ Ver Apêndice 2 – Valores $L^*a^*b^*$ dos pigmentos seleccionados para FTIR.

com o controlo. Os mesmos parâmetros foram notórios no caso do vermelhão do grupo C, com os valores de L^* a serem superiores aos de controlo, significando que houve um aclaramento da cor, e os valores de b^* a indicarem amarelecimento.

1.2. Análise por Microscopia Óptica

A análise dos provetes por microscopia óptica revela haver algumas diferenças entre provete de controlo e provete de teste, mas não entre provetes testados (duplicados) ou até dentro do mesmo provete.

Este facto verifica-se no negro de ossos com verniz não envelhecido (grupo B), onde, apesar de ténue, se observa um escurecimento das amostras de teste, assim como alguma diminuição do brilho (Figura 5), assim como na amostra de ocre amarelo no grupo B, onde se verificam algumas fissuras a nível da superfície (Figura 6). Tal alteração é igualmente visível nas amostras de ocre amarelo do grupo C (sujeito a envelhecimento artificial), sendo que além de fissuras se nota também alguma perda de brilho e escurecimento da cor (Figura 7). Finalmente, nas amostras de vermelhão do grupo C observa-se algum escurecimento da cor (Figura 8). Todas as imagens microscópicas foram verificadas e as alterações são consistentes quer em diferentes zonas dentro do mesmo provete, quer entre os provetes duplicados de teste.²³¹ As imagens aqui apresentadas são representativas das várias amostras analisadas.

²³¹ Ver Apêndice 3 – Imagens de microscopia óptica.

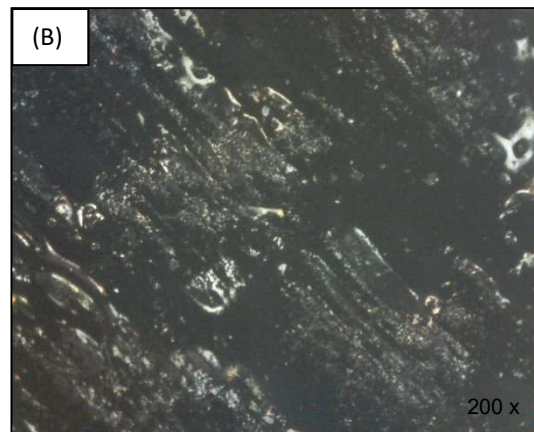
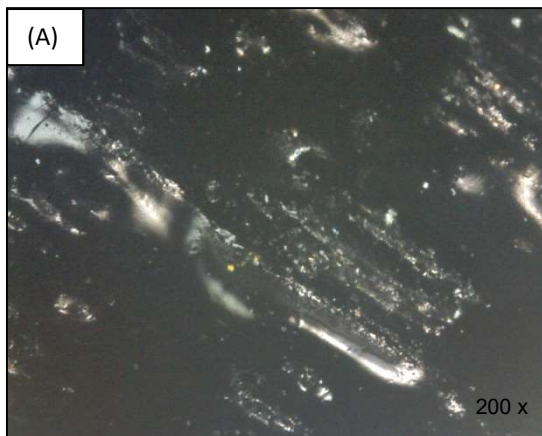


Figura 5 - Observação por microscopia óptica da amostra de negro de ossos do grupo B. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

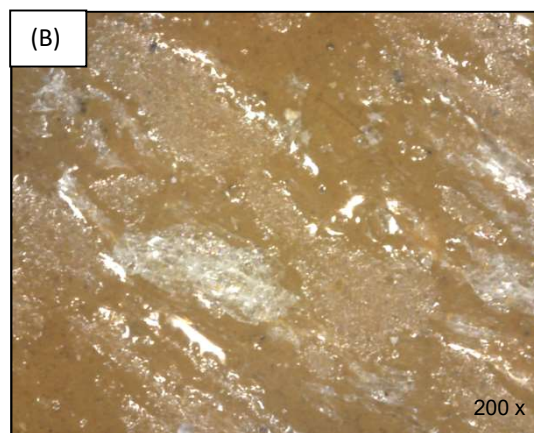
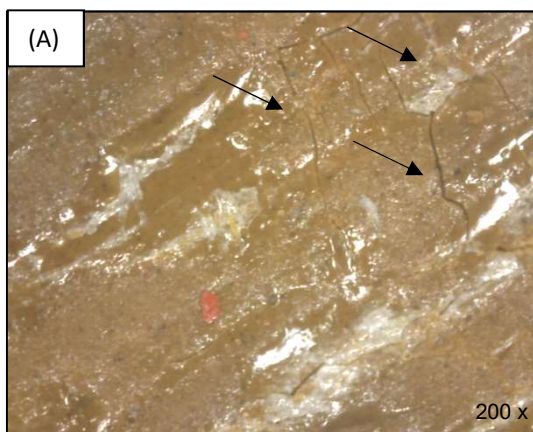


Figura 6 - Observação por microscopia óptica da amostra de ocre amarelo do grupo B. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

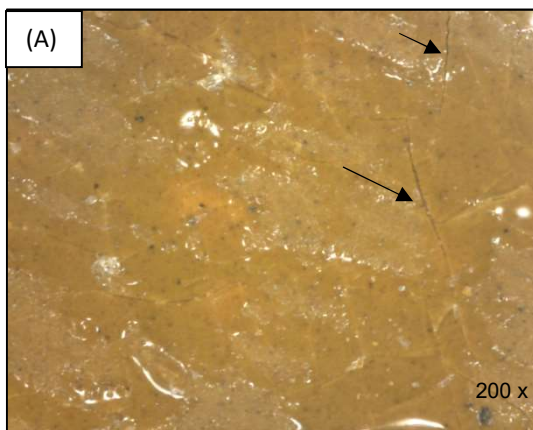


Figura 7 - Observação por microscopia óptica da amostra de ocre amarelo do grupo C. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

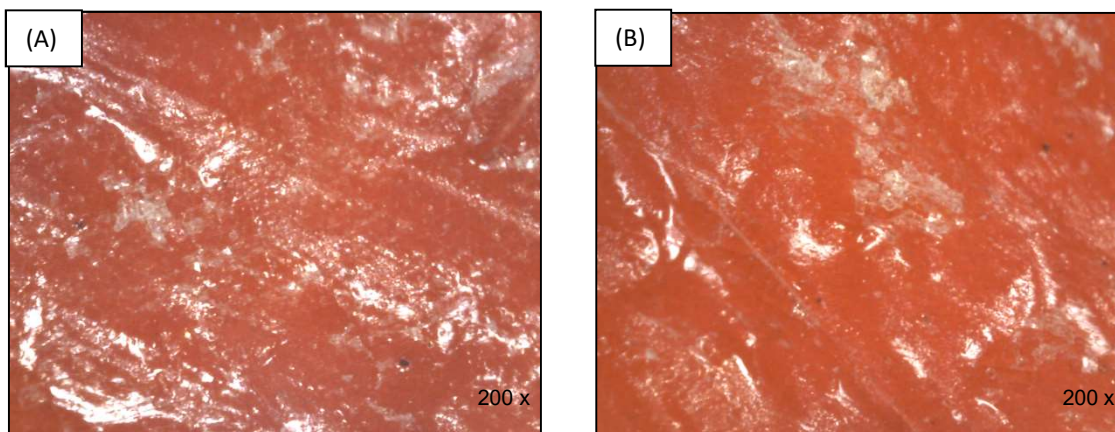


Figura 8 - Observação por microscopia óptica da amostra de vermelhão do grupo C. Amostra de teste (A) e amostra de controlo (B).

1.3. Avaliação de alterações visíveis a olho nu por inquérito

No que diz respeito a avaliação de alteração de cor, os participantes consideraram que no grupo A as alterações eram pouco significativas (Figura 9– A), com metade dos participantes a não detectar qualquer diferença. Estes assinalaram um escurecimento geral do provete de teste, com alguma incidência no ocre amarelo (Figura 9– B). No grupo B, representado pelos provetes com verniz não envelhecido, observou-se uma maior diferença entre os pigmentos comparativamente com o grupo A, sendo o negro de ossos e o vermelhão aqueles onde se relatou existir mais diferenças, sobretudo em número de alterações relatadas (Figura 9- C). As alterações mais visíveis foram registadas no grupo C (provetes com verniz sujeito a envelhecimento artificial), com valores de detecção de diferenças superiores aos outros grupos. Apesar de 27% não ter registado qualquer diferença, o número de alterações assinaladas no ocre amarelo e no vermelhão (Figura 9- D) não correspondem totalmente aos valores apurados na avaliação quantitativa. Tal diferença pode-se dever a uma possível falta de atenção

ou dificuldade de avaliação dos participantes, assim como à subjectividade intrínseca dos inquéritos, sobretudo numa amostra populacional reduzida.

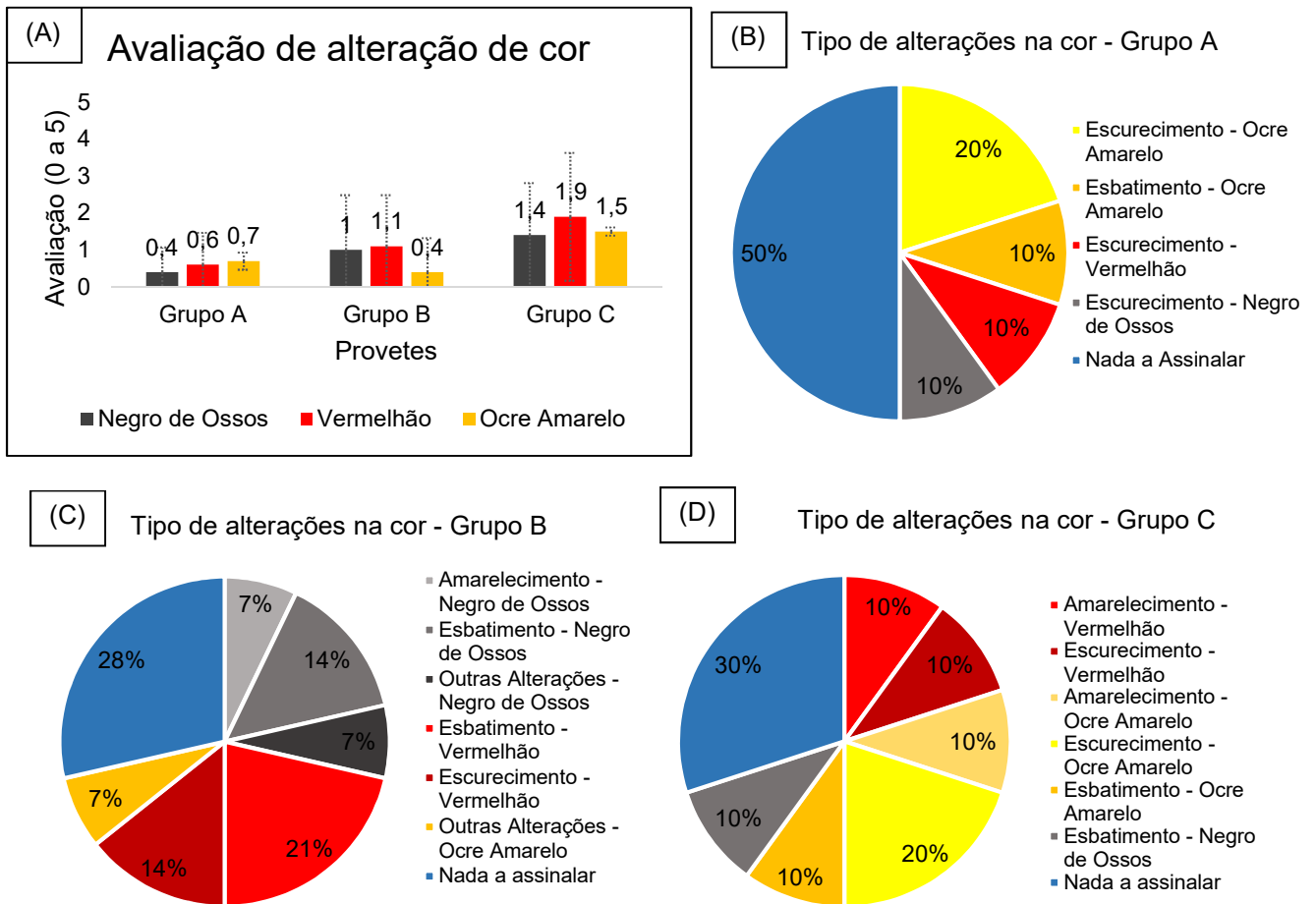


Figura 9 - Avaliação quantitativa de alteração na cor: valores médios e respectivo desvio-padrão (A). Avaliação do tipo de alteração observado e respectiva zona de cor em cada grupo de provetes (B) (C) (D).

Quanto à avaliação das alterações na superfície dos provetes, foi perceptível que o ocre amarelo nos grupos A (Figura 10- B) e C (Figura 10- D) foi o mais afectado pelo óleo essencial de sálvia, apresentando diversas alterações superficiais. Tendo em conta que no grupo B esta tinta se mostrou mais estável (Figura 10 - C),

podemos considerar a hipótese de que o verniz Dammar envelhecido teve um efeito protector menos eficaz em comparação com o verniz não envelhecido, o que pode ser uma consequência do envelhecimento a que foi sujeito, apresentando-se de alguma forma mais frágil. No grupo B registaram-se pequenas alterações no geral, com especial incidência sobre o negro de ossos, sendo este registo consistente com os valores médios obtidos na classificação (Figura 10- A).

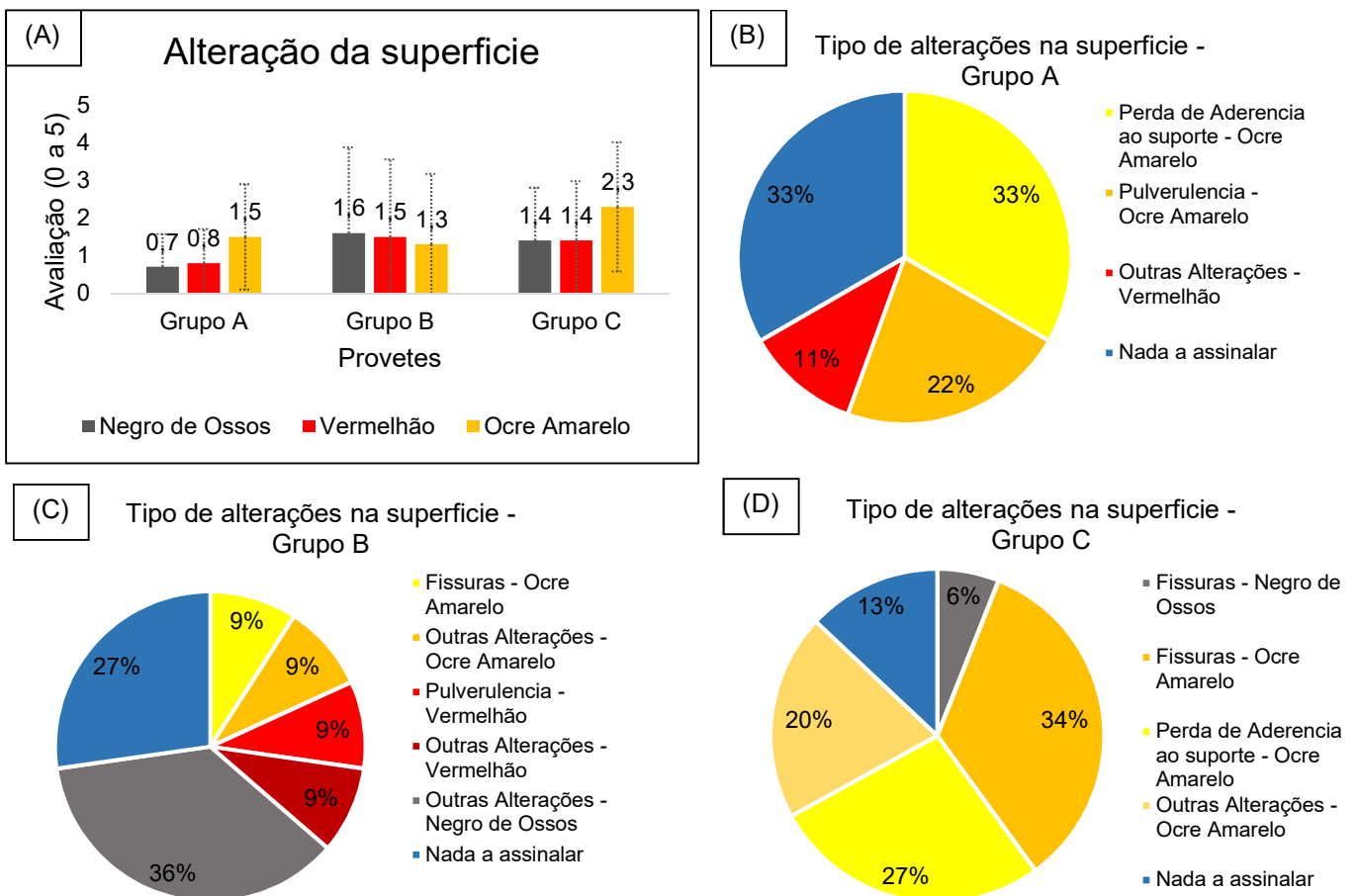


Figura 10 - Avaliação quantitativa de alteração na superfície: valores médios e respectivo desvio-padrão (A). Avaliação do tipo de alteração observado e respectiva zona de cor em cada grupo de provetes (B) (C) (D).

A avaliação das diferenças de brilho entre os provetes foi feita apenas sobre os grupos B e C, tendo-se observado, em ambos os grupos, alterações no negro de ossos. Embora no grupo C este registo tenha sido pouco significativo, uma vez que foram registadas pequenas alterações de brilho em todo o provete, foi no grupo B que este pigmento teve a maioria das alterações, com especial incidência na perda de brilho (Figura 11).

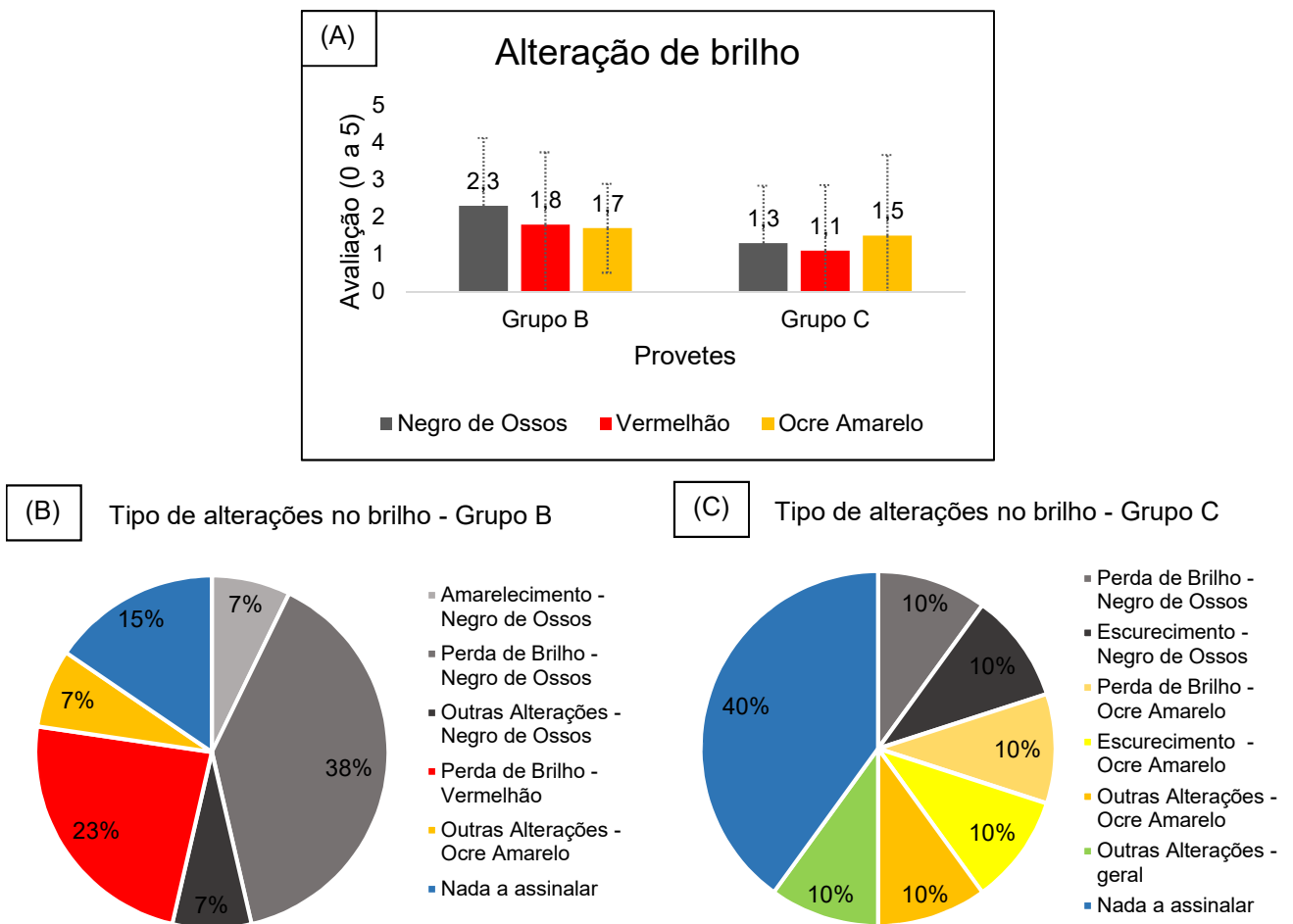


Figura 11 - Avaliação quantitativa de alteração no brilho: valores médios e respectivo desvio-padrão (A). Avaliação do tipo de alteração observado e respectiva zona de cor em cada grupo de provetes (B) (C).

Por fim, interrogou-se os participantes sobre se consideravam existir outras alterações visíveis pertinentes para além daquelas mencionadas ao longo do inquérito, tendo estes assinalado a existência de aroma a sálvia no provete de teste e alguma diferença de brilho (do próprio pigmento) dentro da zona do negro de ossos, ambos no grupo A. Observaram também uma irregularidade na mancha dos pigmentos ocre amarelo e negro de ossos, e uma absorção geral heterogénea do verniz em todo o provete do grupo B, assim como uma irregularidade no ocre amarelo do grupo C.

Sendo que os dados apresentados correspondem à média de todos os inquéritos respondidos, foi notória a presença de desvios padrão altos, devendo-se isto ao facto de ser um grupo pequeno de participantes, pelo que seria interessante no futuro repetir o inquérito com um número mais vasto de indivíduos. Foi feita uma divisão dos resultados por grupos etários e área profissional²³². Os indivíduos inseridos no grupo de 20 a 34 anos de idade, foram os que mais assinalaram a existência de alterações a nível de cor, superfície e brilho, comparativamente com o grupo etário de 35 a 50 anos. Relativamente à separação por profissão, os indivíduos pertencentes a área da conservação e restauro observaram, na grande maioria dos casos, mais alterações a nível de cor e brilho. Curiosamente, o grupo pertencente a área da biotecnologia foi o que mais alterações na superfície assinalou. Apesar de teoricamente os conservadores restauradores terem uma visão treinada para detectar irregularidades, podem neste caso ter assumido que algumas das diferenças existentes se devessem a erros de aplicação da tinta dos provetes, não assinalando, portanto, as irregularidades como alterações consequentes dos compostos voláteis do óleo essencial de sálvia, explicando talvez assim o porquê destes resultados.

²³² Ver Apêndice 5 – Avaliação de alteração visual: divisão por grupos etários e área profissional.

1.4. Cruzamento e discussão de resultados

A análise de todos os resultados obtidos nos vários métodos de avaliação a que os provetes foram sujeitos permite-nos fazer um ponto de situação e tirar algumas elações. No geral, as tintas mais afectadas pelos compostos voláteis do óleo essencial de sálvia foram, o negro de ossos do grupo com verniz não envelhecido (B), o vermelhão e o ocre amarelo, ambos do grupo com verniz sujeito a envelhecimento artificial (C) (Tabela 2).

Tabela 2 - Cruzamento de resultados das técnicas analíticas realizadas.

		Colorímetro ΔE (+/- SD ²³³)	Inquérito	M.O.
GRUPO A Provetes sem verniz	Negro de Ossos	0,5 (+/- 0,03)	Cor: Escurecimento	- Sem alterações a assinalar
	Vermelhão	0,89 (+/- 0,10)	Cor: Escurecimento	- Sem alterações a assinalar
	Ocre amarelo	0,91 (+/- 0,08)	Cor: Esbatimento, Escurecimento Superfície: Perda de aderência ao suporte, Pulverulência	- Sem alterações a assinalar
GRUPO B Provetes com verniz Não envelhecido	Negro de Ossos	2,10 (+/- 0,13) - Escurecimento - Amarelecimento	Cor: Amarelecimento, Esbatimento Brilho: Amarelecimento, Perda de brilho	- Escurecimento da cor - Perda de brilho
	Vermelhão	0,92 (+/- 0,12)	Cor: Escurecimento Superfície: Pulverulência Brilho: Perda de brilho	- Sem alterações a assinalar
	Ocre Amarelo	0,50 (+/- 0,11)	Superfície: Fissuras	- Fissuras

²³³ SD – Standard deviation (desvio-padrão)

GRUPO C Provetes com verniz envelhecido	Negro de Ossos	0,27 (+/- 0,13)	Cor: Amarelecimento Superfície: Fissuras Brilho: Escurecimento, Perda de brilho	- Sem alterações a assinalar
	Vermelhão	1,09 (+/- 0,22) - Cor mais clara - Amarelecimento	Cor: Amarelecimento, Escurecimento	- Escurecimento
	Ocre amarelo	0,12 (+/- 0,11) - Escurecimento	Cor: Amarelecimento, Escurecimento, Esbatimento Superfície: Fissuras, Perda de aderência ao suporte Brilho: Escurecimento, Perda de brilho	- Escurecimento - Aumento do número de fissuras na superfície

No caso do pigmento vermelhão do grupo A e do grupo B são assinaladas várias alterações, apresentando ambos um valor elevado de ΔE na análise por colorímetro de 0,89 e 0,92, respectivamente. Tal como foi referido no início deste capítulo, apesar destes valores serem menores a 1, não podemos omitir o facto de que são valores médios e que o desvio-padrão calculado para cada zona de cor é suficientemente alto para considerar que em algumas medições, a variação total da cor seja de facto igual ou superior a 1.

Comparativamente com as restantes cores, podemos afirmar que o ocre amarelo foi o pigmento que se mostrou mais susceptível aos voláteis do óleo essencial de sálvia ao nível da superfície, apresentando no grupo B algumas fissuras na superfície, observadas tanto nas imagens de microscopia óptica, bem como pelos participantes do inquérito. No grupo sem verniz, o ocre amarelo apresenta várias alterações descritas no inquérito, mas contrariamente ao que sucedeu nos outros grupos, não se observou qualquer alteração nas imagens de microscopia óptica. O valor registado no colorímetro (0,91) não permite chegar a conclusões, mas presume-se, mais uma vez, que o facto de estar próximo do valor limite, aliado ao desvio-padrão, será um reflexo das alterações descritas. Perante os resultados obtidos, considerou-se que seria importante para a melhor compreensão das

alterações de alguns pigmentos a realização de outros métodos de análise, como espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os pigmentos seleccionados foram então o negro de ossos do grupo B, o vermelhão do grupo C, e o ocre amarelo do grupo C, uma vez que mostraram ser aqueles com mais alterações visíveis assinaladas.

1.4.1. Análise por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Embora a técnica de FTIR seja geralmente utilizada para detectar e identificar diferentes componentes numa amostra, foi utilizada nesta investigação²³⁴ para detectar qualquer diferença entre os espectros dos provetes testados e de controlo, assim como para determinar o grau de degradação das amostras de negro de ossos com verniz não envelhecido (grupo B), do vermelhão e do ocre amarelo, ambos com verniz sujeito a envelhecimento artificial (grupo C).

A análise por comparação dos espectros,²³⁵ quer entre amostras do mesmo provete, quer entre amostras dos duplicados de teste e amostra de controlo²³⁶ (Figura 12 a Figura 14), mostra não haver alterações a assinalar na composição das tintas. Os espectros são semelhantes entre si, não tendo sido detectados vestígios residuais do óleo essencial de sálvia. As diferenças que se observam em certos espectros poderão dever-se à metodologia de obtenção do espectro utilizada, assim como às diferenças intrínsecas de aplicação das tintas, quer entre réplicas, quer dentro do mesmo provete.

²³⁴ A análise por FTIR foi realizada utilizando um equipamento da marca Perkin Elmer Spectrum 100®.

²³⁵ Ver Apêndice 6 – espectros de FTIR.

²³⁶ Foram analisadas duas amostras de cada provete, totalizando seis amostras (duas réplicas de teste e um controlo).

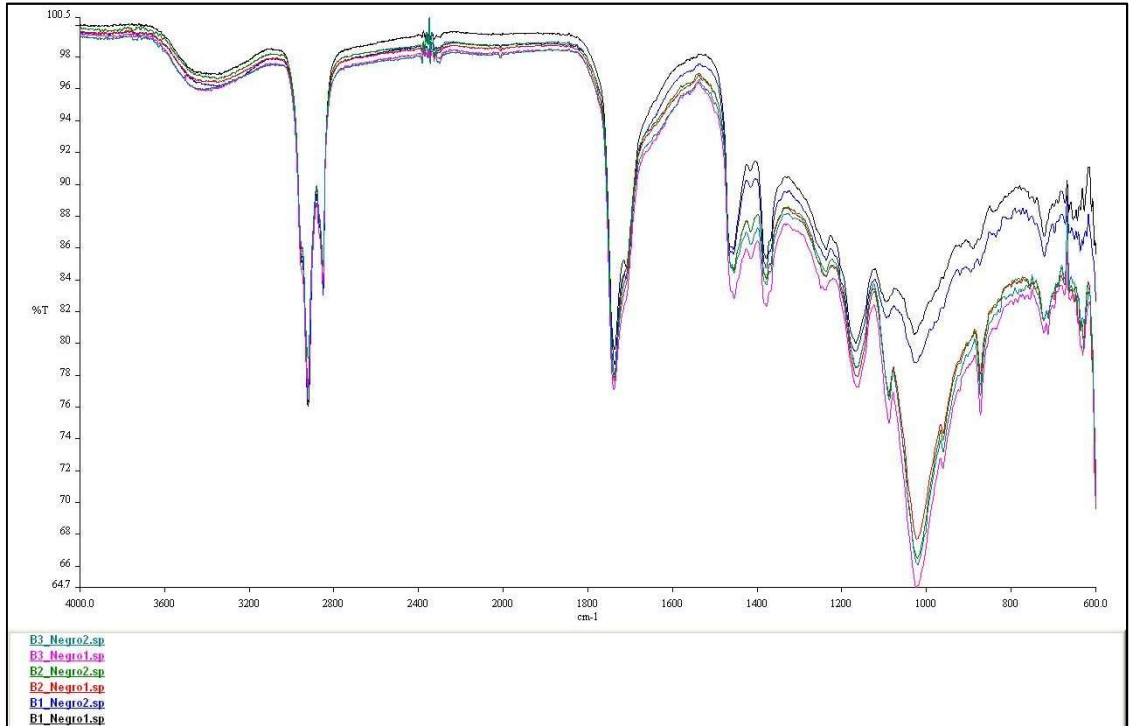


Figura 12 - Espectros de FTIR do negro de ossos do grupo B. Duplicados de teste (B1 e B2) e controle (B3).

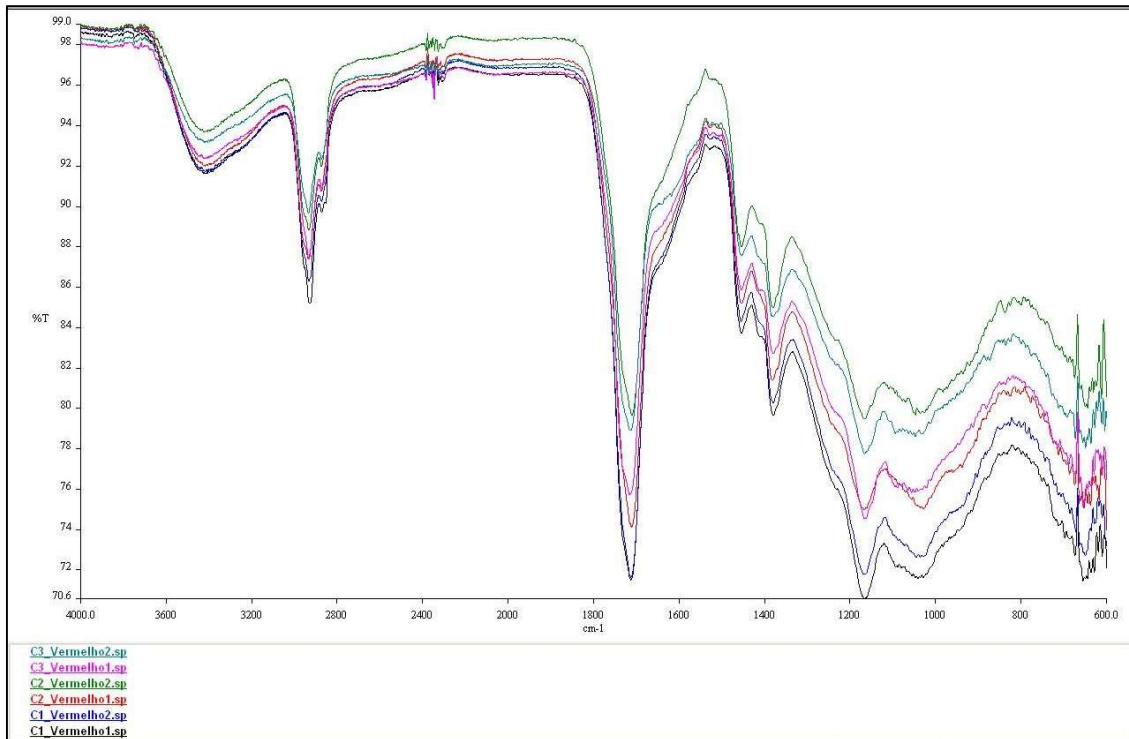


Figura 13 - Espectros de FTIR do vermelhão do grupo C. Duplicados de teste (C1 e C2) e controle (C3).

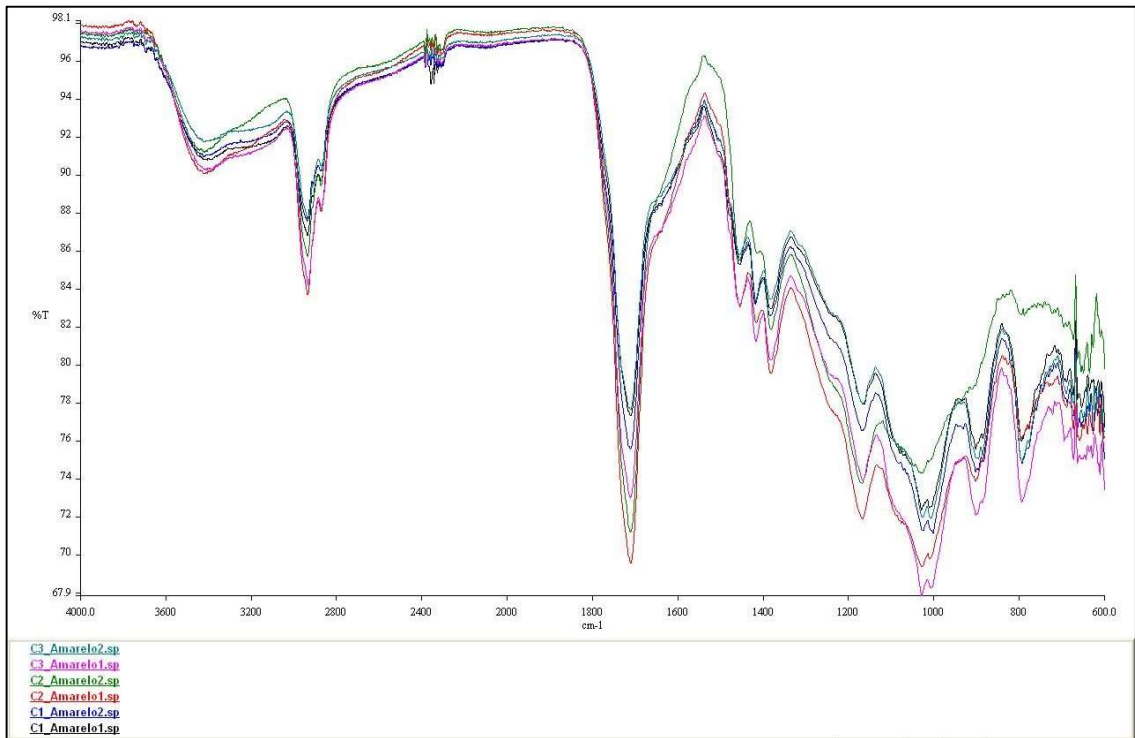


Figura 14 - Espectros de FTIR do ocre amarelo (grupo C). Duplicados de teste (C1 e C2) e controlo (C3).

2. Reactivação das estirpes fúngicas

As estirpes fúngicas seleccionadas encontravam-se armazenadas em rampas a 4°C, pelo que foi necessário proceder a uma repicagem em condições de temperatura favoráveis para promover o crescimento. Assim, foram inoculados triplicados de cada estirpe em placas de Petri com PDA e incubadas a 30°C durante 14 dias. O crescimento radial foi acompanhado através da medição de quatro extremidades da colónia activa (Mironescu et. Al., 2010²³⁷). A Figura 15 representa o gráfico de crescimento médio de cada estirpe após reactivação.

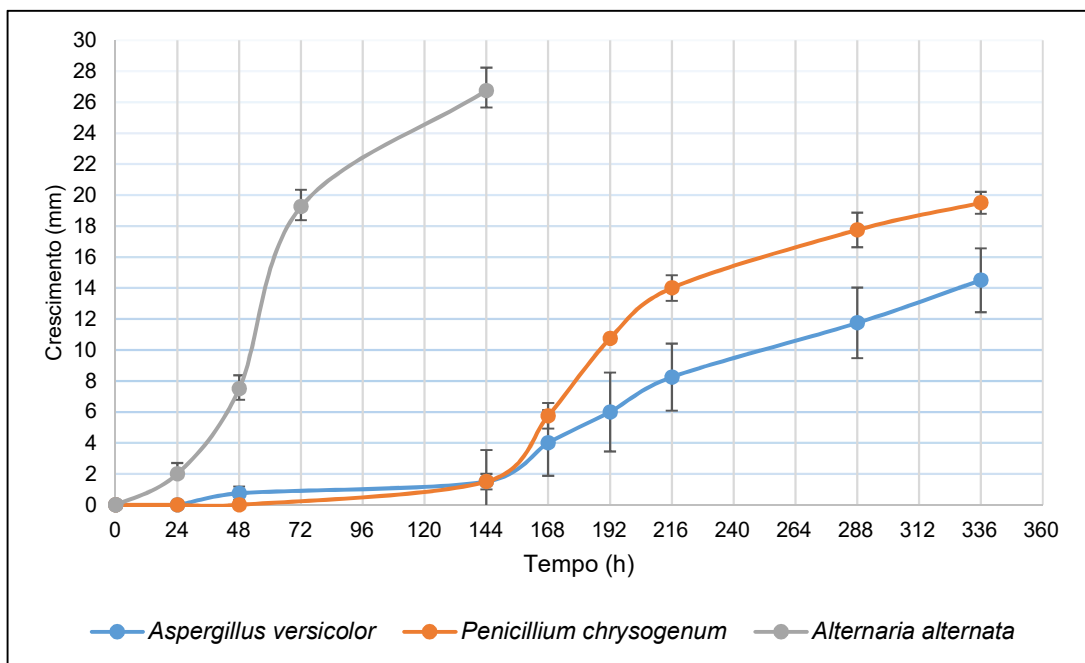


Figura 15 - Crescimento das estirpes fúngicas seleccionadas a 30° C em PDA.

²³⁷ MIRONESCU, M., & GEORGESCU, C. (2010). Activity of some essential oils against comon spoilage fungi of buildings. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food tecnology* vol XIX n°2, pp. 41-46.

A Figura 16 apresenta o crescimento das estirpes a 25° C e numa segunda reinoculação. Quando comparada com a Figura 15, é visível o desaparecimento da fase “lag”²³⁸ longa de crescimento presente para as estirpes *Penicillium sp.* e *Alternaria sp.* resultantes do armazenamento a 4° C. Na Figura 16 as fases “lag” são equivalentes para as estirpes e as diferenças na velocidade de crescimento resultam das características inerentes a cada género. As taxas de crescimento da Figura 16 servirão como referência para ensaios subsequentes.

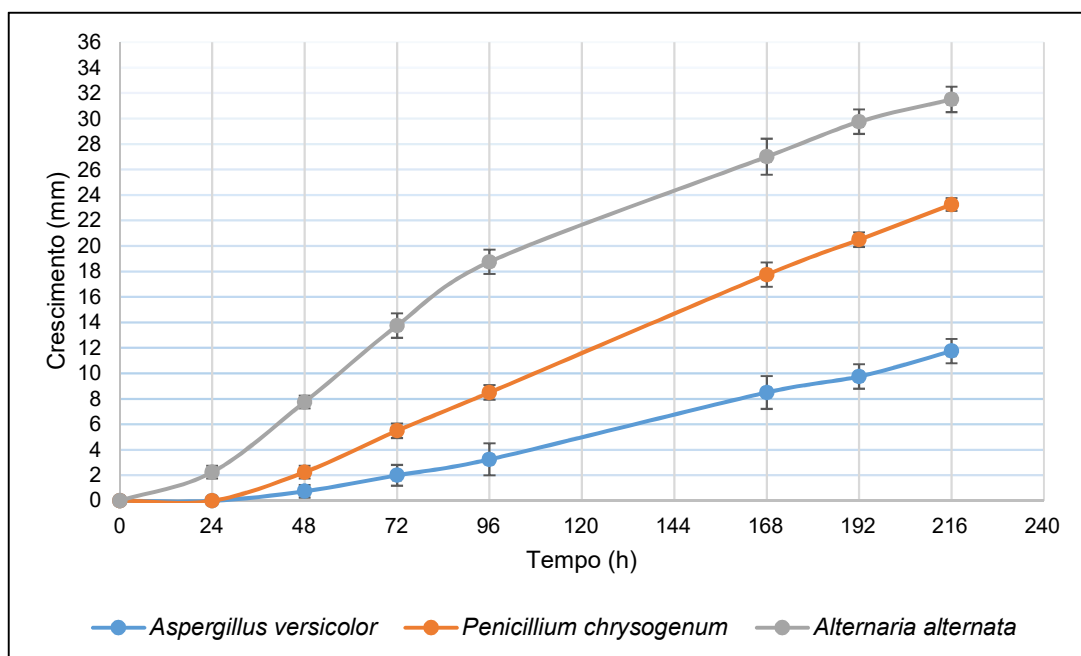


Figura 16 - Crescimento das estirpes fúngicas seleccionadas a 25° C em PDA.

²³⁸ Fase de adaptação a novas condições de crescimento.

3. Crescimento fúngico na presença de óleos essenciais encapsulados em ciclodextrina

Tabela 3 – Taxa média calculada de crescimento TMC (mm/h) das estirpes fúngicas na presença de compostos voláteis de óleo essencial encapsulado (CD) e não encapsulado (OE), e respectivas percentagens de inibição (% inib.) de crescimento calculadas.

	<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
	TMC (mm/h)	(% inib.)	TMC (mm/h)	(% inib.)	TMC (mm/h)	(% inib.)
CD Alfazema	0,101	6,4%	0,060	-13%	0,138	0,7%
CD Manjeriço	0,098	9,2%	0,051	3,7%	0,146	-0,5%
CD Salvia	0,105	2,7%	0,052	1,8%	0,145	-0,3%
OE Salvia	0,070	35,1%	-	-	-	-
Controlo	0,108	-	0,053	-	0,139	-

Ao analisar, na Tabela 3, as taxas médias de crescimento e os valores das percentagens de inibição, percebemos que, na sua maioria, estes se encontram dentro da gama dos desvios-padrão pelo que se deverão considerar sem significado. Desta forma, apenas foi detectada actividade anti-fúngica na aplicação do óleo essencial não encapsulado, o que parece indicar que a percentagem de óleo essencial encapsulado não foi suficientemente elevada para resultar em actividade anti-fúngica (Figura 17 a Figura 19). De entre as CDs, o melhor resultado de inibição de crescimento foi obtido com o óleo essencial de manjeriço sobre a estirpe de *Penicillium chrysogenum*.

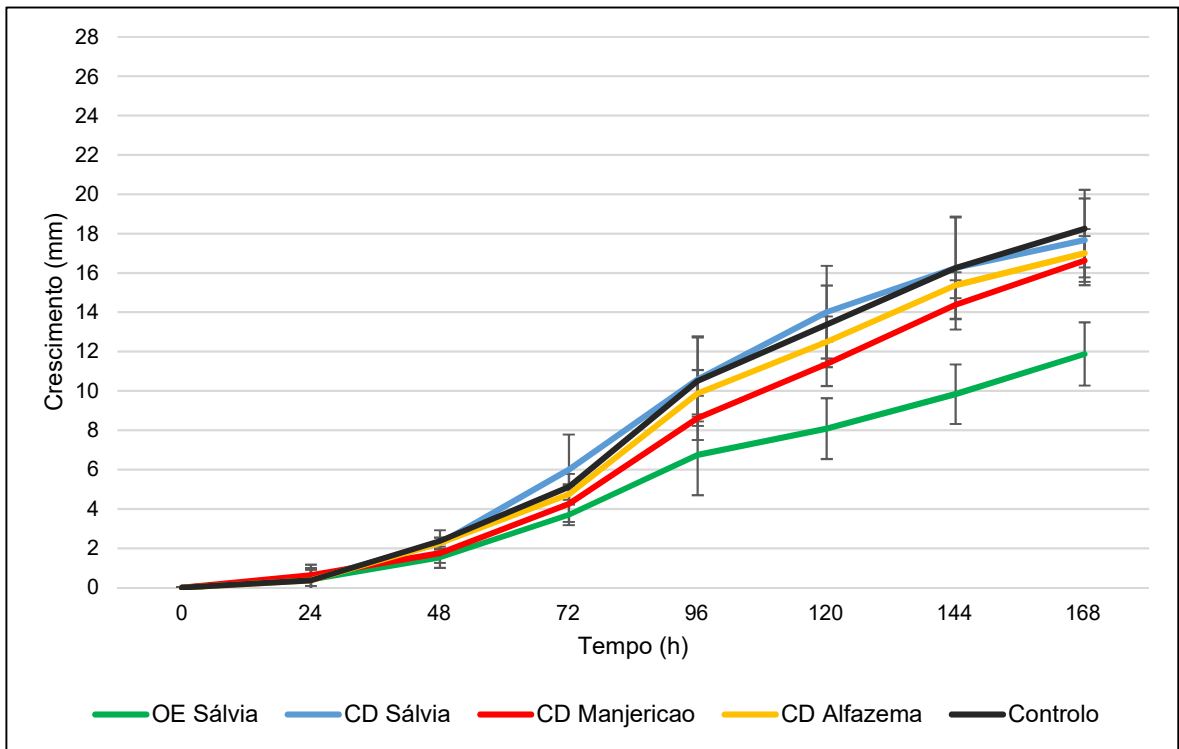


Figura 17 - Crescimento de *Penicillium chrysogenum*, em PDA, na presença de ciclodextrinas (CD) e óleo essencial (OE) de sálvia.

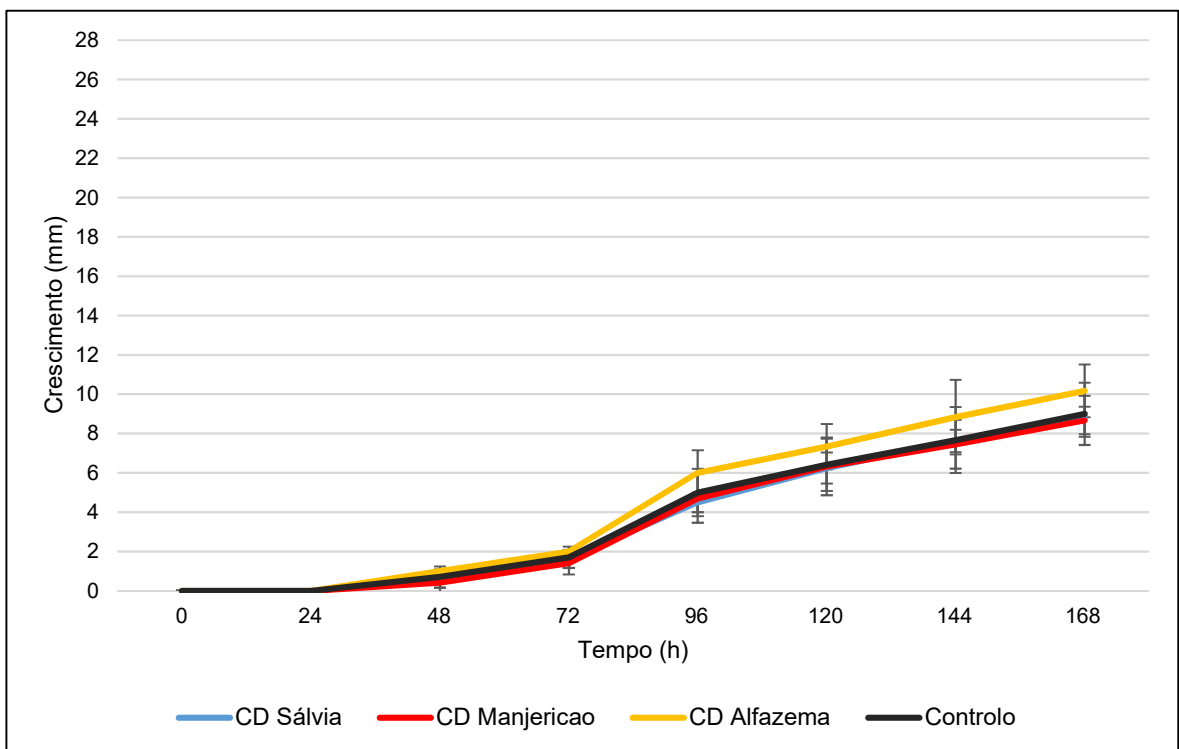


Figura 18 - Crescimento de *Aspergillus versicolor*, em PDA, na presença de ciclodextrinas (CD).

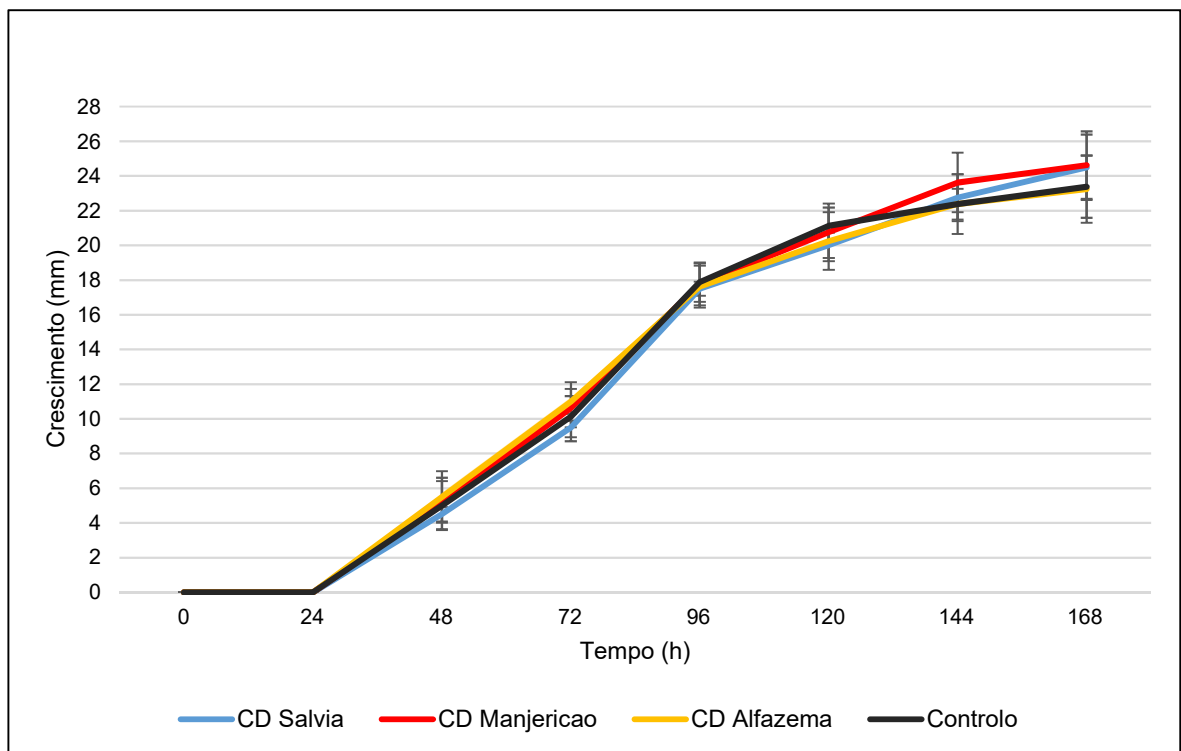


Figura 19 - Crescimento de *Alternaria alternata*, em PDA, na presença de ciclodextrinas (CD).

4. Crescimento fúngico sobre provetes de pintura na presença de óleo essencial de manjeriço encapsulado em ciclodextrina

Com base nos resultados obtidos no ensaio anterior, foi seleccionado o óleo essencial de manjeriço encapsulado para um novo ensaio com a estirpe *Penicillium chrysogenum*. Através de observação a olho nu e de registos fotográficos realizados durante 7 dias, com um intervalo de 24 horas entre cada registo, foi possível fazer uma comparação de germinação dos esporos fúngicos da estirpe de *Penicillium chrysogenum*, sobre os provetes contendo verniz envelhecido artificialmente (grupo C), na presença de ciclodextrinas de óleo essencial de manjeriço.²³⁹ Apesar de se ter realizado este ensaio com três réplicas de teste, apenas duas foram consideradas para efeitos de controlo, uma vez que a terceira apresentou, a partir das 72 horas, um excesso de humidade acumulada que não permitiu uma visualização correcta do crescimento fúngico, sendo, portanto, excluída. Os registos percentuais (Tabela 4) e fotográficos (Figura 20 e Figura 21) mostram que as ciclodextrinas não influenciaram o crescimento da estirpe fúngica, comparativamente com os inóculos de controlo. Tais resultados levam à reflexão dos vários factores metodológicos que possam ter influenciado negativamente este ensaio. Tendo em consideração os resultados obtidos no ensaio anterior, onde houve uma inibição (embora pequena) de crescimento de *Penicillium chrysogenum* na presença de ciclodextrina de óleo essencial de manjeriço, podemos considerar a hipótese de que o número de esporos presentes na suspensão usada tenha sido demasiado elevado em relação à quantidade de CDs utilizada.

Estudos realizados sobre óleos essenciais encapsulados em ciclodextrinas (CD), tais como Abarca, 2016²⁴⁰, que afirma que as CD são solúveis em água, leva a considerar, por um lado, a possibilidade de não ter sido adicionado água em

²³⁹ Ver Apêndice 7 – Controlos fotográficos de crescimento de *Penicillium chrysogenum*.

²⁴⁰ ABARCA, R., RODRIGUEZ, F., GUARDA, A., & et. al. (2016). *Characterization of beta-ciclodextrin inclusion complexes containing an essential oil*. Food Chemistry nº 196. pp. 968-975.

quantidades suficientes para volatilizar todas as CDs utilizadas, ou por outro, a hipótese de ter ocorrido alguma volatilização e perda dos compostos voláteis com actividade fúngica no momento em que se selou as placas, devido a um possível contacto das ciclodextrinas com a água. Tais questões são pertinentes uma vez que a totalidade dos estudos consultados utiliza uma metodologia de diluição das ciclodextrinas no meio, sendo a metodologia aplicada neste ensaio totalmente inovadora. A colonização intensa ocorrida sobre os provetes do grupo C por *Penicillium sp.*, que continham uma camada de protecção de verniz Dammar envelhecido artificialmente, vem de encontro ao estudo publicado por Romero-Noguera,²⁴¹ que afirma que o verniz é passível de ser colonizado por este género num estado avançado de envelhecimento.

De salientar nesta experiência, o facto do pigmento com mais resistência aos fungos ter sido o negro de ossos, sobretudo comparativamente com o vermelhão, que surge em toda a literatura consultada^{242,243,244} como altamente resistente a estes ataques. O negro de ossos, que é descrito geralmente como relativamente susceptível a fungos,²⁴⁵ foi o que levou mais tempo a ser colonizado, e sempre de forma heterógena. Tal resultado não ocorreu num estudo publicado por Paner, 2012²⁴⁶, que apresenta o negro de ossos como um pigmento mais susceptível de

²⁴¹ ROMERO-NOGUERA, J., MARTIN-SANCHEZ, I., LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. (2010). *Biodeterioration patterns found in dammar resin used as art material*. in *Microbial Biotechnology*, Vol. 13, nº 3.

²⁴² MARTIN-GIL, J., MARTIN-GIL, F., DELIBES-DE-CASTRO, G., & et. al. (1995). *The first known use of vermilion*. *Experientia*, nº 51. pp. 759-761.

²⁴³ BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.

²⁴⁴ EASTAUGH, N., WALSH, V., CHAPLIN, T., & et. al. (2004). *Pigment Compendium: a dictionary of historical pigments*. Oxford: Elsevier.

²⁴⁵ BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.

²⁴⁶ PANER, C. M. (2012). Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the universe of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences. *Prime Journal of Microbiology Research* vol. 2, pp. 114-120.

ser colonizado em comparação com o amarelo ocre. O caso deste último pigmento, vem de encontro ao esperado, sendo o mais colonizado.²⁴⁷

De referir ainda, um estudo publicado por Edris, 2003²⁴⁸ afirma que o surfactante Tween 80[®] pode influenciar negativamente a acção antifúngica dos óleos essenciais. Embora neste ensaio se tenha utilizado a versão Tween 20[®] para a realização da suspensão de esporos, numa concentração muito baixa, e sobre este não se tenha encontrado registos de interferência nos compostos biocidas de óleos essenciais, o facto de terem composições semelhantes, levanta algumas questões sobre se este agente terá tido algum tipo de influência negativa neste ensaio.

²⁴⁷ BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.

²⁴⁸ EDRIS, A., & FARRAG, E. (2003). *Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase*. *Nahrung/Food*, vol. 47, Nº 2. pp. 117–12.

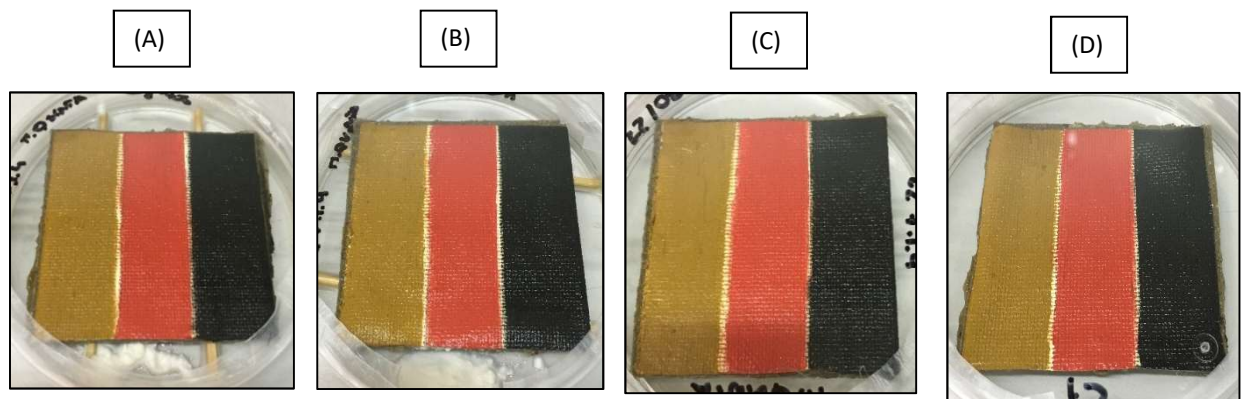


Figura 20 - Registo fotográfico no momento de incubação do inoculo da estirpe de *Penicillium chrysogenum* sobre os provetes do grupo C, na presença de ciclodextrina de óleo essencial de manjerição. Placas de teste (A e B) e placas de controlo (C e D).

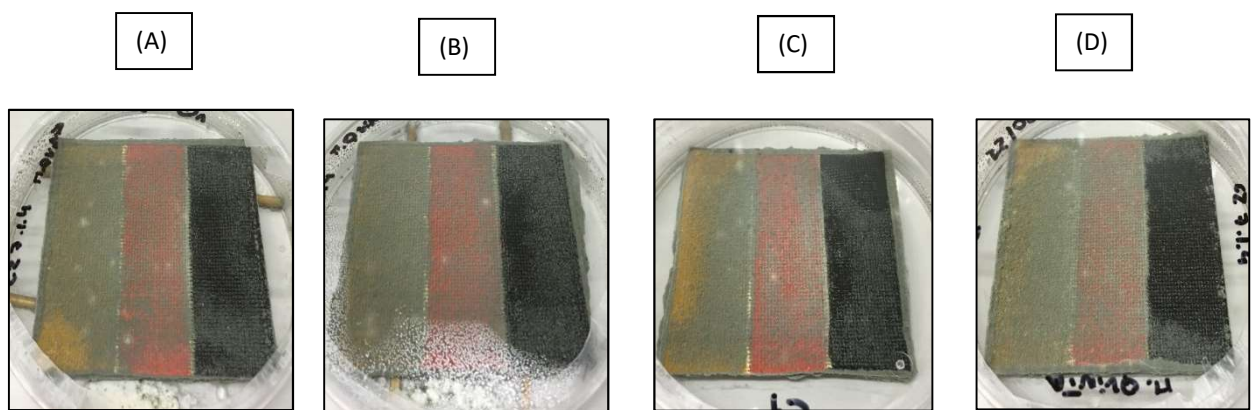


Figura 21 - Registo fotográfico após 168 horas de incubação do inóculo da estirpe de *Penicillium chrysogenum* sobre os provetes do grupo C, na presença de ciclodextrina de óleo essencial de manjerição. Placas de teste (A e B) e placas de controlo (C e D).

Tabela 4 - Crescimento da estirpe fúngica *Penicillium chrysogenum* sobre provetes de pintura na presença de óleo essencial de manjerição encapsulado em ciclodextrina.

	Pigmento	T1	T2	C1	C2
0 horas	Negro de ossos	0	0	0	0
	Vermelhão	0	0	0	0
	Ocre amarelo	0	0	0	0
24 horas	Negro de ossos	0	0	0	0
	Vermelhão	0	0	0	0
	Ocre amarelo	0	0	0	0
48 horas	Negro de ossos	0	0	0	0
	Vermelhão	0*	0*	0	+
	Ocre amarelo	+	+	+	+
72 horas	Negro de ossos	0*	0*	0*	0
	Vermelhão	+	+	+	+
	Ocre amarelo	++++	+++	+++	+++
96 horas	Negro de ossos	+	+	+	0*
	Vermelhão	++	+++	++	++
	Ocre amarelo	+++++	+++++	++++	+++++
120 horas	Negro de ossos	++	+++	++	+
	Vermelhão	++++	+++	+++	++++
	Ocre amarelo	+++++	+++++	++++	+++++
144 horas	Negro de ossos	+++	+++	+++	+
	Vermelhão	++++	++++	++++	++++
	Ocre amarelo	+++++	+++++	++++	+++++
168 horas	Negro de ossos	++++	++++	++++	++
	Vermelhão	+++++	+++++	++++	+++++
	Ocre amarelo	+++++	+++++	++++	+++++

0 → 0% **0*** → 1 a 5% **++** → 21 a 40% **++++** → 61 a 80%
+ → 6 a 20% **+++** → 41 a 60% **+++++** → 81 a 100%.

IV. CONCLUSÃO

Esta dissertação teve como foco o estudo do potencial de aplicação de óleos essenciais encapsulados em ciclodextrina e possíveis efeitos de tratamento em pintura a óleo sobre tela. Através dos dados obtidos nos vários métodos de análise utilizados no ensaio com o óleo essencial de sálvia, foi possível concluir que as alterações detectadas aconteceram apenas a nível superficial, uma vez que não foram detectados vestígios residuais na análise por FTIR, nem alterações na composição da superfície cromática. Estes resultados levam a considerar que seria interessante num trabalho futuro, realizar outro tipo de análises para determinar com certeza o nível de interacção do óleo essencial com o suporte. Ainda, uma vez que segundo os métodos analíticos realizados, as alterações foram apenas superficiais, seria interessante repetir este ensaio utilizando o óleo essencial encapsulado. Deste modo seria possível perceber se a presença de ciclodextrinas e o facto de haver uma libertação controlada dos voláteis teria uma acção menos negativa sobre a superfície cromática. Embora existam várias publicações sobre o uso de óleos essenciais para controlo fúngico em pinturas, não foram encontrados registos de estudos que abordem os efeitos que os compostos voláteis de óleos essenciais possam ter sobre pinturas a óleo sobre tela, fazendo deste ensaio um trabalho pioneiro e uma contribuição para os estudos futuros desta problemática.

Relativamente aos ensaios com estirpes fúngicas, o facto de ser testado uma abordagem distinta daquelas publicadas até à data (inspirada na metodologia utilizada nas experiências levadas a cabo por Abarca, 2016²⁴⁹) é uma contribuição para o estudo futuro desta alternativa aos biocidas industriais em pinturas a óleo em contexto museológico. Actualmente a metodologia mais comum de aplicação é

²⁴⁹ ABARCA, R., RODRIGUEZ, F., GUARDA, A., & et. al. (2016). *Characterization of beta-ciclodextrin inclusion complexes containing an essential oil*. Food Chemistry nº 196. pp. 968-975.

a diluição das ciclodextrinas em meios de cultura *in vitro*, utilizada, por exemplo, no estudo de Toro-Sanchez, 2010²⁵⁰, que não é adequada para a simulação de aplicação em pinturas. Para tal metodologia ser aplicada em pinturas reais seria imprescindível a diluição das ciclodextrinas em algum dos materiais constituintes das pinturas. Uma possível solução seria a incorporação das ciclodextrinas no verniz final de protecção de pinturas que tivessem sofrido uma intervenção de conservação e restauro. A metodologia de libertação dos compostos voláteis praticada neste ensaio tem potencial de aplicação em situações reais, já que as ciclodextrinas, na proximidade das pinturas, não interferem directamente com a obra de arte, e é respeitado o princípio da intervenção mínima referido na introdução desta dissertação.

Apesar de não se ter observado uma inibição de crescimento fúngico significativa, os resultados obtidos nestes ensaios demonstram que existe actividade biocida nos componentes voláteis dos óleos essenciais. Esta investigação mostra-se como um avanço no estudo da aplicação de óleos essenciais encapsulados no controlo de ataques fúngicos em pinturas a óleo sobre tela, dando abertura a que haja uma continuidade do estudo desta técnica, não só aplicada a fungos e pinturas a óleo sobre tela, mas a todas as outras formas de arte que sofrem de qualquer tipo de biodegradação.

²⁵⁰ TORO-SANCHEZ, C., & et. al. (2010). *Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules*. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, nº 67. pp. 431-441.

FONTES E BIBLIOGRAFIA

Fontes Computorizadas

- <http://www.artiscreation.com>
- <http://cameo.mfa.org>
- <http://canada.pch.gc.ca>
- <http://www.cool.conservation-us.org>
- <https://dictionaryofarthistorians.org>
- <http://fitopatologia1.blogspot.pt>
- <http://www.history-of-the-microscope.org>
- <http://www.konicaminolta.eu>
- <http://museumpests.net>
- www.mycology.adelaide.edu.au
- <http://www.perkinelmer.com.cn>
- <https://www.portoeditora.pt>
- <http://www.scielo.br>

Bibliografia

- ABARCA, R., RODRIGUEZ, F., GUARDA, A., & et. al. (2016). *Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil*. Food Chemistry nº 196. pp. 968-975.
- AGUIAR, M. (2002). *Evaluation of the effectiveness of six essential oil and two alcohols for mould inhibition and assessment of their effects on easel painting surfaces*. Research project in MA Conservation in fine art.
- AGUIAR, U., & et. al. . (2014). *Preparação e caracterização do complexo de inclusão do óleo essencial de Croton zehnteri com B-ciclodextrina*. Quimica Nova, vol. 37. pp. 50-55.

- ALARCÃO, C. (2007). *Prevenir para preservar o património museológico*. Faro: Museal: Revista do Museu Municipal de Faro, nº2.
- AMARAL-BAROLI, A., LAGO, J., ALMEIDA, C., & et. al. (2016). *Variability in essential oil composition produced by micropropagated (in vitro), acclimated (ex vitro) and in-field plants of Ocimum basilicum (Lamiaceae)*. Industrial Crops and Products, nº 86. pp. 180-185.
- ANDERSEN, B., & THRANE, U. (1996). *Differentiation of Alternaria infectoria and Alternaria alternata based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristic*. Canadian Journal of Microbiology, nº 42. pp. 685-689.
- ANTUNES, V. (2014). *Técnicas e materiais de preparação na pintura portuguesa dos séculos XV e XVI*. Tese de Doutoramento em Historia da Universidade de Lisboa. pp. 243.
- BANNWART, T., CORTEZ, L., & MELLA, E. (2008). *Avaliação das actividades biológicas e fisico-químicas do óleo essencial obtido da Salvia Officinalis frente á adubação organica*. Brasil: IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar.
- BARBA, C., EGUINOVA, A., & MATÉ, J. (2015). *Preparation and characterization of B-cyclodextrin inclusion complexes as a tool of a controlled antimicrobial release in whey protein edible films*. LWT- Food Science and Technology, nº 64. pp. 1262-1369.
- BARBABIETOLA, N., GRIMALDI, M., TASSO, F., & et. al. (2011). *Development of microbial-based restoration techniques*. Contribution to the "Italy in Japan 2011" initiative: Science, Technology and Innovation .
- BENNDORF, D., MULLER, A., BOCK, K., & et. al. (2008). *Identification of spore allergens from the indoor mould Aspergillus versicolor*. European Journal of Allergy and Clinical Immunology, nº 63. pp. 454-460.
- BONADUCE, I., CARLYLE, L., COLOMBINI, M., & et. al. (2012). *New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study*. Plos One, Vol. 7, nº 11. pp. 1-14.
- BONADUCE, I., ODLYHA, M., GIROLAMO, F., & et. al. (2013). *The role of organic and inorganic indoor pollutants in museum environments in the degradation of dammar varnish*. Analyst, nº 138. pp. 487-500.
- BRIMBLECOMBE, P. (1990). *The composition of museum atmospheres*. Atmospheric Environment, vol. 24 B, nº 1. pp. 1-8.

- BROMMELLE, N. (1964). *The Russell and Abney report on the action of light on water colours*. Studies in Conservation, vol. 9, nº 4. pp. 140-152.
- BRUCE, R. (1969). *Dictionary of artists: oil pigments - their chemical and physical properties*. [s.l.]: Honors Project - paper 2.
- CALVO, M. A., & et. al. (2011). *Antimicrobial activity of plant natural extract and essential oils*. Formatex Research Center. pp. 1179-1185.
- CALVO-MANUEL, A. (2003). *Conservacion y restauracion: materiales, tecnicas y procedimientos de la A a la Z*. Barcelona: Ediciones del Serbal.
- CAPPITELLI, F., & SORLINI, C. (2008). *Microorganisms Attack Synthetic Polymers in Items Representing Our Cultural Heritage*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 74, nº . pp. 564-569.
- CASSARES, N., & PETRELLA, Y. (2033). *Influência da radiação de luz sobre acervos museológicos*. Anais do Museu Paulista, vol. 8/9. pp. 177-192.
- CAVANAGH, H., & WILKINSON, J. (2002). *Biological Activities of Lavender Essential Oil*. Phytotherapy Research, nº 16. pp. 301-308.
- CHURCH, A. (1915). *The chemistry of paints and painting*. Londres: Seeley, Service and Co., Lda.
- CIFERRI, O. (1999). Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, nº3, pp. 879-885.
- CIFERRI, O., TIANO, P., & MASTROMEI, G. (2000). *Of microbes and art : the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- COELHO, M. (2009). *Oleos essenciais para aromaterapia*. Tese de mestrado em Biotecnologia e Bio-emprededorismo em Plantas Aromaticas e Mediciniais da Universidade do Minho. .
- CORTEA, I., RADVAN, A., VASILIU, C., & et. al. (2014). *Preliminary results of accelerated ageing test on acrylic art paints*. U.P.B. Science Bulletin, series A, vol. 76, nº 1. pp. 215-222.
- COUTINHO, I. (2008). *Resinas epoxídicas - estudos de envelhecimento acelerado e sua aplicação em Conservação e Restauro de vidro*. Dissertação de mestrado em Conservação e Restauro da Universidade Nova de Lisboa.

- CRUZ, A. (2006). *Para que serve à história da arte a identificação dos pigmentos utilizados numa pintura?* ARTIS - Revista do Instituto de Historia de Arte da Faculdade de Letras de Lisboa, nº5. pp. 445-462.
- CRUZ, A. (2007). Os pigmentos naturais utilizados em pintura. Em A. DIAS, & E. CANDEIAS, *Pigmentos e corantes naturais. Entre as artes e as ciencias.* (pp. 5-23). Évora: Universidade de Évora.
- DESVALLÉES, A., & MAIRESSE, F. (2010). *Key concepts of museology.* Armand Colin.
- DIBA, K., KORDBACHEH, P., MIREHENDI, S. H., & al., e. (2007). *Identification of Aspergillus species using morphological characteristics.* in Pakistan Journal of Medical Sciences, vol. 23, nº 6. pp. 867-872.
- DICUS, D. (2013). *One Response to a Collection-Wide Mold Outbreak: How Bad can it be— How Good can it Get?* Journal of the American Institute for Conservation, vol. 39, nº1. pp. 85-105.
- DRAGO, F., & CHIBA, N. (2004). *Painting canvas synthesis.* The Visual Computer, nº 20. pp 314-328.
- EASTAUGH, N., WALSH, V., CHAPLIN, T., & et. al. (2004). *Pigment Compendium: a dictionary of historical pigments.* Oxford: Elsevier.
- EDRIS, A., & FARRAG, E. (2003). *Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase.* Nahrung/Food, vol. 47, Nº 2. pp. 117–12.
- ELFEKY, O., & HASSAN, M. (2007). *Artificial Aging and Deterioration of oil-painted Fabriano paper and cardboard paper supports.* Journal of Applied Polymer Science, vol. 109. pp. 1594-1603.
- ERHARDT, D., & MECKLENBURG, M. (1995). *Accelerated vs natural aging: effect of aging conditions ont the aging process of cellulose.* Materials Research Society Symposium Proceedings, vol. 352. pp. 247-270.
- FELLER, R. (1994). *Accelerated Aging - Photochemical and thermal aspects.* The Getty Conservation Institute.
- FELLER, R. L. (1985). Resins and the properties of varnishes. Em R. L. FELLER, N. STOLOW, & E. H. JONES, *On pictures varnishes and their solvents* (pp. 119-167). Washington: National Gallery of Art.

- FENG, W., & XIAODONG, Z. (2007). *Essential oils to control Alternaria Alternata in vitro and in vivo*. Food Control, nº 18. pp. 1126-1130.
- FERNANDES, P. (2007). *A biotecnologia na conservação do património cultural*. Revista Lusófona de Arquitectura e Educação nº2. pp. 119-126.
- FRANCE, F. (2009). *Best practice and standards in environmental preservation for cultural heritage institutions: goals, knowledge, gaps*. Advances in Paper Conservation Research. pp. 16-26.
- FRATERNALE, D., GIAMPERI, L., BUCCHINI, A., & et. al. (2005). *Composition and antifungal activity of essential oil of Salvia sclarea from Italy*. Chemistry of Natural Compounds, vol. 41, nº 5. pp. 604-606.
- GUICHEN, G. (1995). *La conservation préventive: un changement profond de mentalité*. Cahiers d'Étude, ICOM-CC. pp. 4-6.
- HAMMER, K., CARSON, C., & RILEY, T. (junho de 1999). *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Journal of Applied Microbiology. pp. 985-990.
- HERASCU, N., SIMILEANU, M., & RADVAN, R. (2008). *Color change in the artwork materials aged by uv radiation*. Romanian Reports in Physics, vol. 60, nº 1. pp. 95-103.
- INOUE, M., & KOYANO, M. (1991). *Fungal contamination of oil paintings in Japan*. International Biodeterioration, nº 28. pp. 23-35.
- KFOURY, M., AUEZOVA, L., GREIGE-GERGES, H., & et. al. (2016). *Development of a total organic carbon method for the quantitative determination of solubility enhancement by cyclodextrins: application to essential oils*. Analytica Chimica Acta, nº 918. pp. 21-25.
- KISHORE, G., & PANDE, S. (2007). *Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut*. Plant Disease, nº 91. pp. 375-379.
- KOESTLER, R., KOESTLER, V., CHAROLA, A., & et. al. (2003). (2003) *Art, biology and conservation: biodeterioration of works of art*. Nova Iorque: The Metropolitan Museum of Art.
- LADKIN, N. (2004). *Collections management*. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM- International Council of Museums. pp. 24.

- LAZZARI, M. L.-S., & et. al. (2011). *Plastic matters: an analytical procedure to evaluate the degradability of contemporary works of art*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, nº399. pp. 2939-2948.
- LAZZARI, M., & CHIANTORE, O. (1999). *Drying and oxidative degradation of linseed oil*. Polymer Degradation and Stability, nº 65. pp. 303-313.
- LEWIS, G. (2004). The role of museums and the professional code of ethics. Em ICOM/UNESCO., *Running a museum: a practical handbook* (p. 9). Paris: ICOM- International Council of Museums.
- LOPES, A. (2011). *Conservação preventiva: construção de uma "checklist" aplicada às áreas de exposição e reservas*. . Lisboa: Dissertação de mestrado em Museologia da Universidade Nova de Lisboa. pp. 9.
- LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. (2013). Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration. *Plos One*, vol. 8, pp. 1-13.
- LOPEZ-MIRAS, M., PIÑAR, G., ROMERO-NOGUERA, J., & et. al. (2012). *Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potencial*. Aerobiologia. pp. 1-13. Obtido de www.springerlink.com
- LUPE, F. (2007). *Estudo da composição química de oleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia*. Campinas: Dissertação de mestrado em Química Organica da Universidade Estadual de Campinas. .
- MALLEGOL, J., GARDETTE, J.-L., & LEMAIRE, J. (2000). *Long-Term Behavior of Oil-Based Varnishes and Paints. Photo- and Thermo-oxidation of Cured Linseed Oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, Vol. 77, n. 3. pp. 257-263.
- MANZANO, E., NAVAS, N., CHECA-MORENO, R., & et. al. (2009). *Preliminary study of UV ageing process of proteinaceous paint binder by FT-IR and principal component analysis*. Talanta, nº 77. pp. 1724-1731.
- MARENCO, E., LIPAROTA, M., ROBOTTI, E., & et. al. (2006). *Monitoring of paintings under exposure to uv light by ATR-FT-IR spectroscopy and multivariate control charts*. Vibrational Spectroscopy nº40. pp. 225-234.
- MARQUES, H. (2010). *A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles*. Flavour and Fragrance Journal. pp. 313-326.

- MARTIN-GIL, J., MARTIN-GIL, F., DELIBES-DE-CASTRO, G., & et. al. (1995). *The first known use of vermillion*. *Experientia*, nº 51. pp. 759-761.
- MAZZEI, P., CAPOZZOLI, A., MINICHIELLO, F., & et. al. (2005). *HVAC systems to control microclimate in the museums*. Proc. of the 2nd Mediterranean Congress of Climatization.
- MICHALSKY, S. (1987). *Damage to Museum Objects by Visible Radiation (Light) and Ultraviolet Radiation (UV)*. Londres: Museums Association, UKIC, and Group of Designers and Interpreters for Museums. pp. 3-16.
- MICHALSKY, S. (1997). *The lighting desision*. Ottawa: em, Fabric of an Exhibition, Preprints of Textile Symposium 97. pp. 97-104.
- MICHALSKY, S. (2004). Care and Preservation of Collections. Em ICOM/UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 57.
- MICHALSKY, S. (2004). Colletion preservation. Em ICOM-UNESCO, *Running a museum: a practical handbook*. Paris: ICOM - International Council of Museums. pp. 51-90.
- MICHALSKY, S. (2007). *The Ideal Climate, Risk Management, the ASHRAE Chapter, Proofed Fluctuations, and Toward a Full Risk Analysis Model*. Participação no "Experts' Roundtable on Sustainable Climate Management Strategies" em Tenerife, Spain.
- MICHALSKY, S. (s.d.). *Agent of Deterioration: Light, Ultraviolet and Infrared*. Canadian Conservation Institute. Disponível em <http://canada.pch.gc.ca/eng/1444925073140>.
- MIRONESCU, M., & GEORGESCU, C. (2010). Activity of some essential oils against comon spoilage fungi of buildings. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food tecnology vol XIX nº2*, pp. 41-46.
- MONICO, L., JANSSENS, K., MILIANI, C., & et. al. (2011). *The Degradation Process of Lead Chromate in paintings by Vincent van Gogh studied by means of Spectromicroscopic methods. Part IV: Artificial ageing of model samples of co-precipitates of lead chromate and lead sulfate*. *Analytical Chemistry*, vol. 83, nº 4. pp. 1214-1223.
- MURATA, Y., & OSAKABA, M. (2013). *The Busen-Roscoe reciprocity law in ultraviolet-B-induced mortality of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae*. *Journal of Insect Physiology* nº 59. pp. 241-247.
- OXENHAM, S., SVOBODA, K., & WALTERS, D. (2005). *Antifungal activity of the essential oil of basil (Ocimum basilicum)*. *Journal of Phytopathology*, nº 153. pp. 174–180.

- PAIVA, R., ROCHA, J. R., & CAVICCHIOLI, A. (2010). *Camaras climaticas para o envelhecimento acelerado: acção de microambientes sobre bens culturais*. Quimica Nova, vol. 33, nº1. pp. 189-194.
- PALMEIRÃO, J. (2013). *Santo Aurélio - uma Imagem Relicário da Sé catedral do Porto. Estudo e Conservação Integrada*. Dissertação de mestrado em Arte - Conservação e Restauro da Universidade Catolica do Porto.
- PANEK, M., REINPRECHT, L., & HULLA, M. (2014). *Ten essential oils for bleech wood protection - Efficacy againts wood-destroying Fungi and moulds, and effect on wood discoloration*. BioResources, vol 9, nº 3. pp. 5588-5603.
- PANER, C. M. (2012). Chemical control of fungi infesting easel oil paintings at the universe of Santo Tomas, Museum of Arts and Sciences. *Prime Journal of Microbiology Research* vol. 2, pp. 114-120.
- PAPLIAKA, Z., ANDRIKOPOULOS, K., & VARELLA, E. (2010). *Study of th stability of a series of synthetic colorants applied with styrene-acrylic copolymer, widely used in contemporary paintings, concerning the effects of accelerated ageing*. Journal of Cultural Heritage, nº 11. pp. 381-391.
- PAVLOGEORGATOS, G. (2003). *Environmental parameters in museums*. Building and Environment nº 38. pp. 1457–1462.
- PEREGO, F. (2005). *Dictionnaire des Matériaux du Peintre*. Paris: Éditions Belin.
- PEREIRA, A. (2012). *Caracterização da colonização microbiológica da pintura mural em três igrejas do Norte de Portugal. Estudo preliminar do crescimento microbiano, avaliação de biocidas e proposta de intervenção futura*. Dissertação de Mestrado em Arte - Conservação e Restauro da Universidade Catolica do Porto.
- PIEROSAN, M., PAULETTI, G., ROTA, L., & et. al. (2007). *Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species*. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, vol. 24, nº 4. pp. 764-770.
- PRADO, L. (2010). *Aspectos gerais e morfologicos de Alternaria sp*. Disponível em: http://fitopatologia1.blogspot.pt/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de_1889.html.
- RAKOTONIRAINY, M., & LAVEDRINE, B. (2005). *Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control biocontamination in libraries and archives storage areas*. International Biodeterioration and Biodegradation, nº 55. pp. 141-147.

- RAVIKUMAR, H. R., RAO, S. S., & KARIGAR, C. S. (2012). *Biodegradation of paints: a current status*. Indian Journal of Science and Technology, vol. 5, nº 1. pp. 1977-1987.
- REUVENI, R., FLEISCHER, A., & PUTIEVSKY, E. (1985). *Fungistatic activity of essential oils from Ocimum basilicum chemotypes*. Contribution to the Agricultural Research Organization, Israel.
- RIE, E. (1988). *Photochemical and thermal degradation of films of dammar resin*. Studies in Conservation, vol. 33, nº 2. pp. 53-70.
- ROMERO-NOGUERA, J., MARTIN-SANCHEZ, I., LOPEZ-MIRAS, M., & et. al. (2010). *Biodeterioration patterns found in dammar resin used as art material*. in Microbial Biotechnology, Vol. 13, nº 3.
- ROY (ed), A. (1993). *Artists' Pigments: A handbook of their history and characteristics*. Washington: National Gallery of art, vol 2. pp. 159-181.
- RUSSO, A., FORMISANO, C., RIGANO, D., & et.al. (2013). *Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (Salvia officinalis L.) grown in different environmental conditions*. Food and Chemical Toxicology, nº 55. pp. 42-47.
- SAMSON, R., VISAGIE, C., HOUBRAKEN, J., & et. al. (2014). *Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus*. in Studies in Mycology nº78. pp. 141-173.
- SANTOS, S. (2014). *Francisco Correia, o mesmo nome para dois pintores maneiristas. Estudo artistico e tecnicos-material das suas obras, documentadas e atribuidas*. Porto: Tese de Doutoramento em Estudos do Patrimonio, Universidade Catolica do Porto.
- SAUNDERS, D. (1989). *Ultra-violet filters for artificial light sources*. National Gallery Technical Bulletin, vol. 13. pp. 61-68.
- SCHANDA, J. (2007). *Colorimetry. Understanding the CIE System*. Nova Jersey: Wiley.
- SILVA, M. (2011). *Analytical study of accelerated light ageing and cleaning effects on acrylic and PVAc dispersion paints used in Modern and Contemporary Art*. Valencia: Tese de Doutoramento da Universidade Politecnica de Valencia.
- SMITH, G. (2006). Aging characteristics of a contemporary acrylic emulsion used in artists' paints. Em G. C. Institute, *Modern Paints Uncovered*. Londres: Proceedings from the Modern Paints Uncovered Symposium. pp. 236-246.

- SOKOVIC, M., VUKOJEVIC, J., MARIN, P., & et. al. (2009). *Chemical Composition of Essential Oils of Thymus and Mentha Species and Their Antifungal Activities*. *Molecules*, vol. 14, nº1. pp. 238-249.
- STERFLINGER, K. (2010). *Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage*. *Fungal Biology Reviews*, nº 24. pp. 47-55.
- TIAN, X.-N., JIANG, Z.-T., & LI, R. (2008). *Inclusion interactions and molecular microcapsule of Salvia sclarea L. essential oil with b-cyclodextrin derivatives*. *European Food Research and Technology*, nº 227. pp. 1001–1007.
- TORO-SANCHEZ, C., & et. al. (2010). *Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, nº 67. pp. 431-441.
- TULLIO, V., NOSTRO, A., MANDRAS, N., & et. al. (2007). *Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods*. *Journal of Applied Microbiology*, nº 102. pp. 1544–1550.
- VARGAS, H. (2008). *Estudo do envelhecimento de aglutinantes em temperas proteicas por cromatografia líquida de elevada eficiência*. Lisboa: Dissertação de mestrado em Química da Universidade Técnica de Lisboa.
- VENTURINI, C., & et. Al. . (2008). *Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas*. *Química Nova*, Vol. 31, nº2. pp- 360-368.
- VERMA, R., CHAURASIA, L., & KATIYAR, S. (2008). *Potential antifungal plants for controlling building fungi*. *Natural Product Radiance*, vol 7, nº 4. pp. 374-387.
- VIUDA-MARTOS, M., MOHAMADY, M., FERNANDEZ-LOPEZ, J., & et. al. (2011). *In vitro antioxidant and antibacterial activitie of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants*. *Food Control*, nº22. pp. 1715-1722.
- VODOPIVEC, J. (2008). *Preservation and risk assessment in archival depos*. Trieste: Atlanti, vol. 18. pp. 181-186.
- VUKOJEVIC, J., & GRBIC, M. (4 de Julho de 2010). *Moulds on paintings in Serbian fine arts museums*. *African Journal of Microbiology Research*. vol. 4. pp. 1453-1456.
- WHITMORE, P. M., & COLALUCA, V. G. (1995). *The natural and accelerated aging of an acrylic artists' medium*. *Studies in Conservation*, nº 40. pp. 51-64.

- WOUDEBERG, J., GROENEWALD, J., BINDER, M., & et. al. (2013). *Alternaria redefined*. in *Studies in Micology* n° 75. pp. 171-212.
- ZHANG, J.-Q., JIANG, K.-M., XIE, X.-G., & et. al. (2016). *Water-soluble inclusion complexes of trans-polydatin by cyclodextrin complexation: preparation, characterization and bioactivity evaluation*. *Journal of Molecular Liquids*, n° 219. pp. 592-598.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Tabela de medição de intensidade luminosa

A tabela seguinte apresenta os valores obtidos nas medições de intensidade luminosa com recurso a um luxímetro LI-1000 Datalogger. O sensor foi colocado em cinco zonas diferentes (Z), nos quatro cantos e no centro do tabuleiro onde se encontravam as amostras, e mantendo a porta da camara fechada durante as medições para evitar interferências externas. Registaram-se os valores de intensidade a cada 10 segundos durante 1 minuto, totalizando cinco medições (M) por zona. O equipamento regista os valores em Photons, sendo que após se realizar a média de cada zona de medição, foi feito o calculo de conversão para a unidade de Lux utilizando as tabelas de conversão e o calculo automático disponível no web site de Environmental Growth Chambers.²⁵¹

Tabela 5 - Medição de intensidade luminosa.

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
M1	67,33	67,95	68,86	72,79	86,69
M2	67,54	68,13	68,71	72,30	86,32
M3	67,28	68,21	68,42	71,6	86,45
M4	67,30	67,95	68,43	71,07	86,37
M5	67,15	68,07	68,51	70,72	86,53
Média	67,32	68,06	68,58	71,69	86,47
Média Geral	72,42 Photons				
Conversão	5359,08 Lux				

²⁵¹ http://www.egc.com/useful_info_lighting.php

APÊNDICE 2

Valores L*a*b* dos pigmentos seleccionados para FTIR

NEGRO DE OSSOS (grupo B – verniz não envelhecido)

Alterações do colorímetro:²⁵²

- ΔE^* (variação total da cor): 2,10
- ΔL^* : variação indica que amostra está mais escura que padrão
- Δa^* : variação indica que amostra está mais verde que padrão
- Δb^* : variação indica que amostra está mais amarela que padrão

Tabela 6 - Valores L*a*b* do negro de ossos do grupo B.

Provete	Parâmetros	M1	M2	M3	Média
Negro B (teste)	L*	22,67	23,31	22,64	22,87
	a*	1,93	1,90	1,92	1,92
	b*	-1,16	-1,23	-1,16	-1,18
Negro B (controlo)	L*	25,13	24,88	24,86	24,96
	a*	2,06	1,97	1,82	1,95
	b*	-1,50	-1,51	-1,44	-1,48

²⁵² As variações de cor são definidas pela diferença numérica de cada parâmetro entre amostra e padrão. Os resultados são traduzidos em ΔL^* = diferença de claro e escuro (+ = mais claro, - = mais escuro), Δa^* = diferença de vermelho e verde (+ = mais vermelho, - = mais verde) e Δb^* = diferença de amarelo e azul (+ = mais amarelo, - = mais azul)

VERMELHÃO (grupo C – verniz envelhecido)

Alterações do colorímetro:

- ΔE^* (variação total da cor): 1,09
- ΔL^* : variação indica que amostra está mais clara que padrão
- Δa^* : variação indica que amostra está mais vermelha que padrão
- Δb^* : variação indica que amostra está mais amarela que padrão

Tabela 7 - Valores L*a*b* do vermelhão do grupo C.

Provete	Parâmetros	M1	M2	M3	Média
Vermelhão C (teste)	L*	47,35	47,71	47,89	47,65
	a*	49,71	50,02	49,43	49,72
	b*	30,53	30,82	29,87	30,40
Vermelhão C (controlo)	L*	46,48	46,97	47,42	46,96
	a*	49,03	49,10	49,15	49,09
	b*	30,32	30,46	28,72	29,83

OCRE AMARELO (grupo C - verniz envelhecido)

Alterações do colorímetro:

- ΔE^* (variação total da cor): 0,12
- ΔL^* : variação indica que amostra está mais escura que padrão
- Δa^* : variação indica que amostra está mais verde que padrão
- Δb^* : variação indica que amostra está mais azul que padrão

Tabela 8 - Valores $L^*a^*b^*$ do ocre amarelo do grupo C.

Provete	Parâmetros	M1	M2	M3	Média
Ocre amarelo C (teste)	L^*	47,29	47,50	47,29	47,36
	a^*	12,23	12,05	12,02	12,10
	b^*	30,04	30,12	30,20	30,12
Ocre amarelo C (controlo)	L^*	47,29	47,40	47,59	47,43
	a^*	12,30	12,07	12,05	12,14
	b^*	30,32	30,46	29,87	30,22

APÊNDICE 3

Imagens de Microscopia Óptica

Grupo A – Provetes sem camada de verniz

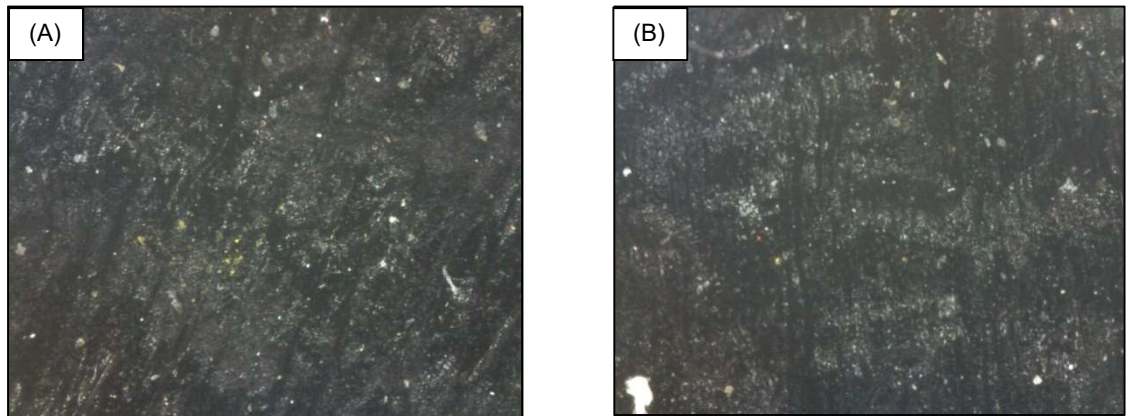


Figura 22 - Microscopia óptica de Negro de Ossos. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

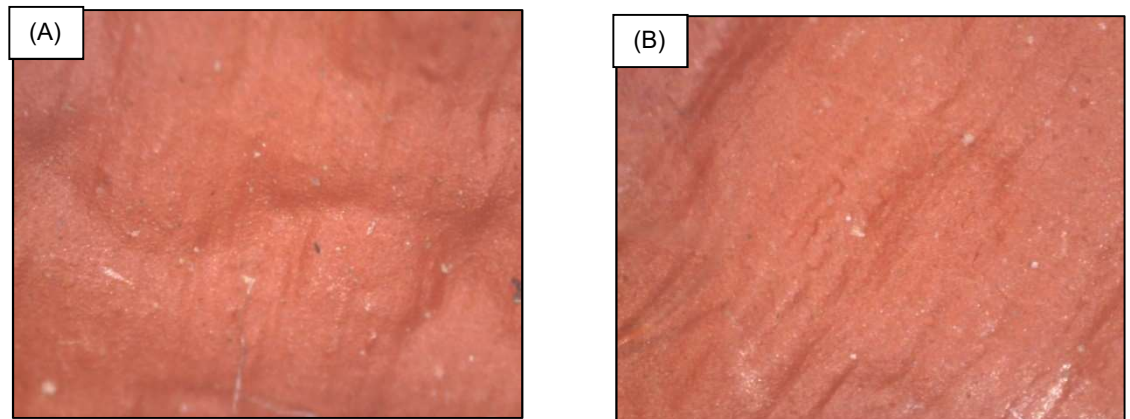


Figura 23 - Microscopia óptica de Vermelhão. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

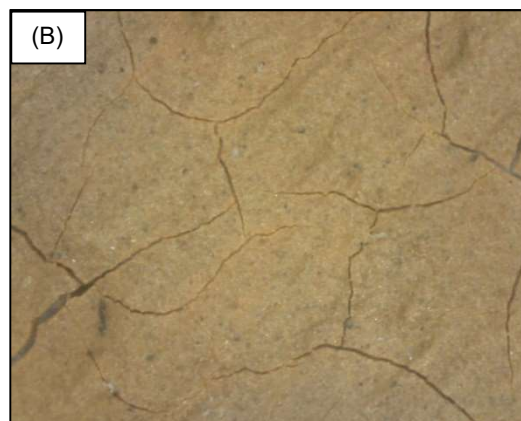
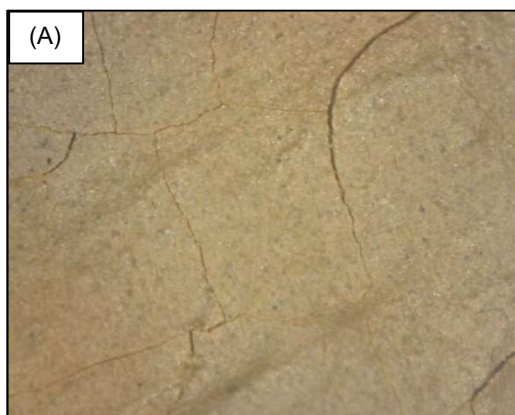


Figura 24 - Microscopia óptica de Ocre Amarelo. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Grupo B – Provetes com camada de verniz não envelhecido

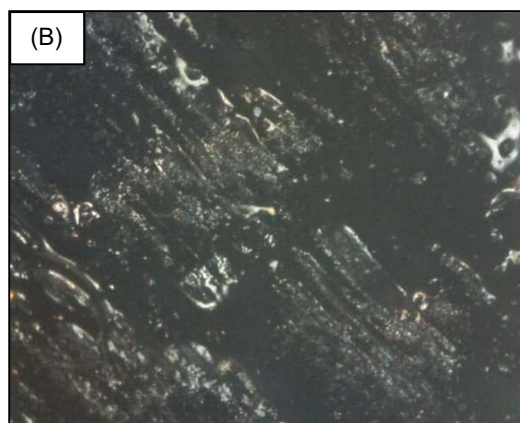
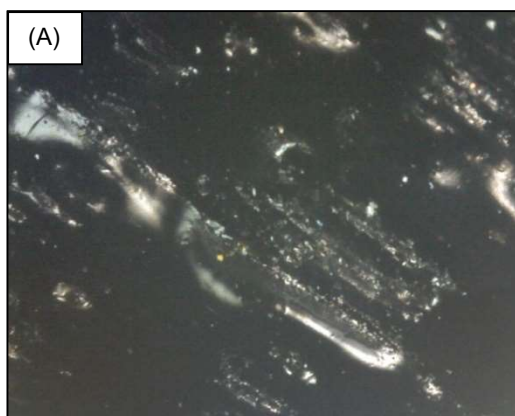


Figura 25 - Microscopia óptica de Negro de Ossos. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

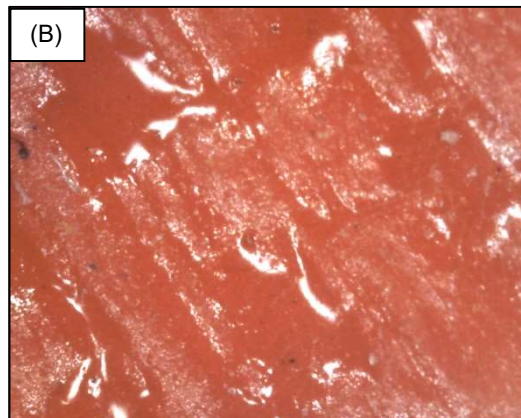
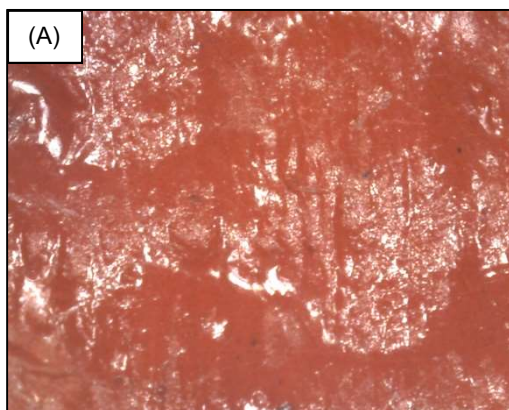


Figura 26 - Microscopia óptica de Vermelho. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

Grupo C – Provetes com camada de verniz envelhecido artificialmente

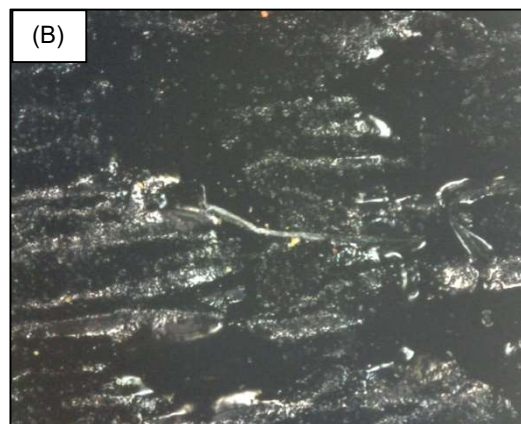


Figura 27 - Microscopia óptica de Ocre Amarelo. Amostra de teste (A) e de controlo (B).

APÊNDICE 4

Inquérito de avaliação de alteração visual

Avaliação de alteração Visual

Avaliação subjectiva a olho nu de alterações visuais de provetes de pintura sujeitas a compostos voláteis de óleo essencial de sálvia.

Inquérito inserido na tese de Mestrado em Conservação e Restauro de Bens Culturais – Especialização em Pintura – de Maria Albuquerque da Quinta.

Foi realizado um ensaio laboratorial para testar as reacções dos provetes de pintura quando expostos aos compostos voláteis do óleo essencial de sálvia.

Os pigmentos seleccionados para esta experiência foram o negro de ossos, o vermelhão e o ocre amarelo. Os provetes foram divididos em três grupos, sendo que o grupo A não contem verniz de protecção, o grupo B apresenta uma camada de verniz de protecção recente e o grupo C contem uma camada de verniz de protecção e foi sujeito a processos de envelhecimento acelerado.

Para este inquérito serão apresentadas para comparação dois provetes de cada grupo, sendo o numero 1 o provete testado e o numero 2 o provete de controlo (não sujeitos a tratamento).

Este inquérito é confidencial. Por razões estatísticas serão apenas registados a idade e profissão de cada participante.

Idade:

Profissão:

INQUÉRITO

Parte I.

Considere os provetes dos grupos A, B e C.

1. Detecta diferenças a nível de COR entre o provete 1 e o provete 2?
Classifique a alteração usando a escala de 0 a 5.

Grupo A						Grupo B						Grupo C					
0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5

0 – Nada a assinalar / 5 – Muita diferença

- 1.1.** Caso considere que existem diferenças, como descreveria essa alteração de COR?

Grupo A			
Amarelecimento	Esbatimento	Escurecimento	Outro:
Grupo B			
Amarelecimento	Esbatimento	Escurecimento	Outro:
Grupo C			
Amarelecimento	Esbatimento	Escurecimento	Outro:

1.2. Qual a cor onde considera que a alteração é mais perceptível?

Grupo A			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas
Grupo B			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas
Grupo C			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas

Parte II.

Considere os provetes dos grupos A, B e C.

2. Detecta diferenças a nível do estado da SUPERFICIE entre o provete 1 e o provete 2? Classifique a alteração usando a escala de 0 a 5.

Grupo A						Grupo B						Grupo C					
0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5

0 – Nada a assinalar / 5 – Muita diferença

2.1. Caso considere que existem diferenças, como descreveria essa alteração de SUPERFÍCIE?

Grupo A			
Fissuras	Perda de coesão do suporte	Aspecto frágil	Outro:
Grupo B			
Fissuras	Perda de coesão do suporte	Aspecto frágil	Outro:
Grupo C			
Fissuras	Perda de coesão do suporte	Aspecto frágil	Outro:

2.2. Qual a cor onde considera que a alteração é mais perceptível?

Grupo A			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas
Grupo B			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas
Grupo C			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas

Parte III.

Considere apenas os provetes dos grupos B e C.

3. Detecta diferenças a nível do estado da BRILHO entre o provete 1 e o provete 2? Classifique a alteração usando a escala de 0 a 5.

Grupo B						Grupo C					
0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5

0 – Nada a assinalar / 5 – Muita diferença

3.1. Caso considere que existem diferenças, como descreveria essa alteração de BRILHO?

Grupo B			
Amarelecimento	Perda de brilho	Escurecimento	Outro:
Grupo C			
Amarelecimento	Perda de brilho	Escurecimento	Outro:

3.2. Qual a cor onde considera que a alteração é mais perceptível?

Grupo B			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas
Grupo C			
Preto	Vermelho	Amarelo	Todas

Parte IV.

Considere os provetes dos *grupos A, B e C.*

- 4. Para além das mencionadas, considera que existem outras alterações visíveis entre os provetes?**

Grupo A	
Sim	Não
Quais:	
Grupo B	
Sim	Não
Quais:	
Grupo C	
Sim	Não
Quais:	

APÊNDICE 5

Avaliação de alteração visual - divisão por grupos etários e área profissional

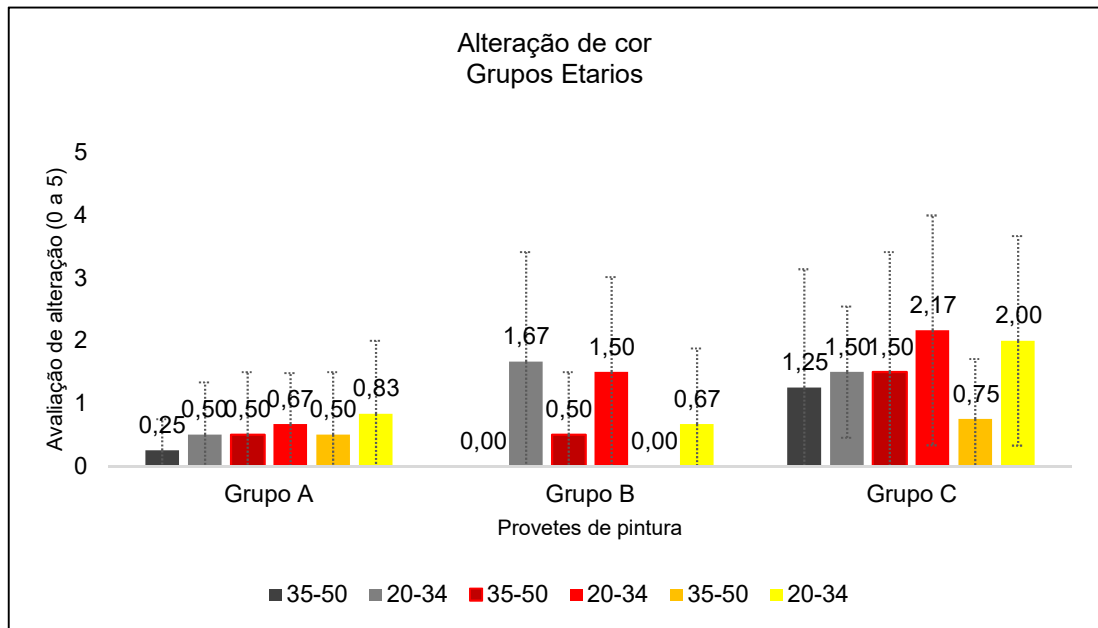


Figura 28 – Divisão por grupos etários da avaliação quantitativa de alteração na cor: valores médios e respectivo desvio-padrão.

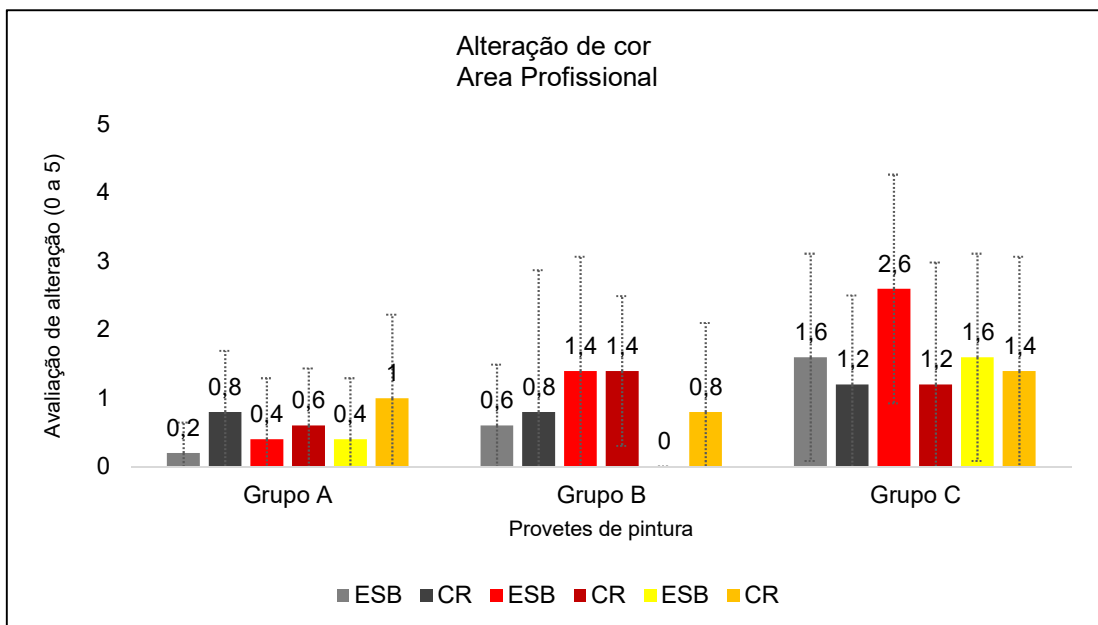


Figura 29 - Divisão por área profissional da avaliação quantitativa de alteração na cor: valores médios e respectivo desvio-padrão.

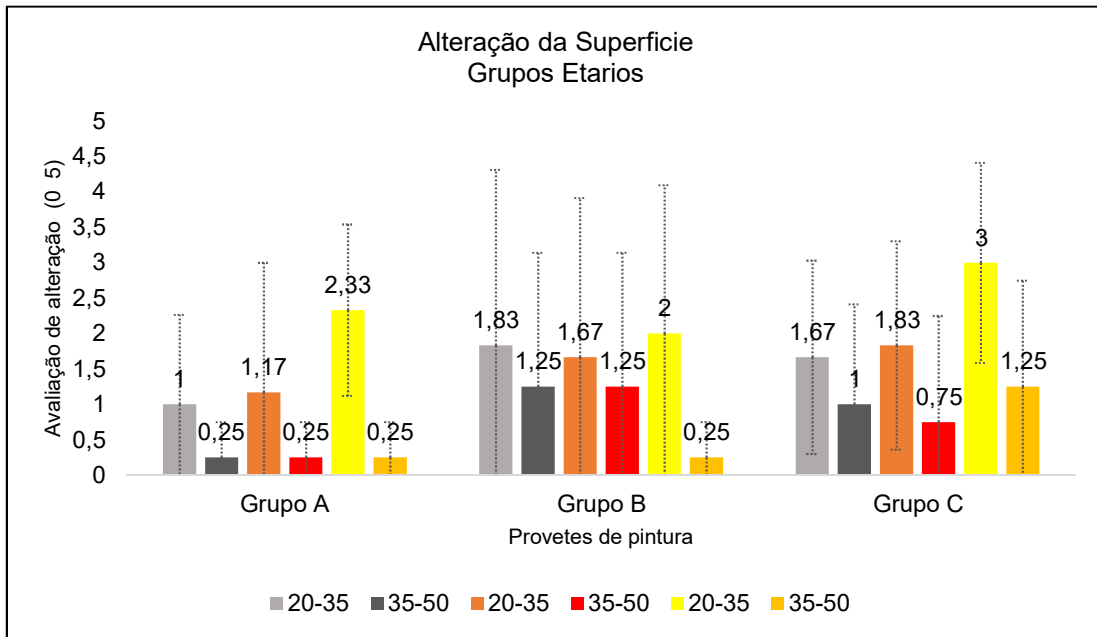


Figura 30 - Divisão por grupos etários da avaliação quantitativa de alteração na superfície: valores médios e respectivo desvio-padrão.

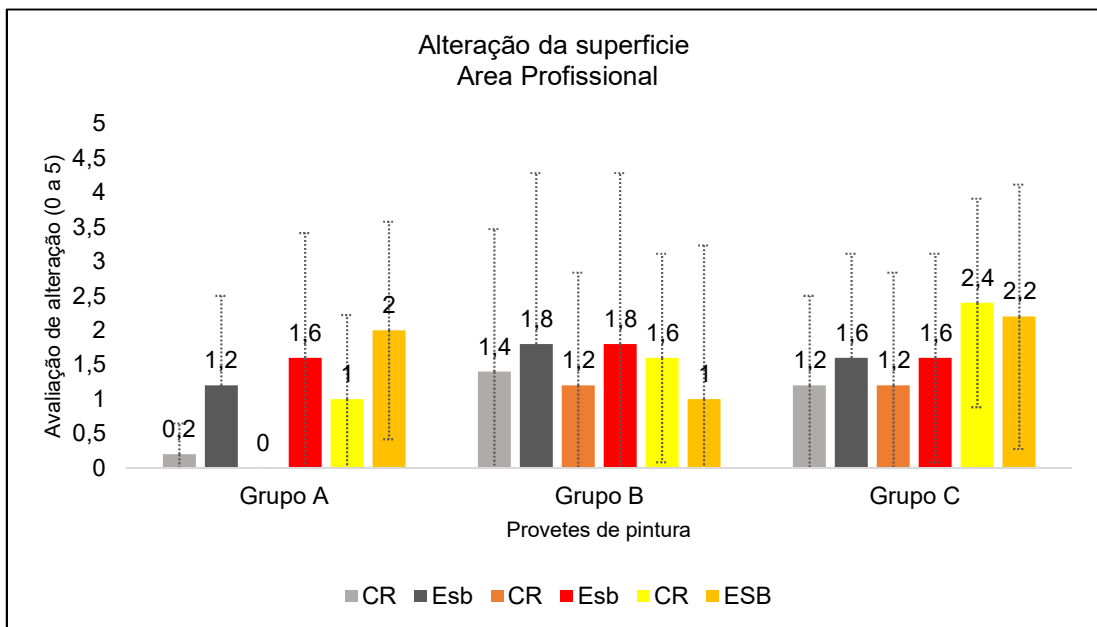


Figura 31 - Divisão por área profissional da avaliação quantitativa de alteração na superfície: valores médios e respectivo desvio-padrão.

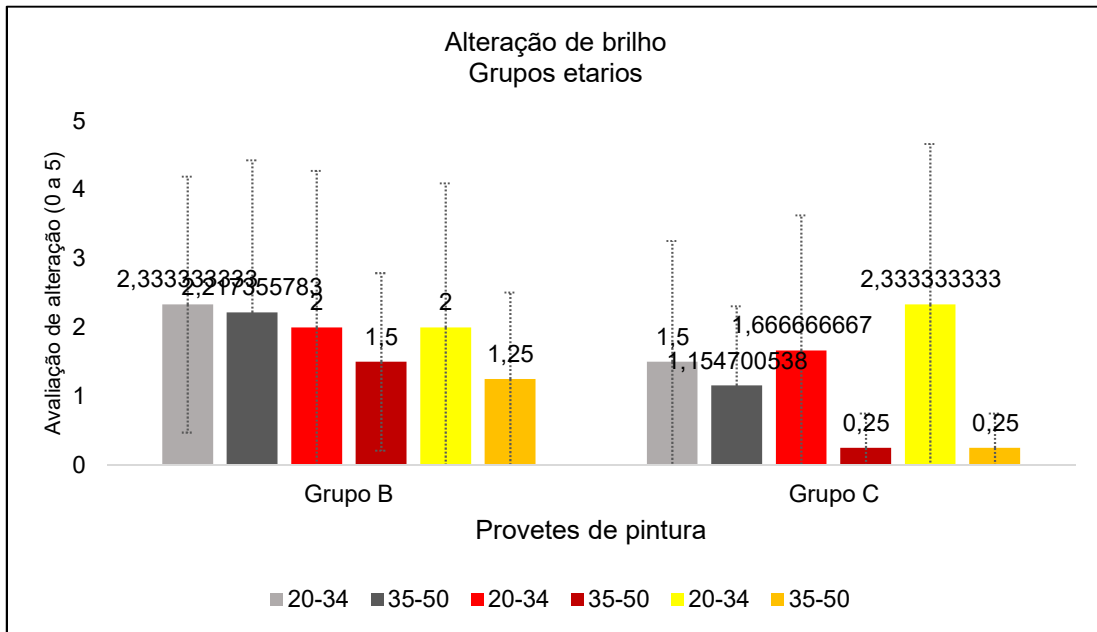


Figura 32 - Divisão por grupos etários da avaliação quantitativa de alteração no brilho: valores médios e respectivo desvio-padrão.

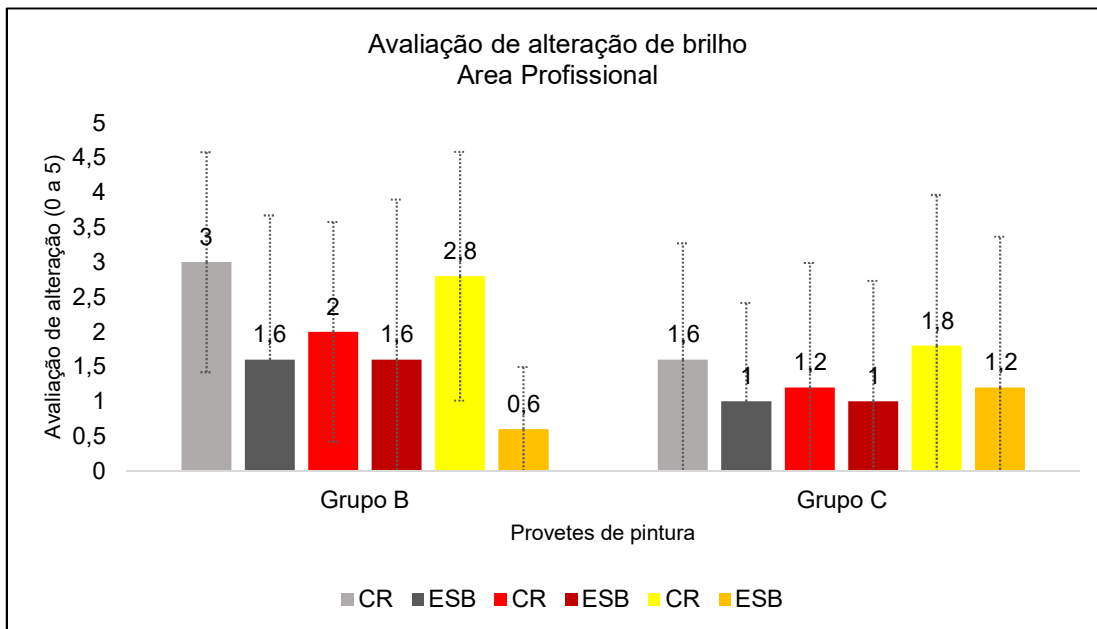


Figura 33 - Divisão por área profissional da avaliação quantitativa de alteração no brilho: valores médios e respectivo desvio-padrão.

APÊNDICE 5

Espectros de FTIR

Negro de Ossos (Grupo B - Provetes com camada de verniz não envelhecido)

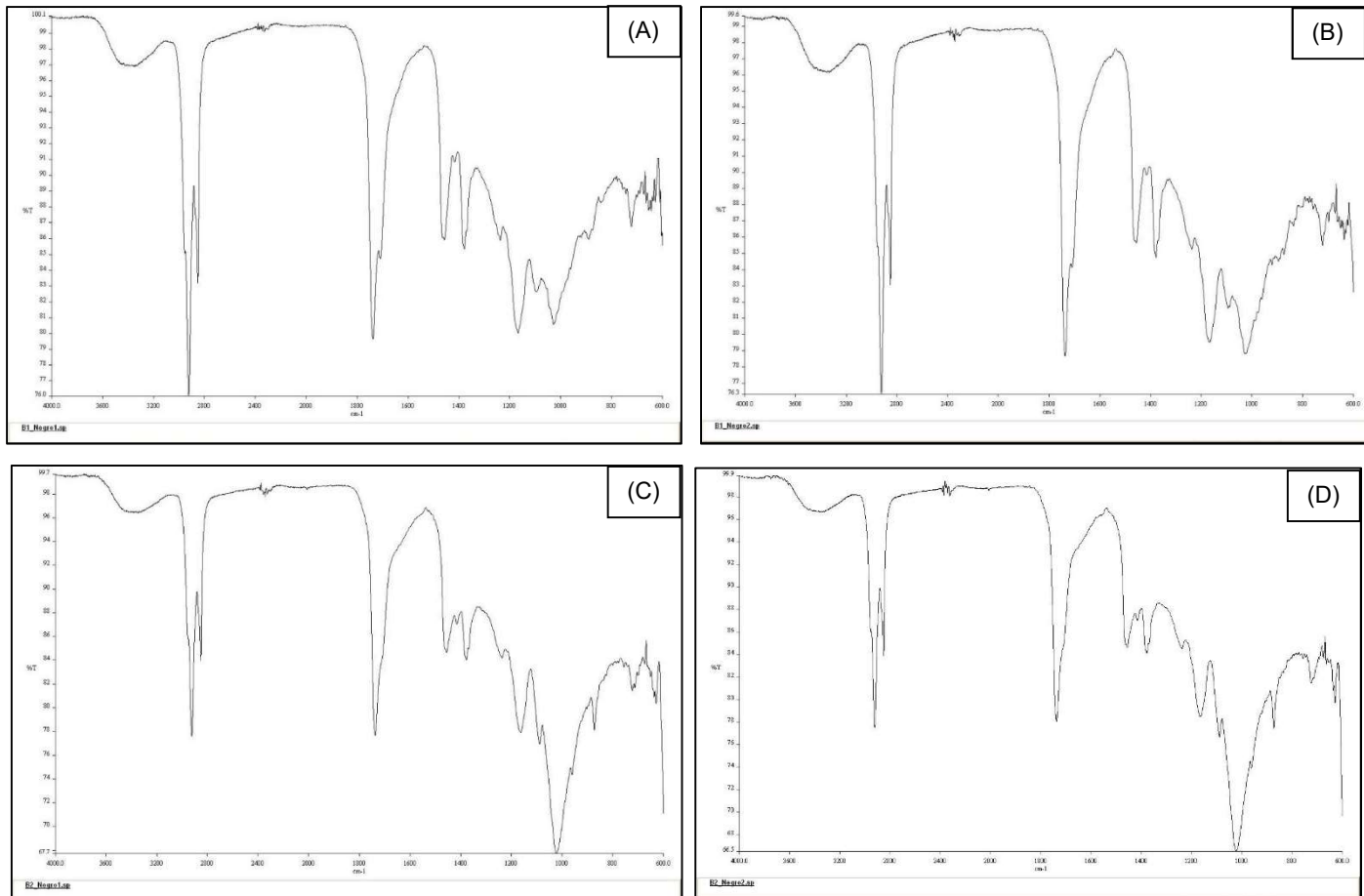


Figura 34 - Espectros de FTIR do negro de ossos (grupo B). Duplicados de teste (A, B, C, D).

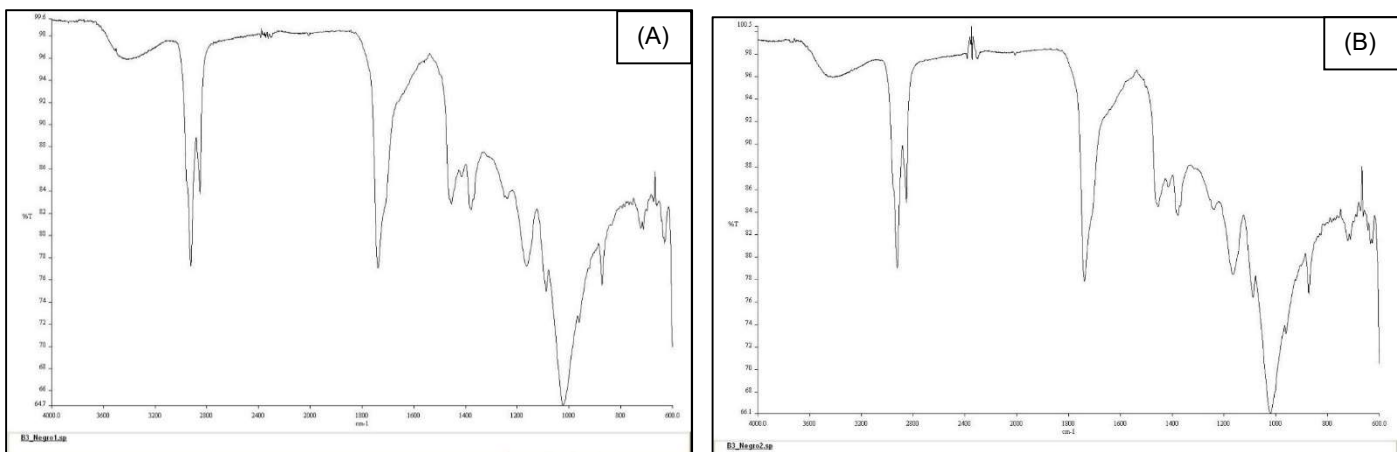


Figura 35 - Espectros de FTIR do negro de ossos (grupo B). Duplicados de controlo (A, B).

Vermelhão (Grupo C - Provetes com camada de verniz envelhecido artificialmente)

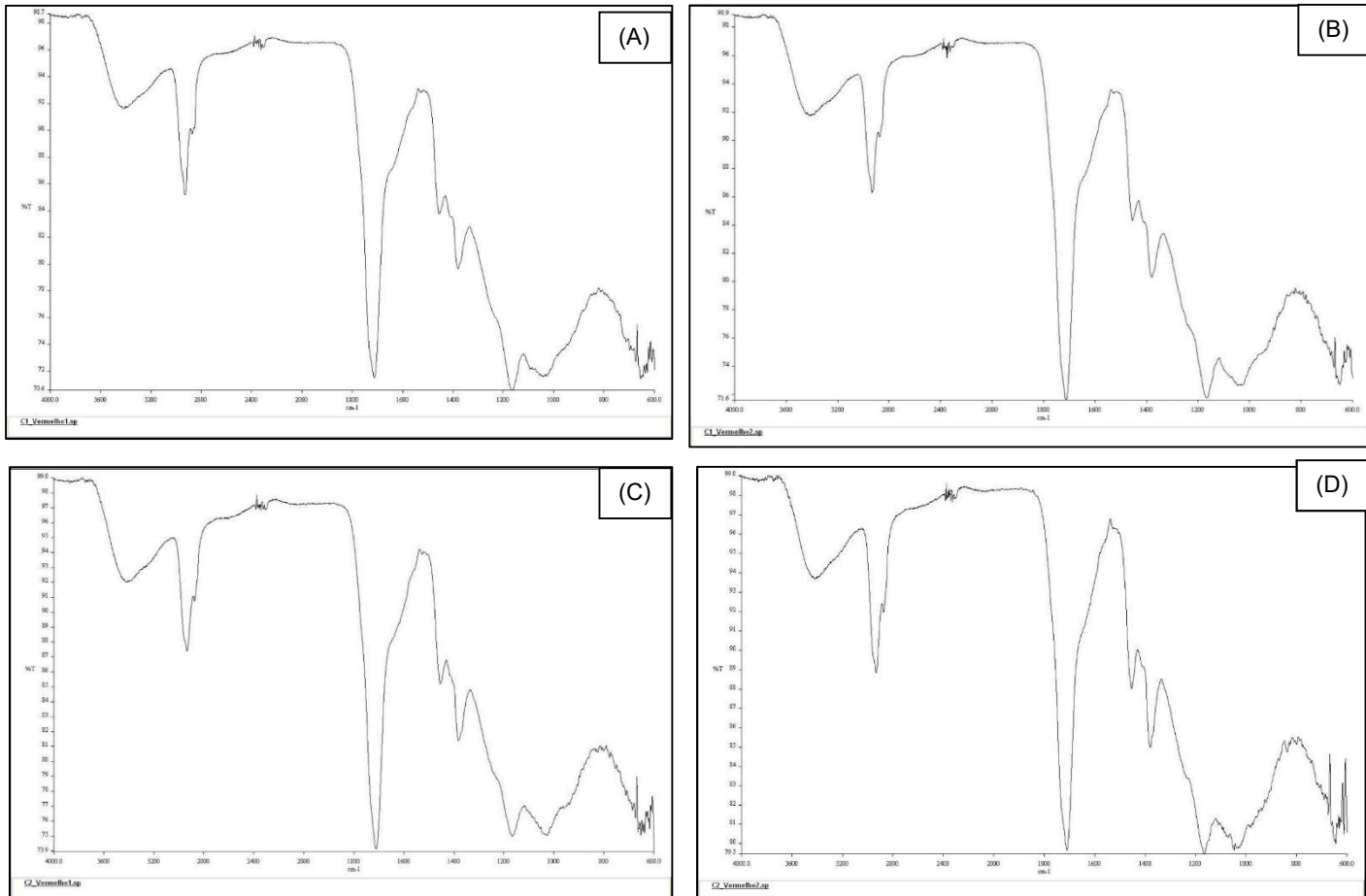


Figura 36 - Espectros de FTIR do vermelhão (grupo C). Duplicados de teste (A, B, C, D).

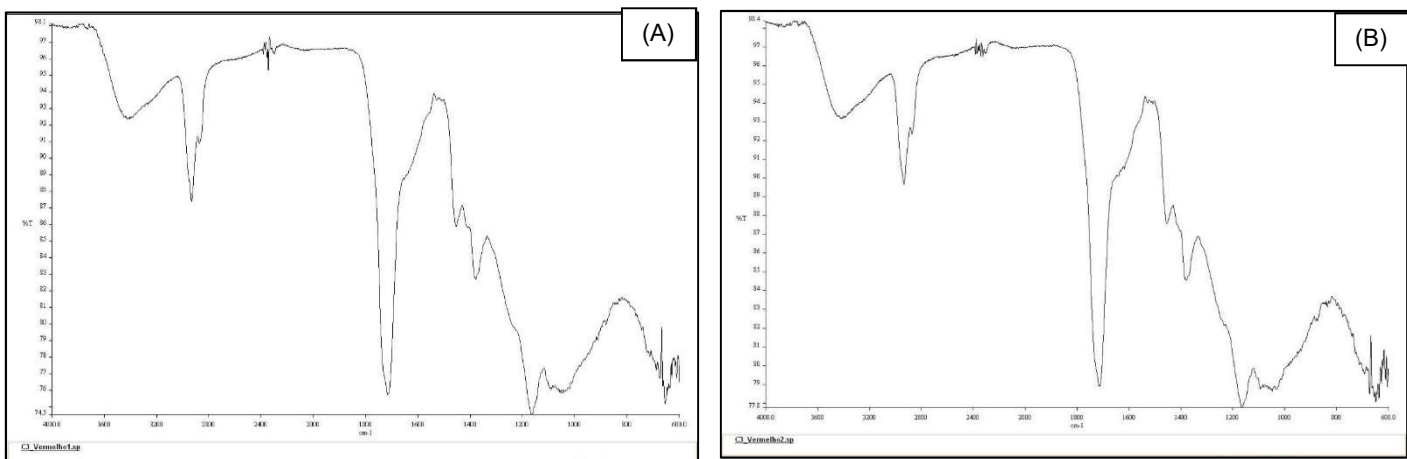


Figura 37 - Espectros de FTIR do vermelhão (grupo C). Duplicados de controle (A, B).

Ocre amarelo (Grupo C - Provetes com camada de verniz envelhecido artificialmente)

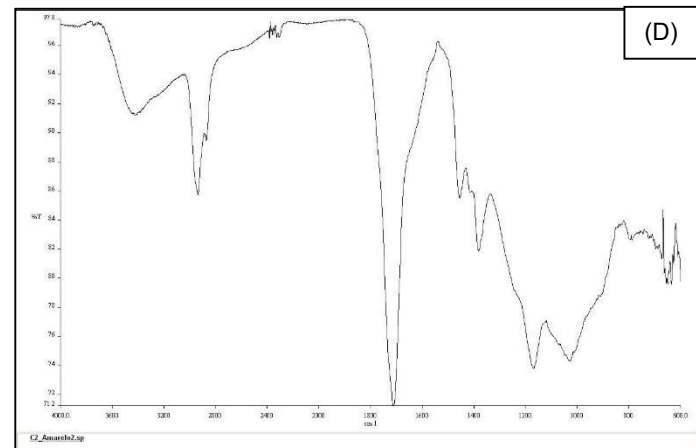
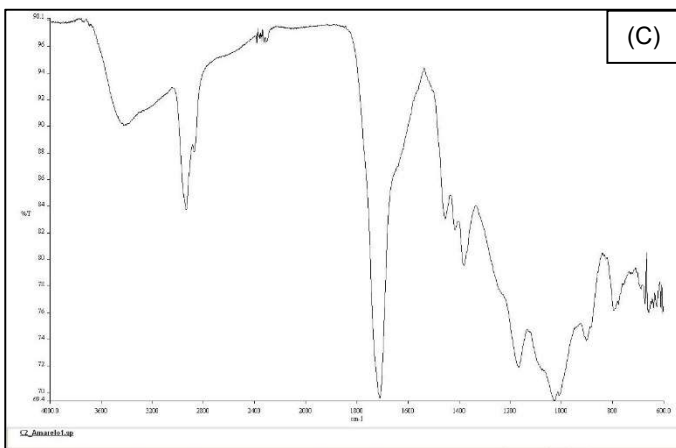
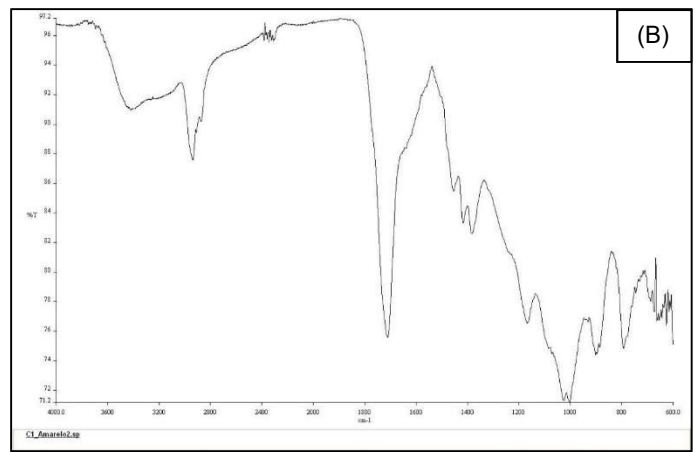
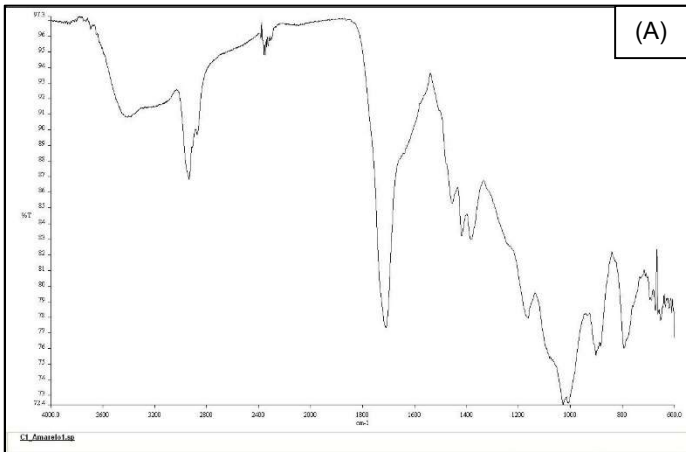


Figura 38 - Espectros de FTIR do ocre amarelo (grupo C). Duplicados de teste (A, B, C, D).

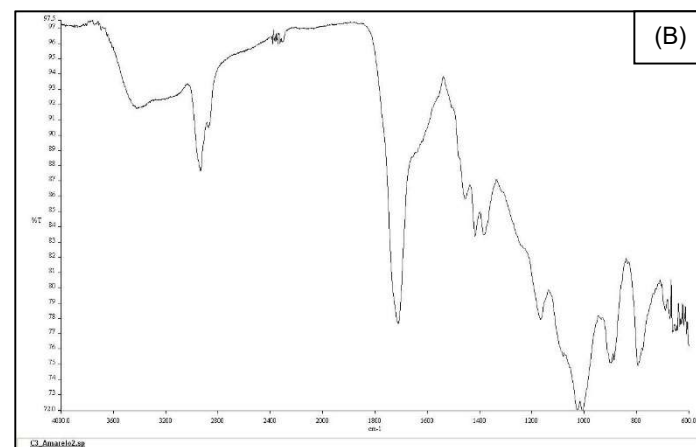
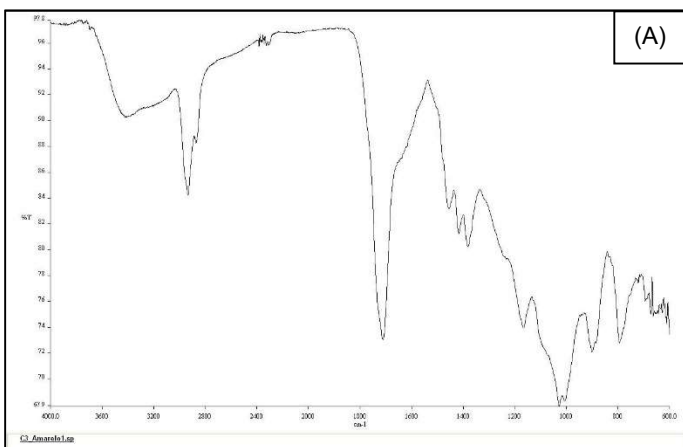


Figura 39 - Espectros de FTIR do ocre amarelo (grupo C). Duplicados de controle (A, B).

APÊNDICE 7

Controlos fotográficos de crescimento de *Penicillium chrysogenum*

Controlo de crescimento fúngico – 24 horas

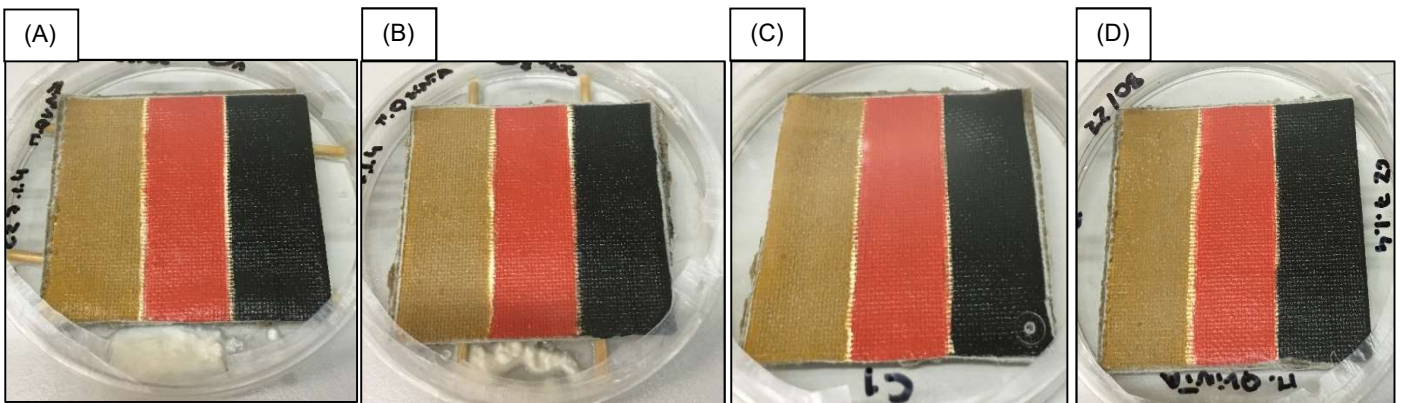


Figura 40 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Controlo de crescimento fúngico – 72 horas

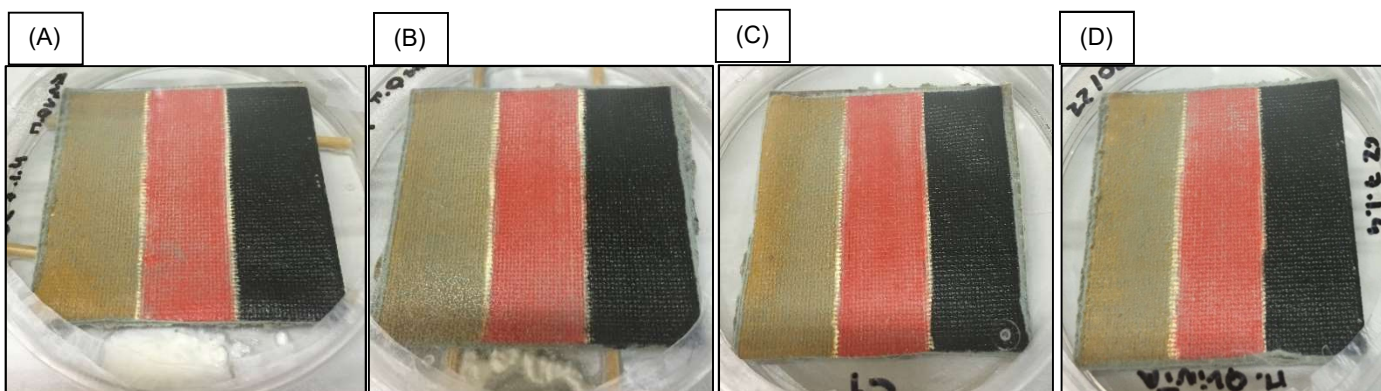


Figura 41 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Controlo de crescimento fúngico – 96 horas

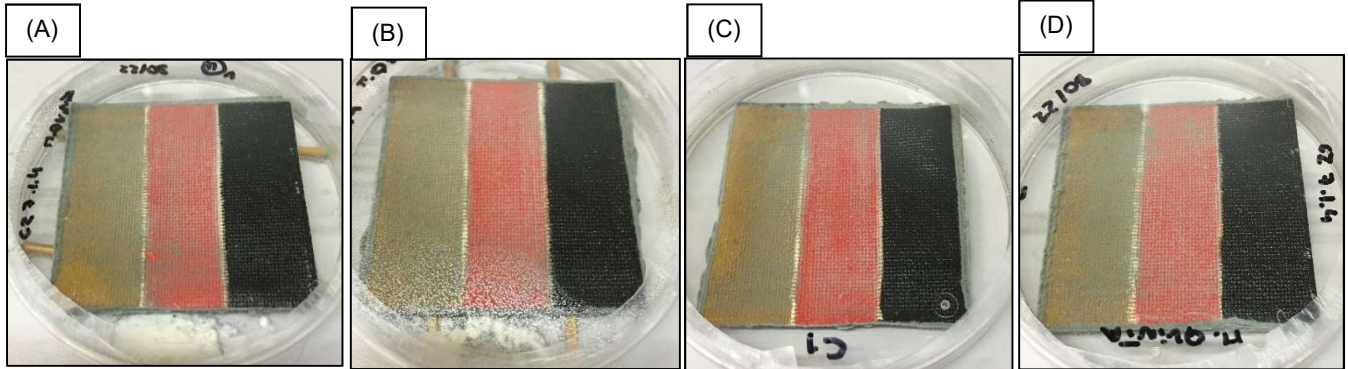


Figura 42 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Controlo de crescimento fúngico – 120 horas

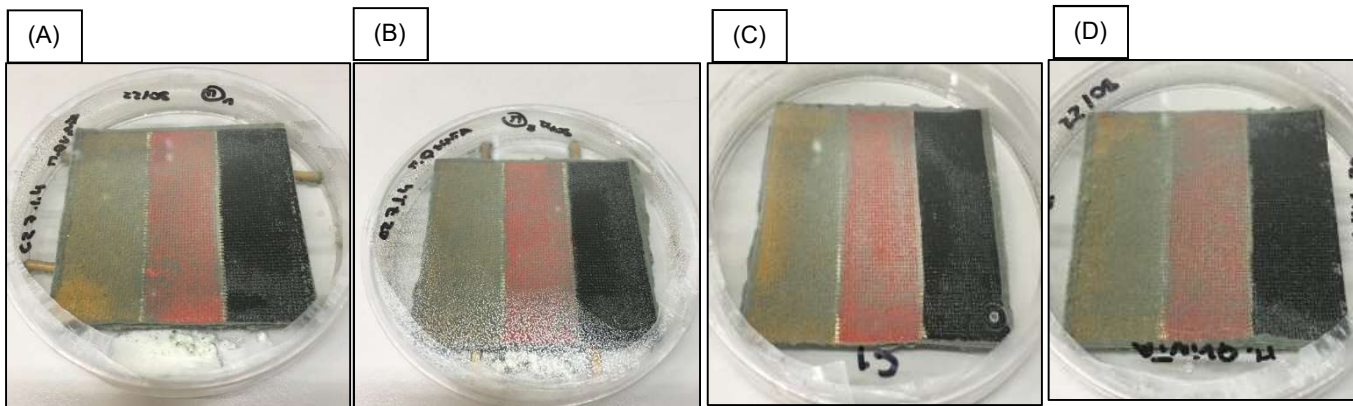


Figura 43 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).

Controlo de crescimento fúngico – 144 horas

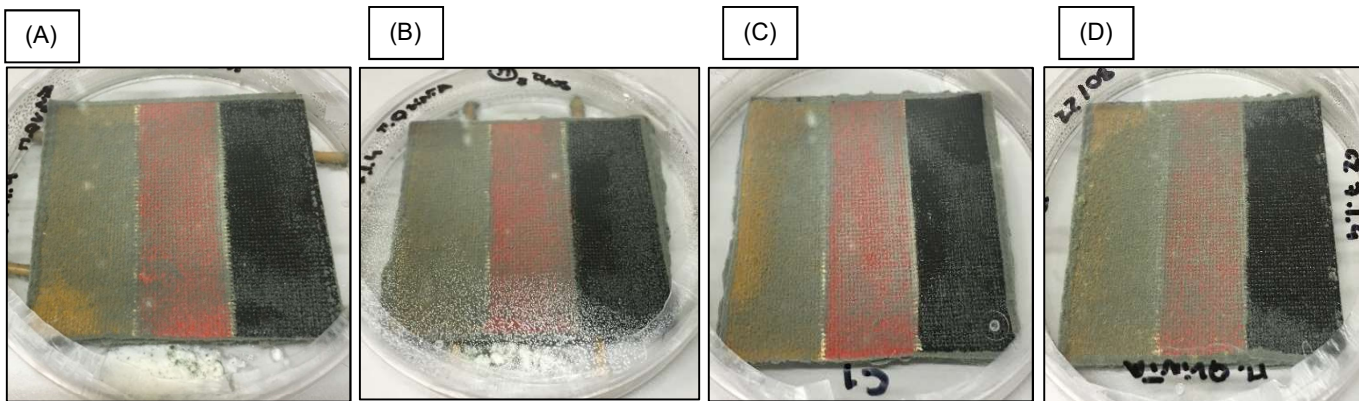


Figura 44 - Controlo de crescimento fúngico nos provetes de teste (A, B) e de controlo (C, D).