Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em

Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Diogo Simas Bernardes Dias

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM PATRIMÔNIOS HISTÓRICOS E ARGAMASSA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES ATMOSFÉRICAS

Rio de Janeiro

2016

Diogo Simas Bernardes Dias

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM PATRIMÔNIOS HISTÓRICOS E ARGAMASSA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES ATMOSFÉRICAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras:
Eliana Flávia Camporese Sérvulo, DSc. EQ/UFRJ
Márcia Teresa Soares Lutterbach, DSc. INT/MCT
Cristiana Cravo-Laureau, DSc. EEM/UPPA

Rio de Janeiro
2016

CIP - Catalogação na Publicação

S541a

Simas Bernardes Dias, Diogo
Avaliação da Diversidade Microbiana em Patrimônios Históricos e Argamassa sob Diferentes Condições Atmosféricas / Diogo Simas Bernardes Dias. -- Rio de Janeiro, 2016.
172 f.

Orientador: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.
Coorientador: Márcia Teresa Soares Lutterbach.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2016.

1. Biofilmes. 2. Conservação de patrimônios. 3. Museu Nacional do Rio de Janeiro. 4. Museu de Arte Contemporânea. 5. Ensaios de biodeterioração. I. Camporese Sérvulo, Eliana Flávia, orient. II. Soares Lutterbach, Márcia Teresa, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM PATRIMÔNIOS HISTÓRICOS E ARGAMASSA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES ATMOSFÉRICAS

Diogo Simas Bernardes Dias

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor (DSc) em Ciências.

Aprovada em 04/11/2016.

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, DSc. Orientadora- Presidente (EQ-UFRJ)

Márcia Teresa Soares Lutterbach, DSc. Co-orientadora (INT/MCT)

Cristiana Cravo-Laureau, DSc. Co-~~orientado~~ra (EEM/UPPA)

Ladimir José de Carvalho, DSc. (EQ-UFRJ)

Luiz Carlos Bertolino, DSc. (CETEM)

Aike Costa da Silva, DSc. (CCS-UFRJ)

Selma Gomes Ferreira Leite, DSc. (EQ-UFRJ)

Simone Louise Delarue Cezar Brasil, DSc. (EQ-UFRJ)

RESUMO

Dias, Diogo Simas Bernardes. **Avaliação da diversidade microbiana em patrimônios históricos e argamassa sob diferentes condições atmosféricas.** Tese de Doutorado programa Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Os patrimônios culturais quando expostos ao ar livre estão sujeitos ao processo de desgaste natural, em razão de diferentes fatores, tais como, chuva, vento e poluição atmosférica. Além dos efeitos diretos, podem carrear pequenos fragmentos de origem vegetal, animal, minerais, esporos e células microbianas, que podem se fixar às imperfeições e poros das superfícies, criando um ambiente propício para o desenvolvimento de biofilmes, acelerando o processo de deterioração da argamassa. A deterioração de bens culturais é um processo que apresenta diferentes lacunas para seu entendimento e desperta pouco interesse, embora comprometa o legado histórico para as futuras gerações. O presente trabalho teve dois principais objetivos: (i) Avaliar o papel da microbiota no processo de corrosão, em dois museus: Museu Nacional do Rio de janeiro (MN) e o Museu de Arte Contemporânea (MAC). Foram pesquisados 8 grupos microbianos a partir de amostras tomadas de um total de quatro pontos da parte externa dos museus no período de seis meses: bactérias heterotróficas aeróbias e anaeróbias, bactérias produtoras de ácido aeróbias e anaeróbias, ferrobactérias, bactérias redutoras de sulfato, fungos totais e micro-organismos fotossintetizantes; (ii) Investigar o processo de deterioração da argamassa, sob atuação de consórcios microbianos oriundos da parede do Museu Nacional do Rio de Janeiro. Os corpos de prova foram testados em microambiente climatizado, simulando oito condições, revestidas ou não, sob chuva ácida ou chuva de água destilada e ausência ou presença de micro-organismos. Na primeira parte, o MN, apresentou maior carga microbiana, indicando maior risco de comprometimento da parede, quando comparado ao MAC. A maior densidade microbiana detectada no MN foi de bactérias aeróbias heterotróficas totais ($\approx 10^5$ UFC/cm^2) e no MAC os fungos totais foram predominantes ($\approx 10^3$ UFC/cm^2). Análises empregando a técnica T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorfism*) revelaram maior similaridade entre as comunidades bacterianas (≈60%) no MN em detrimento das comunidades eucariotas (≈40%) para o MAC. Dentre os grupos encontradas no MN foram principalmente alphaproteobactérias, acidobactérias, cianobactérias e actnobactérias, sendo as amostras muito diversificadas. Os Eucariotos observados em predominância no MN foram os grupos Archaeplastida, Cloroplastida e Opisthokonta, outras, para o MAC Opisthokonta, Nucletmycea e Archeoplastida, Cloroplastida. Adicionalmente, foi observado que não houve uma evolução temporal das comunidades bacterianas e eucariotas. Para a segunda parte, a maior densidade de micro-organismos foi observada entre as bactérias heterotróficas aeróbias totais: $1{,}2 \times 10^7$ UFC/cm^2 nos corpos de prova sem revestimento e sob chuva ácida. Pela T-RFLP foi verificado que à diversidade eucariota comparada a bacteriana foi mais susceptíveis às condições estudadas. Para os resultado do *MiSeq Illumina*, os grupos bacterianos na maioria dos corpos de prova que se desenvolveram melhor foram Alphaproteobacteria e Gamaproteobacteria, e para eucariotos o grupo Opistthokonta, Nucletmycea. Nas imagens geradas por estereomicroscopia e por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar exopolímeros e células dispostas nos biofilmes, principalmente nos corpos de prova sem revestimento.

Palavras-chave: Biofilmes; Conservação de patrimônios; Museu Nacional do Rio de Janeiro; Museu de Arte Contemporânea; Ensaios de biodeterioração.

ABSTRAC

Dias, Diogo Simas Bernardes. **Evaluation of microbial diversity in historical patrimony and mortar under different atmospheric conditions**. Thesis. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Monuments when exposed to atmosphere are prone to the process of natural deterioration, due to several factors such as rain, wind and air pollution. Additionally small fragments of plant, animal, mineral, spore and microbial cells may fixed to the porous surface and to allow the biofilm development, which accelerates mortar deterioration. Such process needs more information to be comprehended and takes little attention, which may imply cultural losses for further generations. The aims of this work were: (i) to evaluate the role of microbiota in the process of corrosion at two sites, The National Museum of Rio de Janeiro (MN) and Contemporary Art Museum (CAM). Eight microbial groups were investigated from samples taken from four outdoor sites within six-month period: aerobic and anaerobic bacteria: total heterotrophics, acid bacteria, ironbacteria, sulfate reducing bacteria, total fungi and autotrophic microorganisms; and (ii) to investigate a microbial consortia formed by isolates from the wall of MN on mortar deterioration. Coated and non-coated coupons were tested in microcosms by simulating eight environmental conditions of acid rain, distilled water rain and presence-absence of microorganisms. In the first part, MN presented a higher microbial density when compared to CAM quantification. Major microbial density was detected in total heterotrophic aerobic bacteria ($\approx 10^5$ CFU/cm^2) while at CAM the total fungi were predominant ($\approx 10^3$ CFU/cm^2). Molecular T-RFLP analysis revealed most similarity among bacterial communities at MN (≈60%) in detriment of eukaryotic communities from MAC (≈40%). Prokaryotes diversity comprised Alphaproteobacteria, Acid bacteria, Cyanobacteria and Actinobacteria. In the other hand, Archaeplastida, Chlorplastida and Opisthokonta were the predominant groups of eukaryotes in MN while Opisthokonta, Nucletmycea, Archeoplastida and Cloroplastida for CAM. In addition, there was no differences between bacterial and eukaryotic communities throughout the time. In the second part of this work, total aerobic heterotrophic bacteria represented the higher microbial density (1.2×10^7 CFU/cm^2) on the non-coated coupons surface under acid rain. Molecular analysis shown that eukaryotes were more sensitive then prokaryotes in the conditions tested. Alphaproteobacteria and Gamaproteobacteria as well as Opistthokonta were the predominant groups. Exopolymers and biofilm were well observed on non-coated coupons by stereomicroscopy and MEV.

Keywords: Biofilms; Heritage preservation; National Museum of Rio de Janeiro; Contemporary Art Museum; Biodeterioration tests.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Giovanni e Sandra, ao meu irmão Vinícius, ao meu sobrinho João e a minha namorada Lizeth que são fundamentais na minha vida.

Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro por experiência, que é o mais amargo."

Confúcio

"A gente tem que sonhar, senão as coisas não acontecem"

Oscar Niemeyer

AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, em especial meu pai Giovanni Pessoa Dias, à minha mãe Sandra Maria Simas Bernardes Dias, ao meu irmão Vinícius Simas Bernardes Dias e meu avô Luís Braga Bernardes que não pôde ver em vida o final desse ciclo.

Agradeço a Deus por me proporcionar saúde para conseguir finalizar esse sonho.

À minha orientadora professora Eliana Flávia Camporese Sérvulo pela oportunidade de desenvolver a pesquisa com todo acompanhamento e extrema dedicação nesta etapa, contribuindo para uma melhor qualidade desse projeto e ainda acreditar e incentivar meus sonhos.

À minha co-orientadora Márcia Teresa Soares Lutterbach, por acreditar na proposta do trabalho e torná-lo possível, com um impressionante poder de resolver problemas, dar sugestões e ter realizado toda a conexão para tornar viável meu sonho de realizar o intercâmbio.

À minha co-orientadora Cristiana Cravo-Laureau por toda a gentileza, pela viabilização do meu sonho de realizar o intercâmbio, pela recepção quando cheguei a França sendo muito atenciosa, me ajudando desde a instalação até o desenvolvimento da pesquisa na área de biologia molecular.

À minha namorada Lizeth que esteve comigo nesses últimos dois anos e cinco meses de muito amor, carinho, diversão e de algumas briguinhas. Obrigado por me incentivar meu sonho e por nesse último ano ser uma grande incentivadora para finalizar este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biocorrosão, Biodegradação e Biossíntese (E-107) por toda amizade, companheirismo e por tornarem essa etapa mais tranquila e leve. Obrigado Lindomar, Guilherme, Juliana, Daniele, Thiago, Douglas, Cris, Thamara, Mariana, André, Thaís, Vítor e Paulinho.

Ao pessoal do INT sempre com muita boa vontade para ajudar a resolver os problemas. À Ana Lúcia por me ajudar com o isolamento dos fungos sempre com boa vontade e dedicação

Ao professor Bertolino por toda a atenção e disponibilidade de ajudar e contribuir com a pesquisa em especial nas análises de MEV e FRX.

Aos amigos da França, Théo, Cyril, Marine, Vanessa, Cynthia, Johanne, Boussad, Samuel, Justine e todas as outras pessoas que me ajudaram na adaptação. Ao Robert Duran por me recepcionar e abrir o laboratório para eu desenvolver minha pesquisa. À Anne Carbon por toda ajuda, paciência e dedicação, com explicações desde as mais básicas as mais elaboradas.

À professora Francisca por abrir o Laboratório para eu desenvolver a pesquisa. Aos amigos da E-109 Flávia, Leonardo, Gustavo, Milton, Dill, Virgínia, Diogo e Priscila.

Às amigas Flávia, Adriana, Gisele e Andressa pelos momentos de descontração. Ao Ulrich pela amizade e por ajudar em toda a parte escrita com extrema paciência e boa vontade, assim como nas dicas, conversas e conselhos. Ao André pela amizade e pelas orações. Aos amigos Jamille e Cadu pelas conversas e conselhos. Aos amigos de Petrópolis, em especial Maicon, Marco, Guto, Leandro e Bernardo.

Ao pessoal do Museu Nacional, em especial à Márcia Valéria.

Ao pessoal do Museu de Arte Contemporânea, em especial ao senhor Baltazar.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro. À *Université de Pau et des Pays L'Adour.*

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro no desenvolvimento da pesquisa.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO 19
2. OBJETIVOS 23
2.1. OBJETIVO GERAL 23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24
3.1. PATRIMÔNIOS CULTURAIS 24
3.2. PASSADO E FUTURO REPRESENTADOs EM DOIS MUSEUS 27
3.2.1. Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN) 28
3.2.2. Museu de Arte Contemporânea (MAC) 30
3.3. MATERIAIS EMPREGADOS NA CONSTRUÇÃO DE MONUMENTOS E EDIFICAÇÕES 32
3.3.1. Concreto e argamassa 33
3.3.2. Tinta 34
3.3.3. Metal 35
3.4. O FENÔMENO DE CORROSÃO/DETERIORAÇÃO 36
3.4.1. Corrosão induzida microbiologicamente (CIM) 39
3.5. PREVENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE MONUMENTOS HISTÓRICOS E O CONTROLE DA BIOCORROSÃO 52
3.6. FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS UTILIZADAS PARA ATUAIS PESQUISAS DE BIODETERIORAÇÃO DE PATRIMONIOS HISTÓRICOS 54
3.7. O ACOMPANHAMENTO DAS PESQUISAS DO PATRIMÔNIO CULTURAL 59
3.7.1. A semelhança entre a igreja de são roque e o museu de arte contemporânea 62
4. MATERIAIS E MÉTODOS 65
4.1. PATRIMÔNIOS HISTÓRICOS 65
4.1.1. Coleta de materiais 67
4.1.2. Monitoramento meteorológico 68
4.1.3. Determinação do teor de umidade 68
4.2. DETALHAMENTO EXPERIMENTAL 69
4.2.1. Ensaios preliminares: avaliação da diversidade microbiana de patrimônio 69
4.2.2. Caracterização microbiológica clássica 69
4.2.3. Isolamento das espécies bacterianas e fungícas cultiváveis 72
4.2.4. Identificação das bactérias e fungos predominantes 72
4.3. MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DOS MUSEUS 74

4.3.1. Determinação da diversidade total 75
4.4. ENSAIOS DE BIODETERIORAÇÃO DE CORPOS DE PROVA DE ARGAMASSA EM LABORATÓRIO DE FORMA ACELERADA 80
4.4.1. Elaboração dos corpos de prova 81
4.4.2. Descrição do sistema experimental 82
4.4.3. Ensaio do desenvolvimento do biofilme em presença de névoa ácida em escala laboratorial (avaliação das variáveis) 83
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 87
5.1. TESTES PRELIMINARES E DEFINIÇÃO DA METODOLOGIA 87
5.1.1. Caracterização ambiental da área (Museu Nacional) 87
5.1.2. Determinação do teor de umidade da superfície da parede 90
5.1.3. Avaliação de diferentes meios de cultura para enumeração das populações microbiana 90
5.1.4. Caracterização biomolecular 98
5.2. MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE DAS ESTRUTURAS EXTERNAS DO MN E do MAC 102
5.2.1. Monitoramento meteorológico 102
5.2.2. Enumeração microbiologia clássica 104
5.2.3. Diversidade molecular total 111
5.3. ENSAIOS DE BIODETERIORAÇÃO EM CORPOS DE PROVA DE ARGAMASSA 123
5.3.1. Caracterização dos corpos de prova, do consórcio microbiano empregado e das condições climáticas 123
5.3.2. Enumeração por biologia clássica 126
5.3.3. Análise molecular dos biofilmes por T-RFLP e MiSeq 129
5.3.4. Imagens dos corpos de prova 138
6. CONCLUSÕES 153
7. SUGESTÕES 155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 156
ANEXO A. Meios de cultura e soluções 170
ANEXO B. Trabalhos publicados 172

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Região do Estado do Rio de Janeiro onde estão localizados o Museu Nacional (A) e do Museu de Arte Contemporânea (B) [C: estação meteorológica]. 28
Figura 3.2. Vista superior do Jardim da princesa do Museu Nacional do Rio de Janeiro A seta vermelha indica o local da tomada das amostras desta pesquisa. 29
Figura 3.3. (A)Banco deteriorado do Jardim da Princesa na década de 70; (B) em aproximadamente 40 anos. 30
Figura 3.4. Museu de Arte Contemporânea de Niterói (MAC) se estende sobre a Baía de Guanabara. A vista ao fundo é de parte da cidade de Niterói/RJ (A): vista superior, 1: espelho d'água; 2: rampa de acesso; (B): detalhe da rampa de acesso; (C): detalhe dos vidros da fachada. 31
Figura 3.5. Etapas da formação de um biofilme. (1): adesão; (2-3): colonização; (4): maturação; (5): desprendimento. 42
Figura 3.6. Ciclo usado na reação da PCR para amplificação de fragmento de DNA. 56
Figura 3.7. Igreja de São Roque, antes da reforma (A), logo após a reforma (B) e 4 anos mais tarde (C).. 63
Figura 3.8. Museu de Arte Contemporânea antes da reforma (A e B), teto (C) (ou parte inferior da rampa de cima) e janela (D) reformados, parte do teto apresentando indícios de corrosão e pigmentação amarelada (E). 64
Figura 4.1. Detalhamento esquemático do escopo da 1ª etapa, na qual foi dado o suporte para desenvolver as seguintes etapas (2ª e 3ª) do trabalho. 65
Figura 4.2. Paredes do Jardim da Princesa do Museu Nacional do Rio de Janeiro, indicando os dois pontos onde foram realizadas as coletas (A). Os locais de coleta foram amplificados, ponto 1 (B) e ponto 2 (C) para melhor visualização de seu estado de deterioração. 66
Figura 4.3. Entrada do Museu de Arte Contemporânea, indicando os dois pontos onde foram realiza realizadas as coletas (A). Os locais das coletas foram amplificados, ponto 3 (B) e ponto 4 (C) para melhor visualização de seu estado de deterioração.. 67
Figura 4.4. Molde plástico flexível com abertura interna de 4 cm^2. 68
Figura 4.5. Detalhamento esquemático do monitoramento dos museus. 75
Figura 4.6. Diagrama do processo biomolecular para desenvolver a técnica de T-RFLP.. 76
Figura 4.7. Detalhamento esquemático dos ensaios de biodeterioração. 81
Figura 4.8. Tipos distintos de corpos de prova com e sem revestimento usados para avaliação da formação do biofilme por quantificação celular (A) e para análise da superfície por MEV e biologia molecular (B). 82
Figura 4.9. Reator desenvolvido para os experimentos acelerados de biodeterioração (A) e vista superior da disposição dos corpos de prova (B). 82
Figura 5.1. Variação da temperatura e da umidade no período de coleta segundo levantamento de dados meteorológicos na cercania do Museu Nacional. 88
Figura 5.2. Comportamento da temperatura e da umidade entre 15 de setembro e 15 de outubro de 2012 (Data de amostragem: 30/09/2012). 89

Figura 5.3. Morfologia das colônias de bactérias aeróbias heterotróficas em meio Agar nutriente oriundas de amostragem de paredes do Jardim da Princesa do Museu Nacional, em pontos distintos. 93
Figura 5.4. Crescimento de bactérias aeróbias produtoras de ácido em meio Agar vermelho de fenol sem adição de nistatina (A), com adição de nistatina (B), e com adição de glicose e nistatina (C). 94
Figura 5.5. Enumeração de ferrobactérias em Agar Citrato Férrico Amoniacal (A) no ponto 1 com adição de nistatina e (B) no ponto 2 sem adição de nistatina. 95
Figura 5.6. Enumeração dos fungos presentes nas amostras coletadas das paredes externas do Museu Nacional em Agar Sabouraud (A), Agar Extrato de Malte (B) e Agar Batata-Dextrose (C). 95
Figura 5.7. Colônias de micro-organismos fotossintetizantes presentes nas amostragens das paredes externas do Museu Nacional em Agar Difco (A), Agar MKM (B) e meio liquido Difco (C). 96
Figura 5.8. Colônias obtidas a partir do cultivo das amostras oriundas das paredes externas do Museu Nacional em meios indicados para crescimento/enumeração de actinobactérias (A: Agar 72C; B: Jausen; e C: Agar amido-caseína), com adição de bactericida (amoxicilina) e fungicida (nistatina). 97
Figura 5.9. Monitoramento de variáveis meteorológicas. 102
Figura 5.10. Quantificação dos micro-organismos no ponto 1 (A) e no ponto 2 (B) ao longo de 6 meses. Percentual de micro-organismos no ponto 1 (C) e no ponto 2 (D) ao longo de 6 meses. 106
Figura 5.11. Enumeração dos micro-organismos no ponto 3 (A) e no ponto 4 (B) ao longo de 6 meses. Percentual de micro-organismos no ponto 3 (C) e no ponto 4 (D) ao longo de 6 meses. 108
Figura 5.12. Eletroforese da amplificação de DNA 16S rRNA purificada de PCR de Bactéria das amostras do Museu Nacional (A) e do Museu de Arte Contemporânea (B). 112
Figura 5.13. Eletroforese da amplificação de DNA 18S rRNA purificada de Eucarioto das amostras do Museu Nacional (A) e do Museu de Arte Contemporânea (B). 113
Figura 5.14. Eletroforese da amplificação de DNA 16S rRNA purificada das amostras do Museu Nacional e do Museu de Arte Contemporânea 114
Figura 5.15. NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e dendrograma das comunidades de bactéria do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea. P1 – Ponto 1, P2 – Ponto 2, P3 – Ponto 3 e P4 – Ponto 4. P1 + P2 – Percentual de Similaridade entre as comunidades dos Pontos 1 e 2. NM – National Museum. CAM - Contemporary Art Museum. 115
Figura 5.16. Diversidade da comunidade Bacteriana das amostras do Museu Nacional do Rio de Janeiro. 118
Figura 5.17. NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e dendrograma das comunidades eucariotas do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea. P1 – Ponto 1, P2 – Ponto 2, P3 – Ponto 3 e P4 – Ponto 4. P1 + P2 – Percentual de Similaridade entre as comunidades dos Pontos 1 e 2. NM – National Museum. CAM – Contemporary Art Museum. 121

Figura 5.18. Diversidade da comunidade Eucariota das amostras do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea. 122
Figura 5.19. Caracterização do consórcio microbiano empregado. 125
Figura 5.20. Perfil da umidade e da temperatura no interior do aparato experimental ao longo do ensaio. 126
Figura 5.21. (A) Enumeração dos micro-organismos nos experimentos dos corpos de prova em condições de sem pintura + névoa (condição 5), com pintura + névoa (condição 6), sem pintura + névoa ácida (condição 7) e com pintura + névoa ácida (condição.8). (B) Percentual total de micro-organismos enumerados nas 4 condições. Condição 6 teve valor menor que 1%, por isso parece não está presente no gráfico B. 128
Figura 5.22. Eletroforese da amplificação purificada da comunidade bacteriana 16S (A) e da comunidade Eucariota 18S (B) 130
Figura 5.23. NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e dendrograma das comunidades de bactéria com variáveis de revestimento (Natural and Treatment) e condições atmosféricas (Water and acid). 132
Figura 5.24. Diversidade da comunidade Bacteriana das amostras dos experimentos conduzidos em laboratório 133
Figura 5.25. NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e dendrograma das comunidades de eucariotos das amostras dos experimentos conduzidos em laboratório. 136
Figura 5.26. Diversidade da comunidade Eucariotas das amostras dos experimentos conduzidos em laboratório 137
Figura 5.27. Fotografias dos corpos de prova em fase inicial, e com desenvolvimento das variáveis de corpo de prova revestido ou não, com ausência ou presença de micro-organismos e influência da névoa ou névoa ácida. 139
Figura 5.28. Imagens dos CPs sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a remoção do biofilme, sob a ação de névoa (condições 1 e 5), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes. 143
Figura 5.29. Imagens dos CPs/tinta sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a raspagem do biofilme, sob a névoa (condições 2 e 6), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes. 145
Figura 5.30. Imagens dos CPs sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a remoção do biofilme, sob névoa ácida (condições 3 e 7), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes. 146
Figura 5.31. Imagens dos CPs/tinta sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a raspagem do biofilme, sob névoa ácida (condições 4 e 8), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes. 148
Figura 5.32. Imagens de MEV dos CPs na Condição 1 (sem revestimento + névoa), condição 2 (com revestimento + névoa), condição 3 (sem revestimento + névoa ácida) e condição 4 (com revestimento + névoa ácida), todos sem atuação de micro-organismos. 150
Figura 5.33. Imagens de MEV dos CPs na condição 5 (sem revestimento + névoa), condição 6 (com revestimento + névoa), condição 7 (sem revestimento + névoa ácida) e condição 8 (com revestimento + névoa ácida), todos com atuação de micro-organismos. 151

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação dos micro-organismos participantes da biodeterioração 45
Tabela 4.1. Meios de cultura utilizados para enumeração, metodologia, tempo de cultivo e agente antimicrobiano testados para grupos específicos de micro-organismos 71
Tabela 4.2. Condições de PCR e marcadores adotados para cada grupo microbiano para aplicação final com a técnica de T-RFLP 77
Tabela 4.3. Composição do gel de eletroforese 77
Tabela 4.4. Enzimas de restrição para a T-RFLP 78
Tabela 4.5. Condições de PCR e marcadores adotados para cada grupo microbiano para aplicação final com a tecnologia MiSeq Illumina Sequencing 79
Tabela 4.6. Composição de névoa ácida artificial (pH 5,12) 84
Tabela 4.7. Condições avaliadas no estudo de formação de biofilmes 84
Tabela 4.8. Condições e técnicas utilizadas para caracterização da biodeterioração 85
Tabela 5.1. Enumeração dos micro-organismos do Museu Nacional (Jardim da Princesa).... 91
Tabela 5.2. Protocolo das análises microbiológicas a serem executadas na investigação da colonização microbiana de monumentos 98
Tabela 5.3. Espécies bacterianas isoladas dos pontos 1 e 2 das paredes externas do Jardim da Princesa (MN) 99
Tabela 5.4. Espécies Fungícas isolados nos pontos 1 e 2 de paredes externas do Jardim da princesa (MN). 100
Tabela 5.5. Teor de umidade na parede do Museu Nacional do Rio de janeiro 104
Tabela 5.6. Dosagem de ácidos nucleicos do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea. 111
Tabela 5.7. Análise de FRX demonstrando a composição (%) das paredes e do corpo de prova 124
Tabela 5.8. Dosagem dos ácidos nucleicos do DNA extraído dos biofilmes formados sobre os corpos de prova ensaiados 129

LISTA DE SIGLAS

AD: Abaixo do limite de detecção

AE: Aceptores de elétrons

AFM: Atome Force Microscopy

APHA: American Public Health Association

AWWA: American Water Works Association

BRS: Bactérias Redutoras de Sulfato

CETEM: Centro Tecnologia Mineral

CIM: Corrosão Induzida Microbiologicamente

CNI: Colônias Não Individualizadas

CP: Corpo de prova

CSLM: Confocal Scanning Microscopy

DIC: Differential Interference Contrast Microscopy

EPS: extracellular polymeric substances

ESEM: Environmental Scanning Eletron Microscopy

FRX: Fluorescência de Raios-X

INMET: Instituto Nacional de Meteorologia

INT: Instituto Nacional de Tecnologia

IPHAN: Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional

ITS: Internal Transcribed Spacer

LABIO: Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação

MAC: Museu de Arte Contemporânea

MISEQ: MiSeq Sequencing System

MN: Museu Nacional do Rio de Janeiro

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MO: Microscopia Óptica

NM: New Museum

NMP: Número Mais Provável

NRHP: National Register of Historic Places

OM: Old Museum

PCR: Polimarase Chain Reaction

PVA: Acetato de Polivinina

RE: Receptores de elétrons

SECONSERVA: Secretaria Municipal de Conservação e Serviços Públicos

SEM: Scanning Eletron Microscopy

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorfism

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UPPA: Université de Pau et des Pays L'Adour

UV: Ultra Violeta

WEF: Water Environment Federation

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de sua história, o homem vem construindo monumentos, como bustos, estátuas, obeliscos, templos, e outras edificações dos mais diversos estilos arquitetônicos, por motivos religiosos, funerários, para preservação da crença e da cultura, para perpetuar fatos ocorridos, homenagear pessoas importantes ou mesmo como forma de demonstrar o poder de dirigentes ou de uma nação. A civilização contemporânea, além do culto a deuses, santos e mortos, encontra no turismo, um potencial de desenvolvimento econômico, o que reforça a motivação para a conservação e a recuperação dos monumentos históricos (TAVIN, 2004).

Em geral, os monumentos são constituídos a partir de materiais que resistam ao tempo, uma vez que a exposição ao ar livre acarreta o seu desgaste natural, especialmente nas superfícies. Sua natureza pode ser orgânica ou inorgânica, dos mais diversificados materiais, tais como pintura, vidro, madeira, mármore, concreto, argamassa, rocha, metal e ligas como ferro fundido e bronze, entre outros (STEIGER; CHAROLLA, 2011).

No caso de rochas naturais são exemplos o mármore, o granito, o calcário, o gnaisse facoidal (GHOBADI; BABAZADEH, 2014; ROSA-GARCIA *et al.*, 2011; RIVAS *et al.*, 2003). Essa última, uma rocha antiga de origem metamórfica, muito comum nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói, conforme ilustrado no trabalho de Mansur *et al*. (2008). Por exemplo, o gnaisse facodial é o principal constituinte dos morros Corcovado, Pão de Açúcar e Pedra do Arpoador. Devido à abundância e resistência ao intemperismo, esta rocha foi muito usada na construção de monumentos históricos na antiga cidade do Rio de Janeiro, entre os séculos XIX e início do século XX, em edificações e monumentos coloniais, particularmente para confecção de ornamentos, fachadas e molduras de portas e janelas. São exemplos, o Palácio do Catete, o Centro Cultural Banco do Brasil, o Museu de Belas Artes, o Museu Histórico, UFRJ na Praia Vermelha, o Museu Nacional, as igrejas Santa Luzia, Santo Cristo, e Nossa Senhora da Glória, e a escultura na lateral da Igreja da Candelária. Para o acabamento e embelezamento desses monumentos, outros materiais foram utilizados, entre eles revestimentos, argamassas e metais (MANSUR *et al.*, 2008).

Como anteriormente mencionado, a deterioração dos materiais que compõem os monumentos históricos e também, dos revestimentos sobre eles aplicados para sua proteção ou

embelezamento, é um fenômeno natural, em razão da interação de diferentes fatores abióticos, tais como luz (UV), umidade (chuva e vento) e temperatura (DAKAL; CAMEOTRA, 2012; FRASCÁ; YAMAMOTO, 2004). No entanto, o processo de deterioração dos materiais é mais intenso onde as condições meteorológicas são mais agressivas, como é o caso das zonas litorâneas, em virtude da névoa salina (CARDELL *et al.*, 2003), ou nas cidades com poluição atmosférica, principalmente pela ação da deposição ácida. Alguns autores constataram que a cristalização de sais marinhos solúveis, em especial o cloreto de sódio, acarreta a deterioração de rochas duras como o granito (GHOBADI; BABAZADEH, 2014; ESPINOZA MARZAL; SCHERE; DECKELMANN, 2008 RIVAS *et al.*, 2003; GROSSI *et al*., 1997).

Aos fatores abióticos são somados aos micro-organismos, com a participação dos diversos grupos microbianos que colonizam a superfície dos monumentos tornando-se a principal ameaça aos patrimônios históricos (LOPES; CARVALHO; KRIEGER, 2003). De acordo com Rosa-Garcia *et al.* (2011), as construções de pedra localizadas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo são as mais vulneráveis à deterioração microbiana. Isto porque nestes locais prevalecem condições de temperatura e umidade mais adequados para o crescimento microbiano (DAKAL; CAMEOTRA, 2012).

A deterioração de materiais envolvendo a participação de agentes biológicos é referida como biodeterioração. Portanto, entende-se por biodeterioração qualquer alteração indesejável nas propriedades de um material causadas pela atividade vital de um organismo. Os micro-organismos intensificam ou aceleram a decomposição dos materiais, quer metabolizando os constituintes dos monumentos, gerando produtos agressivos (como ácidos orgânicos e inorgânicos), sendo o principal mecanismo de deterioração de rochas (DAKAL; CAMEOTRA, 2011; GAYLARDE; MORTON, 2002; SAND; JOZSA; MANSCH, 2002; GAYLARDE *et al*., 2001; RESENDE et al., 1996). Ademais, a intrusão física dos micro-organismos nos materiais porosos ou em rachaduras (penetração hifas), pode resultar em danos físicos e mecânicos aos monumentos e às obras de arte (DAKAL; CAMEOTRA, 2012; CRISPIM; URZI *et al.*, 2002). Em consequência, a investigação da biodeterioração de monumentos históricos, obras de arte e estátuas vem tendo mais adeptos e suporte financeiro a cada ano, em especial em locais onde os órgãos governamentais estão preocupados em garantir a longevidade dos seus patrimônios culturais.

Em geral, a biodeterioração dos monumentos ocorre em associação aos fatores físicos e químicos e dependendo das condições meteorológicas e atmosféricas, os micro-organismos podem potencializar a intensidade e a velocidade do processo de decomposição dos materiais. Porém, é indiscutível que quaisquer que sejam os fenômenos naturais envolvidos no processo de deterioração, irão ocorrer alterações indesejáveis de diferentes naturezas nas superfícies dos monumentos, como, por exemplo, formação de crostas, mudança de coloração e, até mesmo, perda de material. Logo, a falta de uma política adequada de preservação, além dos elevados custos para contemplar a sua recuperação, poderão repercutir em danos irreparáveis ao patrimônio histórico e cultural (NASA, 2013; MAPELLI *et al*., 2012; SADDIQUE; SHAHAL, 2011; SARRÓ *et al.*, 2006).

Em uma clássica revisão sistemática publicada há mais de duas décadas, fica evidente a preocupação em proteger os legados históricos, e assim perpetuá-los para as gerações futuras (KOESTLER; VEDRAL, 1991). Estes autores identificaram mais de 500 artigos científicos sobre deterioração de monumentos, abrangendo agentes promotores, a participação da poluição atmosférica, indicadores microbiológicos, biofilmes, biocidas, e formas de conservação. Apesar disso, até os dias atuais, algumas das abordagens apresentadas ainda não possuem fundamentação suficientemente concisa. Seguiram-se publicações de outros estudos que semelhantemente têm ênfase em preservação e no entendimento do fenômeno de deterioração. Porém, cabe ressaltar que cada caso tem características únicas, como estrutura, localização, idade, tempo de exposição, grau de deterioração e estimativa do valor histórico-cultural e afetivo da obra, dentre outras. Isto reforça a necessidade de preservação e a valorização dos patrimônios culturais e da avaliação científica do tema.

No Brasil, a pesquisa sobre biodeterioração de patrimônios históricos é incipiente, estando os poucos grupos de pesquisa envolvidos com a preservação do patrimônio histórico e cultural, e com efetiva produção acadêmica, concentrados nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. No entanto há várias cidades em todo o território nacional importantes pelo valor histórico como por sua bela arquitetura. Por exemplo, a cidade do Rio de Janeiro, uma das principais capitais turísticas do Brasil, com epíteto de “Cidade Maravilhosa” pelas belezas naturais. Além disso, a cidade e seus arredores reúnem grande quantidade de monumentos históricos, muitos dos quais da época da Família Real Portuguesa, que aqui se instalou em 1808, e onde Dom Pedro I foi coroado imperador do Brasil. Atualmente, no Estado do Rio de Janeiro existem 1.100 monumentos e chafarizes, sendo 391 deles - 92 estátuas e 299 bustos ou efígies

- de homenagens feitas a personalidades; a Secretaria Municipal de Conservação e Serviços Públicos (Seconserva) disponibiliza a lista completa e informações dessas obras de arte, bustos e estátuas (SOARES, 2015).

Em vista da variação climática ao longo do ano e mesmo de local para local, a preservação de monumentos na cidade do Rio de Janeiro, bem como em Niterói merecem especial atenção. Assim sendo, o presente trabalho teve como ênfase o levantamento de dados sobre o comportamento da colonização microbiana em monumentos e a sua interação com a matriz estrutural em ambientes distintos visando contribuir para preservação de monumentos históricos na cidade do Rio de Janeiro e arredores. O trabalho envolveu como casos de estudo: o Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN), localizado em área arborizada na parte central da cidade, e o Museu de Arte Contemporânea (MAC), construído à margem da baía de Guanabara. Dessa forma, a tese pretende definir parâmetros que permitam dar subsídios para estabelecer as estratégias de preservação do patrimônio artístico, cultural e histórico brasileiro, de modo a garantir que sejam apreciadas pelas futuras gerações.

Por se tratar de dois patrimônios distintos e ainda envolver trabalhos experimentais correlatos, achou-se conveniente dividir o texto em capítulos. A parte introdutória (Capítulo 1) contempla a Introdução, em seguida são apresentados os objetivos (Capítulo 2) da pesquisa. O Capítulo 3 contempla a Revisão Bibliográfica sobre o tema. No Capítulo 4 (Materiais e Métodos) encontra-se a metodologia aplicada em todos os trabalhos experimentais realizados. O Capitulo 5 (Resultados e Discussão) está dividido em 3 tópicos que abrangem a seleção de meios de cultivo e outras técnicas utilizadas, o monitoramento dos museus e ensaios de biodeterioração de argamassa. Por fim as Conclusões (Capitulo 6), seguido do Capítulo 7 de sugestões, referências bibliográficas, anexo A (composição de meio de cultivo) e anexo B (trabalhos publicados).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a biodeterioração de áreas externas do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN) e Museu de Arte Contemporânea de Niterói (MAC), a fim de relacionar a atividade das populações microbianas em distintos materiais estruturais, argamassa e metal, em associação com as condições atmosféricas de cada local, isto é, zonas urbana/arborizada e costeira, respectivamente. Também foram realizados ensaios em laboratório, em condições atmosféricas controladas, onde os grupos microbianos provenientes do MN foram dispostos sobre corpos de prova construídos de argamassa, revestidos ou não com tintas contendo biocidas, com o propósito de delinear o uso deste tipo de revestimento na prevenção à biodeterioração da construção.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

• Selecionar meios de cultura específicos para quantificação das distintas populações sésseis presentes nas superfícies externas dos patrimônios;
• Monitorar as populações microbianas aderidas às paredes externas dos patrimônios históricos, por meio de técnica convencional;
• Monitorar as populações microbianas aderidas às paredes externas dos patrimônios através de técnica molecular;
• Identificar os grupos microbianos predominantes, durante o período de 6 meses de coleta;
• Correlacionar o comportamento dos micro-organismos nos biofilmes com as condições climáticas;
• Desenvolver um sistema experimental acelerado para avaliar o emprego de revestimento para a proteção dos materiais, em ensaios de laboratório para diferentes condições atmosféricas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O homem por sua natureza exploradora e de autoproteção tem transformado profundamente o ambiente no qual está inserido, na busca por abrigo e segurança, criando cenários que melhorem seu bem-estar. Por isso, ao longo dos anos, foram criadas inúmeras edificações, e, inclusive, monumentos para expressar momentos políticos e sociais, a religiosidade dos povos ou homenagear pessoas que de alguma forma tiveram papel relevante em uma determinada época. Portanto, estas construções são valiosas referências culturais de uma população e devem ser preservadas para manter viva a memória ao longo do tempo (SHIRAKAWA; JOHN; CINCOTTO, 2008).

A palavra memória, originada do grego "*mnemis*" ou do latim "*memoria*", significa conservação de uma lembrança. Para os gregos, a palavra tem simbologia de divindade posto se referendar à deusa Mnemosyne, mãe das Musas, que protegem as artes e a história" (CHAUÍ, 2005). Segundo esta autora:

> *"Memória é uma evocação do passado. É a capacidade humana para reter e guardar o tempo que se foi, salvando-o da perda total. A lembrança conserva aquilo que se foi e não retornará jamais".*

Não obstante, na natureza tem-se vários agentes físicos, químicos e biológicos que podem levar a deterioração das construções, mesmo se construídas com materiais resistentes. Por isso, a preservação de monumentos históricos e edificações, a herança cultural do país, é de alta prioridade social. As futuras gerações devem ter a oportunidade de testemunhar formas de estruturas sociais, o esforço, sentimentos estéticos e realizações arquiteturais de seus ancestrais (STEINBAUER *et al.*, 2013).

3.1. PATRIMÔNIOS CULTURAIS

A palavra patrimônio é formada pelos vocábulos latino "*pater*" e grego "*nomos*". O primeiro termo, no sentido mais amplo pode ser associada a bens, posses ou heranças, materiais ou imateriais, deixados pelos antepassados. A outra parte da palavra refere-se à lei, usos e costumes relacionados à origem.

Portanto, pode-se definir o patrimônio de um país como o conjunto de bens, de natureza material e/ou imaterial, que guarda em si referências à identidade, à ação e à memória de diferentes grupos sociais. São considerados patrimônios, ambientes naturais (ex.: paisagens), lugares históricos e sítios arqueológicos, construções, e artigos intangíveis tais como coleções, experiência cultural passada e contínua, conhecimentos e experiências vividas (TOMAZ, 2010; GHIRARDELLO *et al*., 2008).

Além da sua importância para as comunidades locais, os patrimônios tem forte apelo econômico, posto que incentivam o turismo, o que traz consigo aumento de receita tributária e oportunidades de emprego. Segundo dados da Organização Mundial do Turismo e do ministério do turismo brasileiro, este setor apresentou crescimento sustentável, passando de 996 para 1035,5, e de 5,4 para 5,7 milhões de pessoas visitantes (dados referentes aos anos de 2014 e 2015), respectivamente, resistindo às condições políticas e econômicas adversas, e tornando-se uma das maiores indústrias do mundo. No caso do Brasil, destaca-se a cidade do Rio de Janeiro, que continua a ser um dos principais destinos dos turistas nacionais e internacionais. (Ministério do turismo. http://www.dadosefatos.turismo.gov.br/dadosefato, acessado 16/09/2016).

Neste contexto, as obras e seus artistas consagrados, assim como as criações anônimas surgidas da alma popular, tem a ver com a nossa história, nossa memória, e, por conseguinte, devem ser passados de geração em geração. O patrimônio deve ser preservado mediante um conjunto de ações que garanta a sua permanência com os seus diversos valores e significados artísticos, paisagísticos, científicos, históricos e/ou simbólicos na vida de uma comunidade de um determinado lugar (GOMES, 2011).

A proteção do patrimônio histórico e cultural tem sido discutida internacionalmente através de convenções, leis e tratados. Entretanto, esta área, provavelmente pela abrangência, ainda não têm regras totalmente definidas. Internacionalmente, tem-se a *National Register of Historic Places* (NRHP), que é a lista oficial do governo americano, de reconhecimento internacional, dos lugares de recreação e esportes, como estádios, coliseus, pistas de corridas, clubes de golfe, entre outros (PFLEEGOR *et al.*, 2013).

Por outro lado, alguns órgãos governamentais, não reconhecem a importância da preservação de lugares populares de esporte e recreação, por sua arquitetura, arqueologia, engenharia e cultura. Em contrapartida, alguns artigos científicos, revistas, jornais e livros

divulgam locais e mostram interesse para prolongar a vida dos monumentos nas comunidades, em alguns casos incentivando o seu restauro em justaposição à intenção de se investir em novas construções (SEIFRIED, 2010).

Para o Brasil, a proteção e preservação do patrimônio histórico cultural vêm sendo conduzida desde o final da década de 30, promulgadas pelo decreto-lei número 25, de 30 de novembro de 1937, que determina a proteção do patrimônio nacional. Assim, a memória do que fomos e somos tem certificado legal, o que garante que nossas heranças sejam transmitidas para futuras gerações (FUNDARPE, 2008).

Até 1970, o conceito de patrimônio nacional era voltado para à preservação de bens e imóveis. A partir daquele ano, o conceito se tornou mais abrangente, com a inclusão de conjuntos arquitetônicos de relevância para a sociedade. Em 1988, foi disposto no artigo 216 da Constituição Federal de 1988, a possibilidade de tombamento de bens de natureza material e imaterial (TOMAZ, 2010).

O tombamento é um modo de impedir a destruição de bens imóveis que constituem a história de uma nação. É uma espécie de inventário que proíbe a violação do imóvel e cuja salvaguarda tem por objetivo preservá-lo e controlar suas restaurações. Para isso existe uma lei que o tombo pode ocorrer desde que firmado em base legislativa competente, e com o apoio do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), órgão que, além de assessorar as prefeituras interessadas na preservação de seus bens culturais municipais, aprova ou desaprova obras e serviços nos bens tombados. Esses bens, a partir do momento que são legalmente tombados como Patrimônio Cultural, não podem ser destruídos, tampouco descaracterizados, de modo que o restauro deve manter a estrutura inalterada (KORKANÇ, 2013).

Em suma, constitui-se o patrimônio cultural brasileiro, qualquer bem de natureza material e imaterial, tomado individualmente ou em conjunto, portador de referência à identidade, à ação, à memória dos diferentes grupos formadores da sociedade brasileira. A proteção e a conservação dos bens patrimoniais devem ser de interesse do Estado e da sociedade, para o exercício da cidadania pelos habitantes locais, pois são estes indivíduos os maiores beneficiários (FUNDARPE, 2008).

Mundialmente, a preservação do patrimônio cultural é de suma importância na atualidade. As constantes ameaças de destruição nas últimas décadas exigem maior conscientização de preservação pelos diversos segmentos da sociedade. Com a finalidade de serem protegidos e transmitidos para as futuras gerações, os bens culturais não devem ser vistos como simples objetos, pois guardam informações, significados, mensagens, registros da história, refletem ideias, crenças, costumes, gosto estético, conhecimento tecnológico, condições sociais, econômica e políticas de uma determinada época. Particularmente, os patrimônios culturais nacionais necessitam de proteção, não apenas pelo valor histórico, mas pelo que representam culturalmente. No futuro, a não valorização da pluralidade cultural brasileira, fará com que a sociedade fique desprovida de identidade, isto é, perderá sua expressão (ZANATTA, 2010; TOMAZ, 2010).

3.2. PASSADO E FUTURO REPRESENTADOS EM DOIS MUSEUS

Como representantes da diversidade do patrimônio cultural do Estado do Rio de Janeiro foram escolhidos para realizar a presente pesquisa o Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN) e o Museu de Arte Contemporânea (MAC), que abrangem distintas condições antropológicas e ambientais, principalmente no seu tempo de criação e nos constituintes de seus entornos. O primeiro foi construído no início do Brasil imperial e é cercado por árvores dentro da cidade. O MAC foi construído em meados dos anos noventa do século passado e situa-se em Niterói as margens da baía de Guanabara (Figura 3.1).

A cidade do Rio de Janeiro apresenta uma geografia variada na sua área restrita de cerca de 1.200 km², que tem como um dos municípios limítrofes a cidade de Niterói (IBGE, 2010). A cidade possui 20 m de altitude apresenta estreitas planícies aluviais comprimidas entre morros e picos, alguns ainda cobertos com densa vegetação (site Cidade-Brasil). Além dos morros, são vários os acidentes geográficos, tais como maciços, baías, ilhas, restingas, lagoas e rios. A costa litorânea, com 197 quilômetros de extensão, compreende a baía de Sepetiba, a baía de Guanabara e o oceano Atlântico. Na cidade do Rio de Janeiro predomina o bioma da Mata Atlântica brasileira. Niterói, assim como a cidade do Rio de Janeiro, se apresenta à margem da Baía de Guanabara, no seu lado oeste, e também conta com extensa costa oceânica, na parte sul. A cidade de Niterói possui 129,3 km² de área e apresenta relevo constituído por terrenos

cristalinos, divididos em maciços e colinas costeiras, sendo a Pedra do Elefante o ponto mais alto do município, com 412 m de altura.

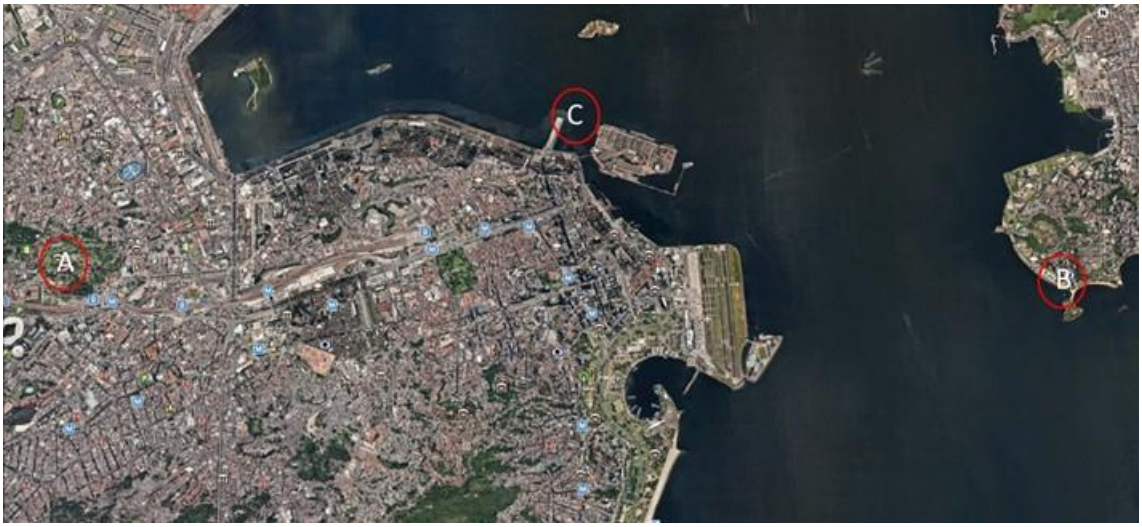


Figura 3.1. Região do Estado do Rio de Janeiro onde estão localizados o Museu Nacional (A) e do Museu de Arte Contemporânea (B) [C: estação meteorológica]. Crédito de imagem: Google Earth

O clima da região é tipicamente tropical úmido, que sofre grande influência da umidade vinda do Oceano Atlântico, o que causa comumente no verão chuvas frequentes, de média a elevada intensidade. No inverno, as chuvas são esparsas, com clima relativamente seco. Em consequência, nos períodos típicos, a temperatura varia muito ao longo do ano, sendo elevada no verão, com média de 28ºC, mas com picos de até 40ºC. Já no inverno têm-se dias ensolarados com temperaturas médias de 25ºC durante o dia e 15ºC à noite. Existe uma estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), Figura 3.1 (C), nas proximidades de ambos os museus, cujos registros eletrônicos foram utilizados para caracterização atmosférica dos locais de estudo.

3.2.1. Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN)

O Museu Nacional (MN), está localizado na Quinta da Boa Vista, Bairro de São Cristóvão, a 22º 90’ 57” de latitude sul e a 43º 22’ 65” de longitude oeste e é a mais antiga instituição científica do Brasil e o maior museu de história natural e antropológica da América Latina. Foi criado por D. João VI, em 06 de junho de 1818 e, inicialmente, sediado no Campo de Sant'Anna, foi a Residência da Família Imperial brasileira até 1889 (Figura 3.2), portanto serviu para atender aos interesses de promoção do progresso cultural e econômico no país.

Dentre os fatos históricos que ali aconteceram, citam-se o nascimento de D. Pedro II e realização da Primeira Assembleia Constituinte Republicana (1891).

Figura 3.2. Vista superior do Jardim da princesa do Museu Nacional do Rio de Janeiro A seta vermelha indica o local da tomada das amostras desta pesquisa (Crédito de imagem: Google Earth).

Originalmente denominado de Museu Real, em 1946 foi incorporado à Universidade do Brasil, recém criada em julho de 1937, que com a reforma universitária iniciada em 1965, passou a ser denominada Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Ainda hoje o museu integra a estrutura acadêmica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, vinculado ao Ministério da Educação, atuando na interface memória e produção científica. É detentor de armários com peles taxidermizadas e esqueletos de primatas da coleção de mamíferos, do departamento de vertebrados, e possui o maior acervo de primatas neotropicais do continente (DANTAS, 2012).

Do lado direito da entrada do Museu Nacional, se acessa o Jardim da Princesa. Neste local, ainda há um banco, com encosto de conchas, sobre o qual foi originalmente instalada uma réplica da estátua de Diana, ou Artemis na mitologia Grega, uma das divindades do Olimpo e uma das mais populares deusas (Figura 3.2A). Segundo a pesquisadora do Museu Nacional, Maria Beltrão, a peça deve ter sido ali instalada em 29 de julho de 1852, dia do aniversário de seis anos da Princesa Isabel, data da inscrição na argamassa. A estátua foi transferida para o terraço em frente ao Museu por volta de 1910 quando foi inaugurado pelo Presidente Rodrigues

Alves. A figura 3.3B ilustra o atual estágio de deterioração do banco, um exemplo de como está grande parte do jardim e como é necessária a adoção de medidas de controle da deterioração.

Figura 3.3. (A)Banco deteriorado do Jardim da Princesa na década de 70; (B) em aproximadamente 40 anos. Crédito de imagem: Site novo milênium (http://www.novomilenio.inf.br/santos/h0300g37b.htm)

3.2.2. Museu de Arte Contemporânea (MAC)

O Museu de Arte Contemporânea (Figura 3.4) está situado na cidade de Niterói, Mirante da Boa Viagem (22º 54’ 27.2” S, 43º 07’ 33.1” W). O projeto foi desenvolvido pelo arquiteto Oscar Niemeyer e segundo suas palavras:

> *"O terreno era estreito, cercado pelo mar e a solução aconteceu naturalmente, tendo como ponto de partida o apoio central inevitável. Dele, a arquitetura ocorreu espontânea como uma flor. A vista para o mar era belíssima e cabia aproveitá-la. E suspendi o edifício e sob ele o panorama se estendeu mais rico ainda. Defini então o perfil do museu. Uma linha que nasce do chão e sem interrupção cresce e se desdobra, sensual, até a cobertura. A forma do prédio, que sempre imaginei circular, se fixou e, no seu interior me detive apaixonado. À volta do museu criei uma galeria aberta para o mar, repetindo-a no segundo pavimento, como um mezanino debruçado sobre o grande salão de exposições".*

A construção do MAC (Figura 3.4) teve início em 1991, e demorou cinco anos, datando sua inauguração de 02 de setembro de 1996. São 2.500 m² de área construída, onde foram consumidos 3,2 milhões de metros cúbicos de concreto. O prédio, de forma circular, de 50 m de diâmetro, recebeu tratamento térmico e impermeabilizante. A estrutura consegue suportar cerca de 400 kg/m² e ventos de velocidade de até 200 km/h. Com 16 m de altura, o MAC nasce do chão numa base cilíndrica única de 9 m de diâmetro que sustenta todo o prédio, ancorada numa sapata de 2 m de altura. Um espelho d'água com 817 m² de superfície e 60 cm de profundidade, confere leveza à construção (Figura 3.4A).

A grande rampa externa de concreto vermelho (Figura 3.4B) conduz o visitante através de 98 m de curvas livres no espaço, às entradas dos pavimentos superiores. Na primeira entrada fica o pavimento de recepção e administração. Logo acima, o segundo pavimento abriga o salão central de exposições envolto por uma varanda circular envidraçada, destinada também a exposições, totalizando uma área de mil metros quadrados, de onde se pode admirar a paisagem panorâmica da Baía de Guanabara.

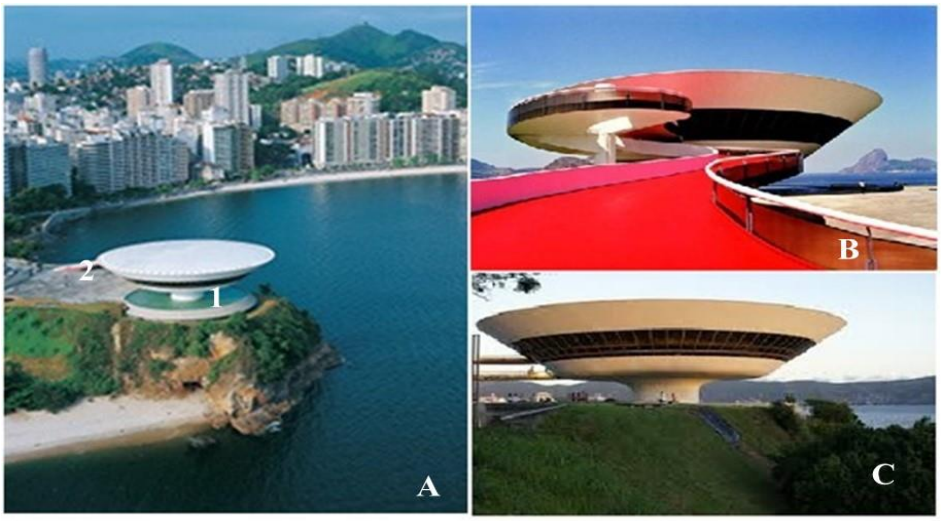


Figura 3.4. Museu de Arte Contemporânea de Niterói (MAC) se estende sobre a Baía de Guanabara. A vista ao fundo é de parte da cidade de Niterói/RJ (A): vista superior, 1: espelho d'água; 2: rampa de acesso; (B): detalhe da rampa de acesso; (C): detalhe dos vidros da fachada. Créditos de imagens: Google Earth (A), site alamy.com.br (B), site mapadecultura.rj.gov.br (C).

Os vidros do MAC (3.4C) foram fabricados com exclusividade para o projeto. São 70 lâminas triplex, com 18 mm de espessura, na cor bronze. Cada uma das lâminas mede 4,80 m de altura por 1,85 m de largura. As esquadrias são em perfis de aço e estão inclinadas em 40º em relação ao plano horizontal. Os vidros, super-resistentes, suportam peso equivalente a 20

pessoas. O último pavimento também é destinado a exposições. O acervo do MAC conta com 1.217 obras da Coleção João Sattamini, somado também por um conjunto de 369 obras formada de doações de artistas que realizaram exposições no museu (Site http://www.culturaniteroi.com.br/macniteroi, acessado 05/07/2016).

3.3. MATERIAIS EMPREGADOS NA CONSTRUÇÃO DE MONUMENTOS E EDIFICAÇÕES

São diversos os materiais utilizados na construção de monumentos arqueológicos, bem como de construções históricas, sendo a escolha dos materiais regida por diferentes aspectos englobando beleza, plasticidade, impermeabilidade, tenacidade, e fundamentalmente resistência e, por conseguinte, durabilidade para monumentos que ficarão expostos ao ar livre. A durabilidade do material está relacionada a sua capacidade de resistir à ação deteriorante de agentes químicos e físicos, de modo que sejam mantidas as características intrínsecas quanto ao seu aspecto, como tamanho, forma, peso e aparência (HERRERA; VIDELA, 2009; HERRERA *et al.*, 2004; BEECH, 2004).

Como anteriormente mencionado, os micro-organismos também podem ser a causa do fenômeno de deterioração de monumentos podendo acometer materiais metálicos, como aço carbono, ligas metálicas e bronze, e mesmo não metálicos como, por exemplo, mármore, argamassa, concreto e madeira. É fato que a deterioração de metais e suas ligas, em função dos mecanismos relacionados à ação dos micro-organismos têm maiores implicações econômicas em comparação aos materiais não metálicos. Contudo, qualquer patrimônio cultural, não importa o material utilizado, deve ser preservado, já que está sujeito à deterioração com o tempo (HERRERA; VIDELA, 2009; HERRERA et al., 2004; BEECH, 2004).

Algumas pesquisas vêm sendo realizadas focando a resistência dos materiais, em particular rochas de diferentes naturezas como calcário, arenito, mármore, entre outras (CHIAVARI *et al.*, 2010; POLIKRETI *et al*., 2009; BERNARDI *et al*., 2009). A seguir, será feita uma abordagem mais detalhada apenas para concreto/argamassa e metal, por serem os materiais dos patrimônios do Museu Nacional do Rio de Janeiro e o Museu de Arte Contemporânea, envolvidos em processos de deterioração.

3.3.1. Concreto e argamassa

O concreto é um material heterogêneo de uso diversificado em construções, muitas das quais são patrimônios históricos. Esse material é obtido a partir da mistura de cimento com água, denominada "pasta", e materiais inertes, nomeados agregados. A depender da granulometria desejada, podem ser usados agregados de maior granulometria (agregados graúdos) como pedra britada e pedregulhos, e de pequena granulometria (agregados miúdos), como areia e pó de pedra, que passa a ser denominada argamassa (NEVILLE, 2015).

Na fabricação do cimento são usados os produtos minerais: calcário (carbonato de cálcio, $CaCO_3$), argila e gesso. A argila empregada na fabricação do cimento é constituída basicamente de silicato de alumínio hidratado, contendo minerais, dentre estes, o ferro em maior teor. O gesso é adicionado na fabricação do cimento para regular o tempo de "pega" no período de hidratação. Em geral, é utilizada a gipsita ($CaSO_4.2H_2O$), embora outras formas existam como bassanita ou hemidrato ($CaS.0,5H_2O$) e anidrita ($CaSO_4$). Portanto, são principais constituintes do concreto: o calcário, a sílica, a alumina e o óxido de ferro (ALLEN, 2013).

Em alguns casos de fabricação da argamassa, podem ser usados aditivos como cal, saibro, barro, caulim, entre outros para a obtenção de propriedades tais como aderência e endurecimento. As argamassas são empregadas para assentar tijolos, blocos, azulejos, ladrilhos, cerâmica, tacos de madeira, impermeabilizar superfícies, nivelar paredes, pisos, tetos e dar acabamento às superfícies (FAGUNDES NETO *et al.*, 2015).

A deterioração da argamassa ou do concreto, além dos efeitos visuais, compromete a estabilidade, bem como a durabilidade do material. Quando o concreto tem uma armadura interna, a mesma deve ser protegida, por isso quanto mais intacto estiver o concreto, menos susceptível estará a armadura à corrosão. Além do mais, alguns autores sugerem que alguns constituintes do concreto tem efeito inibitório no processo corrosivo, pois desenvolvem uma camada passivadora (GENTIL, 2011).

Neste cenário, a deterioração de concreto ou de argamassas é o resultado de uma ou mais causas, tais como o tipo e a qualidade dos materiais utilizados no preparo dos mesmos, o mau proporcionamento dos constituintes, a ausência ou a má aplicação de revestimento, bem como fatores climáticos e ambientais (FAGUNDES NETO *et al.*, 2015).

3.3.2. Tinta

Em geral são utilizados revestimentos, principalmente a aplicação de tintas, para proteção de materiais contra a deterioração. Entretanto, as construções revestidas com tintas em países de clima tropical são particularmente sujeitas a descoloração superficial causada pelo crescimento microbiano, o que, se não controlado, conduz a patologias tais como fissuras, rachaduras, e descamações, tornando o material sujeito à penetração de água. A descoloração causada pelo crescimento de micro-organismos, ou por incrustações, é o principal problema para pinturas manufaturadas, que por isso frequentemente incluem biocidas em suas formulações (SHIRAKAWA *et al.*, 2011; SHIRAKAWA *et al.*, 2002; GAYLARDE, 2002).

O mercado oferece uma infinidade de tipos de tintas. As mais utilizadas são acrílicas, látex PVA (acetato de polivinina), esmalte, epóxi e poliuretano. Por conta dessa grande variedade de opções é necessário saber qual o material em que será aplicada a tinta e o ambiente que o material será submetido. Por exemplo, para paredes são recomendadas tintas acrílicas e látex PVA. São constituídas, basicamente, por resinas, água, pigmentos e cargas. A resina é a parte não volátil da tinta, responsável pela formação da película que cobre e protege a superfície pintada (DONÁDIO; ABRAFITI, 2011; FAZENDA, 2009).

A tinta látex PVA é a tinta mais comumente encontrada nos interiores das residências. Essa tinta tem uma base solúvel em água e seca rapidamente, porém não é adequada para áreas externas. A tinta acrílica, de forma geral, tem aspecto muito similar à da látex, sendo solúvel em água e seca rapidamente. A diferença é que sua fórmula contém resinas acrílicas, o que proporciona ao produto alta impermeabilidade, tornando-se especialmente eficaz para pinturas externas. Outro fator importante é o custo superior da tinta acrílica em relação as tintas látex (THONG; TEO e NG, 2016).

A tinta esmalte, ao contrário dos exemplos anteriores é um tipo de tinta que não é solúvel em água. São tintas “a base óleo” (antigamente era composta de óleo) com produtos sintéticos que compõem a base mais comum para esse tipo de acabamento. As tintas esmalte são especialmente boas para a utilização em superfícies de ferro ou madeira, não sendo adequadas para o uso direto na parede, porque dependendo da aplicação podem surgir bolhas ou descascamento. O custo dessa tinta é mais alto do que o das outras, por conta de seu uso mais específico e em menores superfícies. As tintas epóxi e de poliuretano são sintéticas e não solúveis em água, e têm usos mais específicos, como a pintura de caixas d’água. São geralmente

diluídas em solvente específico e possuem catalisadores para auxiliar no processo de cura, devendo ser aplicadas sempre por mão de obra treinada, para evitar a formação de bolhas, descolamento da camada de tinta ou simplesmente mau acabamento (SCOTT-CLARK *et al.*; 2014; SCOTT-CLARK *et al.*, 2009).

Os problemas com a pintura estão relacionadas à interface do filme com o substrato e a própria película do revestimento. As causas mais prováveis do problema são a escolha inadequada da tinta, a incompatibilidade com o substrato, a diluição excessiva da tinta na aplicação e as condições meteorológicas, como temperatura e umidade. Como consequências prejudiciais ao aspecto das paredes dos monumentos históricos podem ocorrer a fissura parcial ou total da pintura, o deslocamento da argamassa do revestimento, a formação de manchas pela umidade, facilitando o desenvolvimento microbiano e a formação de eflorescência (a cal livre é uma mistura de hidróxido de cálcio e hidróxido de magnésio que reagem com o gás carbônico atmosférico, formando carbonato de cálcio e carbonato de magnésio) na superfície da tinta (FAGUNDES NETO *et al.*, 2015).

3.3.3. Metal

No mercado existem diversos materiais metálicos que variam quanto à sua propriedade físico-química e valor econômico. Obviamente, quanto mais resistente o material à corrosão maior o seu custo. Dentre os materiais metálicos, os aços carbono, por causa do seu baixo custo e das suas características, como alta resistência a impactos, ductibilidade, tenacidade e facilidade de soldagem, têm sido extensivamente empregados. Os aços carbono comuns são ligas, constituídas de ferro, carbono (0,008 a 2%). Devido ao baixo teor de carbono, esses aços se oxidam com extrema facilidade, apresentando baixa resistência à corrosão (ARAÚJO, 2011).

As ligas de ferro e carbono podem ser intencionalmente acrescidas de elementos inorgânicos, tais como níquel, cromo, manganês, tungstênio, molibdênio, vanádio, silício, cobalto e alumínio, com o objetivo de promover mudanças microestruturais que, por sua vez, levam a mudanças nas propriedades físicas e mecânicas, conferindo resistência à tração e à corrosão, elasticidade, ductibilidade, dureza, entre outras. Esses materiais denominados de aços especiais são melhores do que os aços carbono (SILVA, 2009; CARDOSO, 2005).

Na elaboração de muitos artefatos históricos são utilizados diferentes tipos de metais, por exemplo muitas estátuas são de bronze, além de alguns objetos que compõe as edificações possuem metal, desde janelas e portas a sinos em igrejas por exemplo. Outro problema que se apresenta bastante recorrente em construções, principalmente as mais modernas, é a corrosão no aço utilizado no concreto armado (MORENO *et al.*, 2015; MULVIN e LEWIS, 1994). Para o Museu de Arte Contemporânea especificamente, além da deterioração da argamassa, suas janelas e parte de sua armadura compostas de diferentes aços sofrem ação de processos corrosivos.

3.4. O FENÔMENO DE CORROSÃO/DETERIORAÇÃO

A corrosão pode ser definida como a deterioração de um material, por ação química ou eletroquímica do meio ambiente, aliado ou não, a esforços mecânicos. Normalmente o termo corrosão é utilizado para itens metálicos, ainda muito ligado a corrosão em indústrias, especialmente para patrimônios históricos é comumente denominado deterioração, de forma geral como está associado aos micro-organismos é chamado de biodeterioração (GENTIL, 2011; WARSCHEID; BRAAMS, 2000).

O fenômeno de deterioração acomete qualquer tipo de material, tanto de natureza inorgânica, como edificações de concreto/argamassa (pontes e casas históricas), e ligas metálicas, quanto de natureza orgânica, como a madeira. Neste contexto, qualquer artefato está sujeito ao fenômeno de deterioração. As estruturas dos materiais podem ser diferentemente comprometidas, visto que sua resistência pode variar de acordo com a agressividade do ambiente ao qual são expostas (HERRERA; VIDELA, 2009; JAMBO; FÓFANO, 2009).

O mecanismo de deterioração dos materiais é fortemente dependente das condições meteorológicas locais, tais como temperatura, precipitação pluviométrica, umidade relativa e radiação solar. A ação corrosiva da atmosfera é acentuada quando nela estão presentes poluentes, que podem ser líquidos, sólidos ou gasosos. Os três principais fatores comumente indutores do fenômeno de deterioração são intemperismo, poluição natural ou antropogênica, e atividade de micro-organismos (HERRERA; VIDELA, 2009).

Os poluentes de origem natural podem ser representados por sais marinhos e material particulado. Em zonas litorâneas, por exemplo, a superfície dos materiais são umedecidas e expostas a íons cloreto ou sulfato, presentes na água do mar, que impedem a formação da camada de passivação, isto é, não há a formação de películas protetoras sobre a superfície dos materiais, por conseguinte, tem-se a deterioração mais intensa (HERRERA; VIDELA, 2009).

Os poluentes de origem antropogênica, ou seja, oriundos das atividades humanas, podem ser exemplificados por óxidos de enxofre ou de nitrogênio, material particulado, compostos orgânicos voláteis, além de substâncias orgânicas e inorgânicas, constantemente lançadas na atmosfera principalmente pela geração de energia e pelos meios de transporte que fazem uso de combustíveis fósseis (HERRERA *et al.*, 2004; GAYLARDE *et al.*, 2002).

A corrosão atmosférica pode ocorrer em qualquer material exposto à atmosfera terrestre, sendo que a presença de água influência diretamente na deterioração do material, normalmente proveniente da chuva ou de condensação da umidade do ar, para que se estabeleça uma dissolução de poluentes e consequentemente aumentem a intensidade do processo de deterioração. Esse processo sofre a influência do volume de água, e também está relacionada ao tipo de material, aos componentes e as quantidades de poluentes (JAMBO e FÓFANO, 2009).

O desenvolvimento industrial tem sido apontado como uma das principais causas do aumento da emissão de poluentes para a atmosfera, principalmente as indústrias químicas e petroquímicas, e a utilização de combustíveis. Em particular, a emissão de óxidos de enxofre, de nitrogênio e carbono tem contribuído para os fenômenos da deposição ácida, podendo causar a corrosão de materiais metálicos, como ligas em estátuas, bem como não metálicos, como argamassa, concreto e mármore, que são intensivamente usados na construção de patrimônios históricos. Os ácidos ocasionam a deterioração do material pois reagem com componentes das argamassas e diminuem o pH (GENTIL, 2011).

No caso de dióxido de enxofre (SO_2), a sua reação com o oxigênio em um ambiente úmido resulta na formação de trióxido de enxofre (SO_3), que por sua vez pode ser oxidado a ácido sulfúrico (H_2SO_4), que ataca imediatamente o material. Do ponto de vista da corrosão, o óxido de nitrogênio (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2) também podem ocasionar corrosão severa;

principalmente, o NO_2 por ser um forte agente oxidante. Além disso, o NO_2 possui forte sinergismo com o SO_2, cuja reação conduz à formação de enxofre elementar (S), significativamente corrosivo (JAMBO; FÓFANO, 2009).

O gás carbônico também apresenta aspecto corrosivo, pois a solubilidade do CO_2 em água leva a formação ácido carbônico ($H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3$), que por sua natureza instável, se dissocia com formação do cátion H^+ e do aníon HCO_3^-, causando uma diminuição do pH, e em consequentemente a intensificação da ação corrosiva da água (TORRES, 2001).

O gás carbônico pode também atuar sobre argamassa e concreto, podendo ocorrer o fenômeno de carbonatação, que é facilmente encontrado em centros urbanos. Nestes ambientes, o concreto está exposto à alta concentração de gás carbônico (CO_2). Esse dióxido de carbono penetra nos poros do concreto, dilui-se na umidade presente na estrutura e forma o H_2CO_3 ($CO_3^{-2} + 2H^+$) que reage com alguns componentes da pasta de cimento hidratada, onde ocorre a formação de produtos com pH de precipitação inferior a 9. O resultado final é a formação de água e carbonato de cálcio ($CaCO_3$). Na reação de carbonatação são consumidos compostos essencialmente alcalinos da pasta hidratada de cimento como hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), podendo também consumir silicatos alcalinos. A carbonatação inicia-se na superfície da estrutura e avança em direção ao interior do concreto/argamassa, causando severos danos (ABRANTES *et al*., 2007).

Em zonas litorâneas, por conta da névoa salina, os íons cloretos (Cl^-) são os principais causadores de corrosão, em especial no concreto armado e na argamassa, pois podem diminuir a ação protetora da película de passivação existente no meio alcalino e consequentemente a resistividade do concreto/argamassa, facilitando a corrosão de armaduras. Pode haver também alternância de molhabilidade e secagem. Essa ação alternada ocasiona saturação do concreto, com água do mar e a evaporação dessa água associada, que ocasiona acúmulo de sais na superfície do material e é possível a permeação de cloretos, tornando a área de variação mais sujeita a corrosão (GENTIL, 2011).

Adicionalmente, o cloreto de sódio eleva a condutividade da solução eletrolítica, fazendo com que seja formada uma complexa camada composta de óxidos e hidróxidos de ferro. Estes produtos de corrosão são volumosos, e pouco aderentes, o que permite que o filme d'água, possa ser removido com facilidade da superfície, deixando o metal novamente exposto e, assim,

susceptível ao processo corrosivo. Por outro lado, em filmes com baixa condutividade há formação de produtos de corrosão compactos e aderentes à superfície, o que pode resultar em efeito protetor (GENTIL, 2011; VIDELA, 2002; HELENE, 1986).

A presença de materiais particulados na atmosfera, como sujeira e fuligem, também pode ser a causa de aceleração do processo de deterioração. Por exemplo, a deposição desses materiais sobre as superfícies metálicas pode resultar na formação de pilha de aeração diferencial; e, no caso de substâncias higroscópicas, a retenção da umidade contribuirá no estabelecimento de corrosão sob depósitos em qualquer superfície, bem como facilitar o desenvolvimento dos micro-organismos (JAMBO; FÓFANO, 2009).

3.4.1. Corrosão induzida microbiologicamente (CIM)

Quando a deterioração de um material se processa sob a influência de micro-organismos, este processo é denominado biocorrosão, biodeterioração ou Corrosão Induzida Microbiologicamente. Os micro-organismos são capazes de iniciar, facilitar ou acelerar o processo corrosivo, mantendo a natureza eletroquímica da corrosão (NAGIUB; MANSFELD, 2001).

A biodeterioração de superfícies metálicas e/ou não-metálicas é acompanhada pela formação e estabelecimento de estruturas complexas denominadas biofilmes, que são constituídas de depósitos biológicos e substâncias poliméricas extracelulares insolúveis, principalmente de natureza polissacarídica, na forma de gel altamente hidratado, contendo cerca de 95% de água. Na matriz polissacarídica encontram-se inseridas as células de micro-organismos e detritos orgânicos e inorgânicos, o que cria um meio nutricionalmente propício ao desenvolvimento dos micro-organismos. A formação de biofilmes é um processo acumulativo dinâmico e geralmente não uniforme, sua composição e distribuição variam significativamente, sendo governadas pelo tipo de material ao qual está colonizado (VIDELA; HERRERA, 2005; TELEGDI; SHABAN; KÁLMÁN, 2000; O'TOOLE *et al*., 2000).

Para ocorrer a biodeterioração em monumentos históricos, é necessário ter um ambiente propício para o desenvolvimento dos micro-organismos, ou seja, deve haver um superfície susceptível a sua aderência, bem como condições que propiciem o seu desenvolvimento. Por exemplo fatores abióticos como umidade, luminosidade, temperatura, ambiente salino e a

presença de gases corrosivos são relevantes para deterioração de monumentos históricos (BERNARDI *et al.,* 2009; SARRÓ *et al.,* 2006; SANCHÉS-MORAL *et al.,* 2005).

3.4.1.1.Biosusceptibilidade

Como visto anteriormente, a biodeterioração é definida como qualquer mudança indesejável nas propriedades de um material, que a ocorrência dependa da presença de organismos. A biosusceptibilidade do material para a colonização microbiana é o conjunto das propriedades do material que podem contribuir para o estabelecimento, a ancoragem e o desenvolvimento da microbiota (COUTINHO *et al.,* 2015).

Por exemplo, para argamassas, biosusceptibilidade se refere principalmente às propriedades que o material possui e também adquire ao ser exposto a condições climáticas, tais como rugosidade, porosidade, umidade e composição química da superfície. A biosusceptibilidade do material pode ser dividida em primária, secundária e terciária. Quando o material não está ainda exposto para a colonização, a biosusceptibilidade será expressa apenas durante a primeira colonização de micro-organismos, enquanto as propriedades do material permanecem muito similares ou idênticas para este estado inicial, será denominada biosusceptibilidade primária. As características destas propriedades podem sofrer alterações, devido a ação de colonização de micro-organismos ou fatores que causam mudanças e resultam em um novo tipo de biosusceptibilidade denominada secundária. Alguma atividade humana afetando o material, por exemplo consolidação, pinturas com biocidas ou polimento de superfície, também modifica propriedades inicial ou secundária do material, induzindo a biosusceptibilidade terciária (GUILLITTE, 1995).

Com respeito à colonização em paredes, os micro-organismos se colocam sobre as imperfeições e poros da superfície, bem como as chuvas e ventos trazem pequenos fragmentos de origem vegetal, animal, esporos, células microbianas, minerais e poluentes do ar. Uma vez sobre a superfície, os micro-organismos aderem-se e crescem a uma taxa de desenvolvimento que depende da natureza do revestimento e das condições ambientais. Condições hidrotérmicas são particularmente importantes; alta umidade e condensação, que aliado junto com um aumento de temperatura pode favorecer o crescimento (GAYLARDE *et al*., 1998).

3.4.1.2.Etapas de formação dos biofilmes

A colonização microbiológica de superfícies dos materiais depende de vários fatores físicos e químicos, tais como, disponibilidade de água e de fontes nutricionais, pH, temperatura, fatores microbiológicos, composição, porosidade e permeabilidade do material. Adicionalmente, o desenvolvimento dos biofilmes depende de condições que tornem o ambiente propício à fixação dos micro-organismos ao material. A presença de substâncias químicas, como poluentes atmosféricos e biocidas, também pode ter ação direta no desenvolvimento dos micro-organismos em biofilmes. (GENTIL, 2011; TELEGDI; SHABAN; KÁLMÁN, 2000).

Em particular, os poluentes podem reagir com os materiais afetando suas propriedades, ou favorecendo sua deterioração por rotas químicas, físicas ou biológicas. Os micro-organismos provocam danos aos materiais por meio do consumo direto de seus constituintes químicos, pela geração de produtos metabólicos agressivos, como ácidos orgânicos e inorgânicos, e por criar condições favoráveis para outros micro-organismos cujo metabolismo seja agressivo aos materiais e por criar condições de aeração diferencial (HERRERA *et al.*, 2004; GAYLARDE *et al.*, 2002).

A deposição de substâncias sobre a superfície sólida, sobre um material metálico ou não, formando uma pré-camada de moléculas orgânicas e inorgânicas, denominada filme condicionador, que servirá de nutrientes para o desenvolvimento dos micro-organismos que por ventura venham a se aderir. Como consequência, criando-se as condições para sua posterior fixação à superfície sólida, seguindo-se a formação do biofilme (DE FRANÇA *et al.*, 2009).

O ciclo biológico de desenvolvimento do biofilme inclui os processos de iniciação, maturação, manutenção e desprendimento. Este ciclo pode ter início a partir de células planctônicas (livres no ambiente) de diferentes espécies microbianas, que isoladas ou e conjunto, ao interagir com a superfície resultam na formação de microcolônias. A formação do biofilme tem início com a adesão dos micro-organismos à superfície do material e pode ser reversível ou irreversível. A adesão reversível ocorre mediante ligações fracas, como as forças de van der Waals e atração eletrostática, deixando a célula ainda sujeita ao desprendimento, o que possibilita que sejam facilmente removidas, por exemplo, pela água da chuva, ventos, entre outros (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1990).

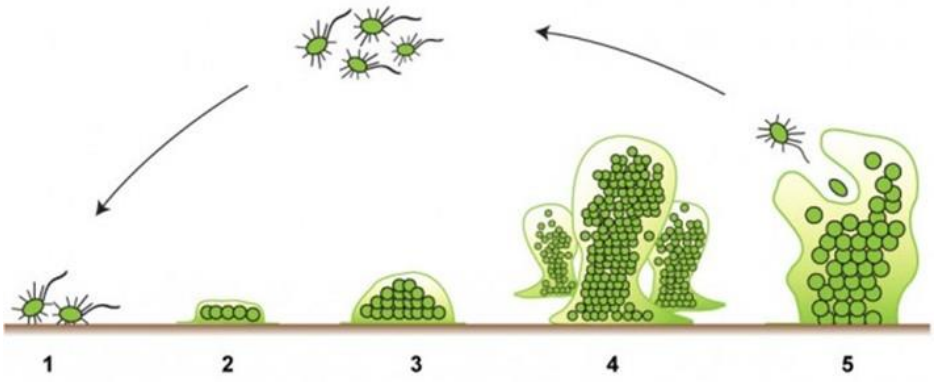


Figura 3.5. Etapas da formação de um biofilme. (1): adesão; (2-3): colonização; (4): maturação; (5): desprendimento. Fonte: emery pharmaservices (2016)

O processo irreversível depende do tempo de contato e da produção de material polimérico extracelular produzido pelos micro-organismos. Uma vez fixadas ao material, há a colonização microbiana e o crescimento celular, com a síntese e excreção de exopolímeros, que podem mediar à fixação de novas células de distintos grupos microbianos distintos. Ainda existindo nutrientes, os biofilmes continuam se desenvolvendo, no entanto, quando ocorre supressão deles, os micro-organismos podem se destacar do biofilme. Em patrimônio históricos essa ação pode ser devido ao vento, ou mesmo por chuvas (O'TOOLE *et al*., 2000).

Com o crescimento do biofilme, a difusão de oxigênio e de nutrientes para o interior é dificultada criando condições não favoráveis para os micro-organismos aeróbios nele existentes, podendo ocorrer sua morte e, consequentemente, o enfraquecimento da matriz polimérica. O desprendimento parcial, ou mesmo total, do biofilme da superfície, pode ocorrer de forma aleatória e depende da atividade dos micro-organismos aderidos ao suporte sólido (CHARACKLIS, 1990).

Considerando a superfície metálica, a atividade dos micro-organismos aeróbios em biofilmes resulta em formação de zonas anaeróbicas, estabelecendo células oclusas de corrosão; fenômeno relacionado à diferença de potencial eletroquímico entre uma região com determinada concentração de íons ou oxigênio e outra com concentração diferente, isto é, força motriz, a qual rege a aeração diferencial. A região menos aerada, contendo depósitos que podem ser restos de pintura, sujeiras, graxas, acúmulos de terra ou areia, entre outros, apresenta característica anódica, enquanto a região mais aerada, sem depósitos, apresenta característica catódica, podendo servir de eletrólito a umidade do ar. A formação do biofilme além de

circunscrever um ambiente favorável para os micro-organismos, também protege da ação de biocidas (JAMBO; FÓFANO, 2009; COSTERTON *et al*.,1995).

Adicionalmente, a atividade dos micro-organismos aeróbios em biofilmes pode estabelecer condições favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos anaeróbios. Como exemplo, as bactérias redutoras de sulfato, cuja atividade metabólica gera gás sulfídrico (H_2S), um agente fortemente corrosivo. Neste contexto, os biofilmes mudam drasticamente as características físico-químicas do ambiente em contato com a estrutura do material, interface superfície/filme d'água, e, geralmente, aumentam a agressividade da corrosão. Logo, considerando a ubiquidade da vida microbiana, bem como a ação agressiva de diversos compostos por eles produzidos, pode-se presumir a efetiva participação dos micro-organismos na deterioração de materiais (ORNEK *et al.*, 2002, NAGIUB; MANSFELD, 2001).

3.4.1.3.Micro-organismos envolvidos na deterioração de patrimônios históricos

Os patrimônios históricos são comumente pobres em nutrientes e estão expostos a variações extremas de umidade, erosão mecânica por atuação de chuvas e ventos, além de altas doses de radiação UV. Entretanto com a capacidade de adaptação dos micro-organismos a esses *habitats*, pode vir a desenvolver comunidades microbianas epilíticas, dominadas por bactérias, fungos, algas e liquens, em climas temperados e em climas frios. Todos esses grupos microbianos tem sido reconhecidos efetivos na biodeterioração de diferentes materiais, tanto pela direta ação no material como na modificação da cor da superfície do material e sua textura (CUTLER *et al.*, 2013; PEPE *et al*., 2010; STERFLINGER, 2010).

Como visto anteriormente, os micro-organismos são bastante versáteis e se adaptam facilmente ao mais diversos ambientes. A Tabela 3.1 sumariza alguns grupos baseados em seus requerimentos nutricionais. Os micro-organismos heterotróficos se desenvolvem apenas quando há matéria orgânica assimilável disponível. Já para os autotróficos, os constituintes inorgânicos representam substâncias com potencial nutritivo e energético para seu desenvolvimento. Ambos preferem superfícies com alto teor de umidade (KUMAR; KUMAR,1999).

Os micro-organismos heterotróficos podem crescer sobre pinturas que, em geral, contêm uma grande variedade de constituintes orgânicos e inorgânicos. Alguns desses constituintes

podem servir de fontes de carbono e energia para diferentes espécies microbianas. Por exemplo, a celulose, constituinte de algumas tintas, pode ser metabolizada por fungos filamentosos. Por outro lado, a presença de solventes orgânicos e metais pesados, utilizados para a pigmentação das tintas, podem ser inibitórios para o metabolismo microbiano. Tem-se também a presença de biocidas em algumas tintas que podem restringir o desenvolvimento de algumas espécies microbianas. Cabe ainda mencionar que a aplicação da pintura se não for bem executada pode criar imperfeições facilitam a adesão e consequentemente a formação de biofilmes de superfícies. (CUTLER *et al.*, 2013; PEPE *et al.*, 2010).

No caso de colonização de patrimônios por organismos fotossintetizantes, a presença de luz solar é essencial. Em contrapartida, os organismos quimiossintetizantes podem realizar seu metabolismo na ausência de luz, obtendo sua energia a partir da metabolização de substâncias químicas. Já os organismos fotoautotróficos, tais como cianobactérias, algas, musgos, e plantas superiores, ao utilizar a luz do sol como fonte de energia durante a fotossíntese, liberam oxigênio o que irá fornecer a atividade dos micro-organismos aeróbios. Para esses organismos, o carbono requerido é obtido pela fixação do CO_2 do ar. Existem também bactérias quimioautotróficas que também obtêm carbono pela fixação do CO_2 da atmosfera, embora a fonte de energia seja obtida a partir da oxidação de compostos inorgânicos (amônia, nitratos, nitritos, sulfetos, tiossulfatos ou enxofre elementar), variável de acordo com a espécie bacteriana. Como produtos do metabolismo, estas bactérias liberam ácidos nitroso (*Nitrosomonas* spp.), nítrico (*Nitrobacter* spp.) ou sulfúrico (*Acidithiobacillus* spp), ou seja, produzem agentes biodeteriorantes de rochas, materiais cimentícios e metais (KUMAR; KUMAR, 1999).

Tabela 3.1. Classificação dos micro-organismos participantes da biodeterioração

Categoria Nutricional	Fonte de Energia	Fonte de carbono	DE	AE	Grupos de organismos
Fotoautotróficos	Luz solar (organismos fotossintéticos)	CO_2	H_2O	Oxigênio, Compostos orgânicos	**Organismos Aeróbios:** Cianobactérias, algas, Liquens, plantas superiores e musgos
Quimioautotróficos	Reações Redox (organismos quimiossintéticos)	CO_2		Oxigênio	**Organismos Aeróbios:**
			H_2		Bactérias do hidrogênio
			Fe^{+2}		Bactérias do ferro
			NH^{+4}, NO_2		Bactérias nitrificantes
			S, $(S_2O_3)^{-2}$		Bactérias oxidantes de enxofre
Foto-heterotróficos	Luz solar (organismos fotossintéticos)	Compostos orgânicos	Compostos orgânicos	Oxigênio	**Organismos Aeróbios:** Bactérias fotossintéticas e algumas algas
					Organismos anaeróbios:
			H_2S	Compostos orgânicos	Bactérias verdes e púrpuras do enxofre
			H_2		Bactérias púrpuras não-enxofre
Quimio-heterotróficos	Reações Redox (organismos quimiossintéticos)			oxigênio	**Organismos Aeróbios:** Actnobactéria, Animais, fungos, Bactérias aeróbias
					Organismos anaeróbios:
		Compostos orgânicos	Compostos orgânicos	Compostos orgânicos	Bactérias fermentativas
			H_2S	NO^{-3}	Bactérias denitrificantes
			S, $(S_2O_3)^{-2}$	$(SO_4)^{-2}$	Bactérias Redutoras de Enxofre

DE - Doadores de elétrons; AE - Aceptores de elétrons (Fonte: Adaptado KUMAR; KUMAR, 1999).

As bactérias quimio-heterotróficas e fungos usam substratos orgânicos como fontes de carbono e energia. Esses organismos comumente liberam ácidos orgânicos corrosivos ou que enfraquecem o mineral pela oxidação dos cátions metálicos tais como Fe^{2+} ou Mn^{2+}. Algumas bactérias sulfo-oxidantes dependem da oxidação de compostos reduzidos de enxofre como fonte de energia, como é o caso das espécies do gênero *Acidithiobacillus*, que produzem ácido sulfúrico, ocasionando a desintegração da argamassa, resultando na perda de sua integridade. Os sulfatos formados podem precipitar na superfície do material cimentício e serem lixiviados, dissolvidos ou recristalizar-se com formação de compostos com características expansivas que podem ocasionar a fissuração ou esfoliação da argamassa, se localizados dentro dos poros do material. As bactérias quimio-heterotróficas incluem uma variedade de gênero tais como *Alcaligenes, Arthrobacter, bacillus, Paenibacillus, Flavobacterium, Pseudomonas, Staphulococcus, Nocardia, Mycobacterium e Sarcina*, nos quais são mais frequentemente encontrados isolados de paredes revestidas (PEPE *et al.*, 2010; WARSCHEID; BRAAMS, 2000; KUMAR; KUMAR, 1999).

O processo corrosivo também pode ser induzido por algumas espécies de bactérias e de fungos filamentosos que apresentam a capacidade de consumir as substâncias empregadas como agentes inibidores de corrosão. Neste caso, os materiais metálicos não são mais protegidos e ainda há aumento da densidade microbiana no biofilme. Esses micro-organismos tem a capacidade de degradar revestimentos, técnica muitas vezes adotada para a proteção de metais, principalmente os de baixa resistência à corrosão, como é o caso do aço carbono. Esses micro-organismos atuam diretamente na corrosão por consumirem os compostos constituintes dos revestimentos, como também pela secreção de enzimas líticas, ou de compostos ácidos. A área descoberta pode então vir a sofrer o ataque de agentes corrosivos, como por exemplo, ácidos orgânicos ou inorgânicos formados pelo metabolismo microbiano. Outra possibilidade é a deterioração do material devido à ruptura do revestimento pela difusão de gases gerados por células presentes nos biofilmes a eles aderidos (ARAÚJO, 2011; CHEN *et al*., 1994).

Segundo Pinheiro *et al.* (2013) os micro-organismos podem causar a deterioração de rochas, por exemplo, calcárias e arenitos, pela síntese, excreção de ácidos e enzimas, ocasionando a solubilização de cálcio e de potássio. Como se pode inferir, existe uma microbiota muito diversificada com capacidade de agir na deterioração de materiais, por diferentes rotas metabólicas. Assim, infere-se que, dependendo das condições ambientais e das propriedades físico-químicas do material, ter-se-á a atuação de consórcios microbianos de

variadas complexidades (WARSCHEID; BRAAMS, 2000). Os principais grupos de micro-organismos relacionados a CIM são abordados a seguir:

a) Ferrobactérias

O grupo compreende bactérias redutoras e oxidantes do ferro, por isso, também denominadas precipitantes de ferro, que se apresentam diferenciadas tanto na morfologia quanto metabolicamente. Por isso, têm efetiva participação principalmente na corrosão de materiais metálicos que apresentem ferro em sua composição. Ademais a participação em argamassa e concreto é mais discreta, devido ao menor teor de ferro nessas substâncias. Dentre as espécies normalmente associadas ao processo de corrosão, estão *Acidithiobacillus ferrooxidans, Gallionella ferruginea e Leptospirillum ferrooxidans.* Os gêneros mais comuns além das espécies citadas são *Crenothrix, Leptothrix, Clonothrix, Sphaerotillus, Sideromonas* e *Siderocaspa* (GENTIL, 2011; MADIGAN *et al.,* 2010; VIDELA, 2003; EDWARDS *et al.,* 2001).

Exceto pelas espécies dos gêneros *Leptothrix* e *Sphaerotillus*, que são capazes de crescer em ambientes com baixa concentração de oxigênio, estas bactérias crescem autotroficamente obtendo energia a partir da oxidação do íon ferroso a férrico, o que resulta na formação de $Fe(OH)_3$ ou $Fe_2O_3.H_2O$, compostos insolúveis, que quando depositadas sobre as superfícies metálicas, podem levar a ocorrência de corrosão por aeração diferencial (GENTIL, 2011; STAROSVETSKY *et al*., 2001).

Em complemento, algumas bactérias podem utilizar o íon férrico (Fe^{+3}) como aceptor final de elétrons gerando energia a partir da oxidação de distintos compostos químicos, inclusive aromáticos. Neste caso, os principais gêneros representativos são *Pseudomonas, Bacillus, Bacteroides, Geobacter, Serratia, Clostridium, Rhodoferax, Desulfitobacterium, Sulfolobus, Acidithiobacillus, Acidiphilium, Sulfobacillus, Trichoccoccus, Fulvimonas, Shewanella* e *Desulfovibrio*. Normalmente, a redução do íon férrico se dá na ausência de oxigênio, embora também tenha sido constatada em condição de aerobiose (JONES; DAVISON; GARDENER, 1984; NEALSON, 1983).

b) Bactérias produtoras de ácido

Este grupo é caracterizado por organismos que utilizam mecanismos de produção de ácidos que, em alguns casos, podem ter ação quelante, causando a dissolução do material

através da mobilização de cátions de Ca, Fe, Mn, Al e Si. Normalmente, a ação dessas bactérias é associada à descoloração de rochas (BARRINUEVO, 2004; KUMAR; KUMAR, 1999).

Em geral, esses micro-organismos apresentam um sistema enzimático complexo, o qual permite utilizarem diversos tipos de substâncias químicas, desde moléculas simples até poliméricas. Como resultado do metabolismo microbiano, podem ser produzidos diferentes ácidos de cadeias curtas, como ácido fórmico, acético, lático, propiônico e butírico. No caso dos ácidos inorgânicos, além do ácido sulfúrico produzido pelas bactérias oxidantes de enxofre, pode haver geração de outros ácidos inorgânicos como ácido nítrico, por *Nitrobacter* e *Pseudomonas*, ácido nitroso por *Nitrosomonas* e ácido sulfídrico por BRS e *Clostridium* (ARAÚJO, 2011; SILVA, 2009).

c) Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

As BRS são quimio-heterotróficas, portanto usam compostos orgânicos, como fontes de carbono e energia, desde ácidos orgânicos simples e alcoóis de cadeia curta até compostos de complexidade elevada. Este grupo é composto por diferentes espécies que em comum apresentam a capacidade de realizar o processo de respiração anaeróbica, denominado redução desassimilativa do sulfato, onde o sulfato é o aceptor final de elétrons, com geração de gás carbônico e de sulfetos (gás sulfídrico, sulfetos e bissulfetos metálicos), em alta concentração. O gás sulfídrico (ou ácido sulfídrico) é um agente altamente reativo, tóxico e corrosivo, enquanto o sulfeto de ferro (FeS) é reconhecidamente acelerador da formação de célula galvânica no aço, sendo a massa depositada sobre o metal diretamente proporcional à taxa de corrosão. A dissolução de óxidos metálicos depositados sobre a superfície metálica, que em alguns casos pode favorecer a sua passivação, pela ação do ácido sulfídrico, pode intensificar o processo de corrosão na região anódica (VIDELA, 2002).

O hidrogênio gerado pela redução da água na região catódica ao adsorver à superfície e recobri-la totalmente promove a sua polimerização, isto é, impede que haja consumo de elétrons e, portanto, interrompe o processo de corrosão. Contudo, algumas BRS são hidrogenase positiva, o que lhes permite consumir o hidrogênio molecular adsorvido à superfície do metal na região catódica, promovendo a despolarização catódica, o que concorre para o avanço do ataque do metal. Normalmente estas bactérias são encontradas em ambientes marinhos devido à presença de sulfato na água do mar, em concentração de cerca 3.000 ppm (ARAÚJO, 2011; LIAMLEAM; ANNACHHATRE, 2007; CHEN *et al.*, 1994).

Algumas espécies de BRS, quando na fase séssil, também são capazes de produzir exopolímeros, promovendo a sua aderência à sedimentos, e o seu desenvolvimento em diferentes ambientes. Além das estruturas metálicas, o concreto ou argamassas podem ser alvos das BRS pela produção de ácidos, causando inconvenientes como por exemplo a diminuição do pH e formação de sulfoaluminato de cálcio, resultando na deterioração do concreto ou argamassa. Esse fenômeno pode acarretar fissuração, desagregação e problemas de coesão entre a pasta de cimento e os agregados e, por consequência, a perda de resistência mecânica do material (MIRANDA *et al.*, 2006; FANG; XU; CHAN, 2002).

d) Actinobactérias

São bactérias, na maioria, Gram-positivas, com ampla diversidade morfológica e fisiológica. Este grupo compreende várias espécies produtoras de antibióticos, metabólitos secundários produzidos no final da fase exponencial do crescimento ou na fase estacionária. Também são notórios pela produção de pigmentos, de enzimas extracelulares e de terpenóides, como a geosmina, que confere o odor característico do solo após decorrência da chuva. Esses micro-organismos, como alguns fungos, têm a capacidade de produzir enzimas que levam à degradação da celulose e da lignina. Portanto, são importantes agentes de degradação de materiais lignocelulósicos, embora o grau de degradação seja inferior ao apresentado pelos fungos filamentosos. A produção de pigmentos pode modificar a coloração dos monumentos, enquanto a ação das enzimas podem danificar as suas estruturas e revestimentos (OLIVEIRA, 2002).

As actinobactérias estão amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em humanos, animais, plantas, alimentos, rochas, águas residuais, e, principalmente, em solos. Em relação à fonte de energia podem ser foto ou quimiotróficas e quanto à fonte de carbono existem autotróficas e heterotróficas. Quanto à tensão de oxigênio, a maioria é aeróbia estrita, mas também existem espécies facultativas, microaerófilas e anaeróbias estritas, com crescimentos em ampla faixa de temperatura e pH (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000).

e) Fungos

Os fungos são organismos eucariotos, heterotróficos que obtêm nutrientes por absorção através da parede e membrana celular, podendo se apresentar em forma celular (leveduras) ou filamentosa (fungos filamentosos ou bolores). São ubíquos e em muitos casos estão em simbiose com outros organismos ou são parasitas (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

As leveduras se apresentam como organismos aeróbios estritos e facultativos, enquanto os fungos filamentosos ocorrem como aeróbios estritos. Comparativamente, os fungos filamentosos toleram faixas mais amplas de pH e temperatura. Esses micro-organismos têm capacidade de se desenvolver sobre a superfície de materiais e/ou dentro de poros e fissuras, atuando na desagregação de monumentos feitos de pedra, argamassa, concreto e gesso, pois tem alta atividade e produção de metabólitos ácidos e de dióxido de carbono, com participação na deterioração de patrimônios históricos (STERFLINGER, 2010).

Por exemplo, as superfícies dos patrimônios históricos podem ser habitadas por fungos, em todas as regiões climáticas da terra. Em climas moderados ou úmidos, as comunidades fúngicas são dominadas por *Hyphomycete*s, incluindo espécies dos gêneros *Alternaria, Cladosporium, Epicoccum, Auerobasidium* e *Phoma.* Em ambientes áridos e semiáridos, as comunidades de fungos mudam para leveduras pretas e microcolônias pretas de fungos filamentosos. Os fungos pretos pertencentes aos gêneros *Hortaea, Sarcinomyces, Coniosporium, Capnobotryella, Exophiala* e *Trimmatostroma,* formam pequenas colônias sobre a superfície e dentro dos materiais, e frequentemente são associados a algas ou cianobactérias. As espécies A*spergillus glaucus* e *Penicillium chrysogenum,* também são reconhecidamente como produtores de ácidos orgânicos, responsáveis pela lixiviação de minerais, e consequente desmineralizam rochas, argamassas e concretos (PITRE *et al*., 2013; STERFLINGER, 2010).

Jurado *et al*. (2008) encontraram nas paredes do monastério de "*la Rabida*" (Espanha) os fungos dos gêneros *Trichothecium, Acremonium, Clodosporium, Aspergillus* em grande abundância, e em menor proporção foram encontrados *Alternaria* e *Arthirinium*, para os autores esses micro-organismos foram os principais causadores da deterioração.

f) Cianobactérias, algas e liquens

As cianobactérias são micro-organismos procariontes que possuem fisiologia complexa e geralmente são capazes de se adaptar a condições ambientais adversas, nos mais diferentes nichos ecológicos. A resistência a grandes flutuações de umidade e temperatura podem explicar sua maior distribuição em climas tropicais, quando comparadas às algas. Elas têm sido reportadas por causar danos estéticos a patrimônios históricos, pela formação de biofilmes de variadas cores, em função da produção de pigmentos fotossintetizantes, detritos celulares e/ou produtos microbianos (GAYLARDE; GAYLARDE, 1999).

A presença de uma camada superficial de cianobactérias, bem como de outros micro-organismos, facilita a adesão de partículas, pólen, cinzas, entre outras, que dificultam a formação de camadas protetoras, além de causar danos físicos e químicos aos materiais. Também podem incrementar a capacidade de retenção de água, o que aumenta o desenvolvimento populacional microbiano (BARRINUEVO, 2004).

As algas são organismos eucariontes, unicelulares ou pluricelulares, que realizam fotossíntese por conterem clorofila e outros pigmentos fotossintetizantes. Alguns apresentam a capacidade de produzir ácidos orgânicos com ação corrosiva. Além disso, excretam compostos que podem servir de nutrientes para outros micro-organismos presentes nos biofilmes, favorecendo o crescimento da microbiota séssil e, deste modo, intensificando a biodeterioração (ARAÚJO, 2011).

Algumas algas, assim como as cianobactérias, formam filmes que facilitam a adesão de material particulado, bactérias, fungos, briófitas, plantas superiores, entre outras. São também capazes de produzir proteínas quelantes e ácidos orgânicos, que aumentam a solubilidade dos constituintes da superfície a qual estão aderidas, alterando a propriedade superficial, deixando o material mais frágil e susceptível a danos mecânicos. Adicionalmente, as algas de vida endolítica possuem a capacidade de aumentar fissuras e rachaduras, uma vez que seu volume é aumentado proporcionalmente à elevação de umidade (CANEVA *et al.*, 1991).

Os liquens são a associação simbiótica entre fungos filamentosos e algas ou cianobactérias. Acredita-se que os fungos utilizam nutrientes orgânicos produzidos pelas algas por meio de fotossíntese e, em contrapartida, estes micro-organismos fazem proveito dos minerais lixiviados dos patrimônios pelos ácidos secretados pelos fungos. Além disso, os fungos também protegem as algas de condições ambientais adversas, tais como a dessecação e a ação de substâncias tóxicas (WARSCHEID; BRAAMS, 2000).

Os liquens tem excepcional capacidade de se adaptar, sobreviver e prosperar em várias condições climáticas sobre vários substratos. Em patrimônios históricos, a biodiversidade de liquens, sua ação de biodeterioração e os possíveis aspectos de preservação do substrato tem sido apontado com um dos principais focos de estudo (CUZMAN *et al*, 2013; WARSCHEID; BRAAMS, 2000).

Uma alga que atua ativamente na deterioção de monumentos históricos é a *Trentepohlia*, com produção de pigmentos rosas e/ou marrons, na descoloração de pinturas, estruturas de concretos e argamassas. Por exemplo, na superfície de monumentos Maias, no sítio de Edzna, na cidade de Campeche (México), foram observadas áreas com coloração cinza, preta, marrom e rosa, predominantemente colonizadas por cianobactérias, também detectadas como endolíticas. A principal biomassa rosa sobre a superfície foi *Trentepohlia umbrina* e alguns pontos pretos, sobre essa pigmentação foram caracterizados como liquens, apesar de não serem encontradas hifas fúngicas (GAYLARDE et al., 2006).

g) Musgos e protozoários

Os musgos são eucariotos autotróficos representantes do grupo das briófitas e como tal não apresentam vasos lignificados condutores de água e sais minerais. Podem viver sobre os mais variados tipos de substrato, como ramos de árvores, folhas, troncos em decomposição, solos e rochas, geralmente em locais úmidos. Toleram diferentes condições ambientais extremas e por isso ocorrem nos mais variados ecossistemas e em grande quantidade de *habitats*, sendo distribuídos por todo o mundo. Os musgos possuem pigmentos e sua ação mecânica pode atingir 1cm de profundidade, em superfícies geralmente alcalinas como o cimento e facilitam a colonização secundária de plantas maiores. Adicionalmente, auxiliam na captação de fragmentos e acumulam sujeira (ALLSOP *et al.*, 2016; CANEVA *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2011; BRAGA, 2003)

Os protozoários são organismos eucariotos heterotróficos encontrados em diferentes ambientes aquáticos e locais úmidos. Algumas espécies vivem em associação com outros organismos, na forma de parasitas. A deterioração associada a esse grupo está ligada principalmente por causar manchas, entretanto em alguns casos pode ocorrer a produção de metabólitos danosos à estrutura. Entretanto, esse grupo microbiano não é muito encontrado na biodeterioração de monumentos históricos, sendo comumente associados a indústria de alimentos e tratamento de efluentes (MADIGAN *et al.*, 2010).

3.5. PREVENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE MONUMENTOS HISTÓRICOS E O CONTROLE DA BIOCORROSÃO

O conceito de que materiais, tais como, metais ou concretos, quando expostos ao tempo, por longos períodos, podem sofrer biodeterioração, está bem estabelecido. Esta deterioração ocorre em função de inúmeros mecanismos, resultando em diferentes alterações, por exemplo, mudança na coloração, formação de crostas sobre superfícies e perda de massa, caracterizando seu dano estrutural (SARRÓ *et al.*, 2006).

De fato, desde a antiguidade, quando o homem passou a fabricar seus próprios utensílios, já havia a preocupação de estabelecer formas de minimizar a deterioração natural dos materiais. Antes da história escrita já se conhece o cuidado do homem em preservar cavernas, bem como tempos mais tarde, a preocupação na proteção das múmias no Egito antigo, a preservação de armas por romanos e árabes, utilizando tintas e ligas ferrosas, respectivamente (JAMBO; FÓFANO, 2009).

A minimização da deterioração está baseada em macroestratégias de foco preventivo, que podem ser exemplificadas por diferentes ações como conscientização dos elevados custos, alteração de políticas, diretrizes, normas e práticas de gerenciamento para aumentar os ganhos decorrentes da redução da deterioração, melhorias da educação e treinamento dos profissionais, e desenvolvimento e implementação de novas tecnologias. Em síntese, deve-se dar relevância ao estudo da corrosão como fator fundamental para excelência das organizações em todos os aspectos, como a minimização de riscos à vida, redução dos danos ao meio ambiente e ao patrimônio, e também em uma abordagem financeira (JAMBO; FÓFANO, 2009).

As medidas preventivas que controlam umidade, eliminação de condensação ou gotejamento reduzem consideravelmente a taxa de desenvolvimento microbiano. Em sítios históricos e/ou arqueológicos localizados em regiões tropicais, onde a umidade e os níveis de precipitação são elevados, os revestimentos podem ser usados para reduzir a umidade excessiva nas superfícies. Em alguns métodos de conservação podem ser aplicados compostos hidrofóbicos, entre os mais comuns se encontram polímeros sintéticos e as resinas usadas em tintas, pinturas ou vernizes. Em alguns casos, os compostos podem criar nichos que favorecem a atuação de micro-organismos (BARRINUEVO, 2004).

As medidas de proteção para uma determinada superfície devem compreender a análise da diversidade microbiana do biofilme, o que pode ser feito por meio de biocupons, com quantificações microbiológicas e análises com técnicas eletroquímicas. Adicionalmente

diferentes medidas permitem ou garantem um tempo maior de vida aos materiais, como por exemplo, a limpeza sistemática, formas de sanitização, a eliminação de áreas de estagnação e frestas, emprego adequado de biocidas, a alteração de pH e uso de revestimentos (GENTIL, 2011).

Adicionalmente, visando a proteção de um patrimônio cultural, o fato de identificar os micro-organismos encontrados nos sítios, bem como conhecer a origem e causa das colonizações, contribuem de forma considerável sobre o entendimento da diversidade da comunidade microbiana. Isso auxilia na definição da prevenção de indesejáveis colonizações. Muitos estudos sobre as comunidades microbianas de diferentes lugares utilizam a identificação molecular usando 16S rDNA, 18S rDNA ou ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e fornecem uma vasta lista de micro-organismos que atuam na deterioração dos patrimônios históricos. Isso auxilia a explanação sobre as razões porque diferentes espécies têm sido encontradas em tais sítios e como pode desenvolver a prevenção ou mesmo o tratamento da superfície biodeteriorada (JURADO *et al.*, 2008).

Novas tecnologias foram desenvolvidas no intuito de contribuir para a prevenção de danos ao patrimônio cultural. Mais recentemente, destacam-se a aplicação de antibióticos e irradiação gama para inibir o crescimento microbiano. Essa última apresenta diversas vantagens, destacando-se o poder penetrante, configurando uma operação já aplicada em livros antigos, estátuas, pinturas, entre outros. Espera-se que a preservação do patrimônio cultural seja preventiva, dessa forma, antecipando as ações de deterioração de qualquer natureza. Quando não for possível exercer a conservação preventiva, a obra em questão deve ser restaurada, devolvendo da maneira mais próxima as características da obra original (GOMES, 2011).

3.6. FERRAMENTAS BIOTECNOLÓGICAS UTILIZADAS PARA ATUAIS PESQUISAS DE BIODETERIORAÇÃO DE PATRIMONIOS HISTÓRICOS

Para a elaboração de um documento é necessário considerar relatos históricos e a realização de ensaios preliminares. Como visto anteriormente, os impactos sobre os patrimônios históricos são determinados pelas influências atmosféricas e antropogênicas sobre o próprio material. A contaminação microbiana e suas atividades de deterioração contribuem significativamente para a aceleração do processo de intemperismo. Os danos aos patrimônios

históricos em muitos casos não são perceptivos, assim torna-se necessária uma avaliação crítica, que desenvolva medidas interdisciplinares adequadas visando sua conservação e restauração (WARSCHEID; BRAAMS, 2000).

Uma apropriada avaliação sobre a biodeterioração e os efeitos do intemperismo sobre danos ao material requer a combinação entre análises microbiológicas, composição do material e a caracterização de sua superfície. Tipicamente, a evolução da biodeterioração envolve a identificação dos principais micro-organismos presentes no biofilme formado sobre os materiais, a observação microscópica do biofilme e da superfície do material após a remoção do biofilme, a consistente interpretação final entre a correlação morfológica e as propriedades metabólicas dos organismos identificados, a composição do material, se possível, antes da ação dos micro-organismos e após a colonização (HERRERA; VIDELA, 2009).

A partir da década de 1980, um grande número de metodologias moleculares vem sendo desenvolvidas para análise da diversidade microbiana de amostras ambientais, tornando-as cada vez mais rotineiras (WU, 2016). Para Rosado *et. al* (2013) a utilização de técnicas moleculares se tornaram de extrema importância para o estudo da ecologia microbiana, uma vez que permitem adquirir informações sobre os micro-organismos cultiváveis e os não cultiváveis.

Em geral, as técnicas de biologia molecular, baseadas na análise da sequência de DNA, são usualmente utilizadas para a identificação filogenética de micro-organismos sem a necessidade de cultivo em meios sintéticos. Por isso, essas técnicas se destacam por serem mais sensíveis e rápidas quando comparadas aos métodos tradicionais da microbiologia. Em destaque, tem-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polimarase Chain Reaction*) que aliada a outras metodologias oferecem uma oportunidade de estudo metagenômico da diversidade de comunidades microbiana de amostras ambientais de diferentes origens (STERFLINGER *et al.*, 2013; STERFLINGER, 2010).

O primeiro passo para o sucesso das análises completas das comunidades microbianas cultiváveis e incultiváveis de certos ambientes é a escolha de um método de extração dos ácidos nucleicos, atualmente realizada por kits comerciais. A PCR é uma técnica que permite replicar *in vitro* uma sequência de DNA alvo por repetições de alongamento, utilizando principalmente marcadores específicos (*primers*) que flanqueiam a região do DNA que deve ser copiada, e uma enzima polimerase. O princípio desta técnica tem como base 3 processos principais que constituem um ciclo de amplificação: i) desnaturação da dupla fita de DNA sob elevada

temperatura (cerca de 95°C) com a finalidade de obter sequências de DNA de fita simples; ii) anelamento dos marcadores complementares à sequência a ser amplificada (a temperatura é mantida entre 40 e 65°C); e por último, iii) reação de alongamento ou extensão) do DNA por atividade da enzima polimerase, sendo usualmente utilizada a Taq polimerase, que é termoestável, com temperatura ótima de ação de 72°C. Os produtos de um ciclo (amplicons) são novamente desnaturados pelo calor iniciando um novo ciclo de amplificação. A replicação do DNA por PCR é semiconservativa, posto que a nova fita é sintetizada tendo como molde uma fita simples de DNA antiga. Na Figura 3.6 são ilustradas as etapas da PCR usualmente utilizadas para amostras ambientais.

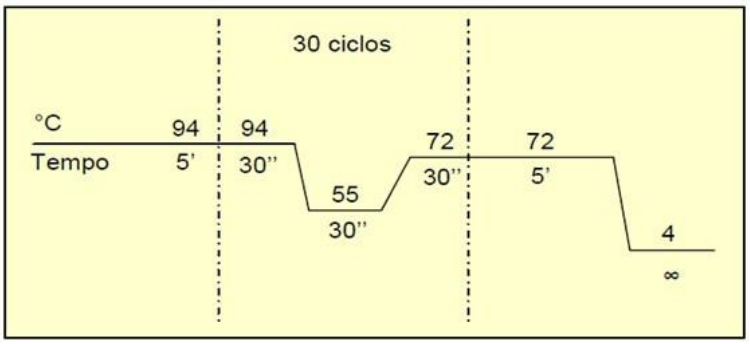


Figura 3.6. Ciclo usado na reação da PCR para amplificação de fragmento de DNA (MATOS, 2016).

No caso das técnicas de diversidade microbiana baseadas em análises de sequências de DNA, tem-se como interesse a porção ribossomal do cromossomo. Os RNAs ribossomais, que são codificados pela leitura do DNA, estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos e pequenas variações nas sequências dos nucleotídeos do gene são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA revelaram a separação dos domínios *Bacteria, Archaea e EuKaria* (ATLAS; BARTHA,1998; HUGENHOLZ,1998).

Essas sequências podem ser usadas com marcadores para aferir a identificação dos micro-organismos (sequências de DNAs alvo) considerando que diferentes espécies microbianas terão diferentes sequências de gene ribossomal. Com base em suas sequências ribossomais, os micro-organismos podem ser classificados e identificados. Muitas das cópias dessas sequências de DNA podem ser produzidas pela amplificação *In Vitro* de nanogramas de DNA extraído e purificado de muitas amostras de biofilmes usando técnica de PCR para amplificação do DNA (regiões gênicas conservadas 16S rRNA, 18S rRNA ou ITS).

Os DNAs das comunidades microbianas (DNA total) são uma mistura de DNAs de diferentes espécies microbianas presentes em diferentes proporções. Técnicas de amplificação (PCR) são vantajosas para análises em patrimônios culturais, pois tem acesso a quantidades limitadas de material. Depois da amplificação é apresentada uma mistura de milhões de cópias de sequências ribossomais de todos os micro-organismos originalmente obtidos da comunidade microbiana. Os produtos amplificados são isolados para a determinação do correspondente micro-organismo. (PEPE et al., 2010; STERFLINGER, 2010; HERRERA; VIDELA, 2009).

A partir das técnicas moleculares, foi possível estimar que apenas 1 a 10% dos micro-organismos existentes no planeta podem ser isolados por métodos convencionais de cultivo (MAIER; PEPPER; GERBA, 2000). Logo, a identificação apenas dos micro-organismos cultiváveis pode não reproduzir a real diversidade microbiana de uma determinada amostra. Estes autores ainda citam que os avanços nas técnicas de biologia molecular somados aos grandes avanços da bioinformática, produziram uma revolução na área da Microbiologia Ambiental.

Atualmente, o isolamento e a identificação dos micro-organismos, especialmente de fungos, ainda utiliza tradicionais métodos de meios de cultivos para estimar quantitativamente e qualitativamente as contaminações em construções históricas. Por exemplo, Sterflinger *et al.* (2013) realizaram pesquisas sobre biodeterioração em museus colonizados por fungos, principalmente baseadas em meios de cultivos clássicos. Para esse grupo é aceitável a metodologia pois recobre mais que 70 %. Entretanto, mesmo com alto índice, o uso de modernas técnicas moleculares para a detecção de fungos oferece uma visão mais profunda e o entendimento das estruturas da comunidade fungíca e suas consequências para o material. Assim novas tecnologias moleculares vem se desenvolvendo para estudo de interação de micro-organismos e materiais, em especial o comportamento e a composição das comunidades microbianas (STERFLINGER, 2010).

Em estudos de comunidades bacterianas, eucariotas e archaeas, na área da microbiologia ambiental, tem-se utilizado muito das ferramentas biomoleculares, como por exemplo as técnicas de T-RFLP (Polimorfismo de comprimento de restrição terminal), Pirosequenciamento 454, MiSeq Ilumina e HiSeq Ilumina. A tecnologia MiSeq Illumina vem se tornando a mais popular metodologia molecular para avaliar a comunidades microbianas, que pode realizar

leitura de inúmeras sequências para genes 16S rRNA (18S rRNA ou ITS), com investigação das espécies presentes dentro das comunidades, entretanto em monumentos históricos o uso das técnicas ainda é pouco usual (XIE *et al*., 2016; MA *et al*., 2015; CUTLER *et al.* 2013).

Além de empregar técnicas para preservar construções contra a colonização de micro-organismos que causam a biodeterioração é necessário ter um melhor entendimento dos seus mecanismos e seus efeitos nas superfícies. Os testes de biodeterioração em construções investigando o intemperismo existem, porém são de longa duração, e são normalmente produzidos com micro-organismos isolados. Enquanto uns focam sobre a evolução da qualidade estética das paredes, outros estudam apenas a biosusceptibilidade. O desafio é encontrar estudos de ensaios em laboratório de forma acelerada e que contemplem condições mais similares as encontradas no local de estudo (WIKTOR *et al*., 2009).

As formas de deterioração podem ser estimuladas pela interação de biofilmes com as superfícies e variadas técnicas podem ser empregadas para ligar a deterioração pela atividade dos micro-organismos às superfícies. A contribuição de biofilmes para a deterioração dos materiais é usualmente acessada usando MEV (SEM-*Scanning Eletron Microscopy*), MEV ambiental (ESEM-*Environmental Scanning Eletron Microscopy*), Microscópio de Força Atômica (AFM-*Atome Force Microscopy*), Microscópio de Contraste (DIC-*Differential Interference Contrast Microscopy*) e Microscópio Confocal (CSLM-*Confocal Scanning Microscopy*). Os microscópios fornecem a imagem sobre a morfologia das colônias e células microbianas, a distribuição dos micro-organismos sobre as superfícies, presença de exopolímeros e a natureza de produtos de corrosão (cristalina ou amorfa). Também revelam o tipo de ataque pela modificação da superfície após a remoção do biofilme. Informações obtidas por essas técnicas de alto nível de resolução, ajudam certamente a um melhor entendimento sobre o conceito da reação bioquímica que acontece na superfície que dá origem para a direção eletroquímica do processo de corrosão (BEECH, 2004).

Os efeitos de micro-organismos sobre os patrimônios históricos acarretam em custos de limpeza e de danos estruturais. O melhoramento de biocidas vem sendo mais investigado em detrimento do desenvolvimento de novos tratamentos capazes de prevenir e inibir a biodeterioração. Com isso os biocidas, são frequentemente aplicados como tratamento de conservação, porém não promovem uma proteção a longo prazo e precisam ser aplicados repetidamente, o que pode acarretar em problemas ambientais e de saúde pública, o que induz a busca por novos conceitos científicos de tratamentos ecológicos (FONSECA *et al.*, 2010).

Como exemplo, as pátinas pretas, compostas por fungos, cianobactéria e microalgas, são um comum fenômeno de biodeterioração que afetam os patrimônios históricos, com produção de dano estético de descoloração e pigmentações escuras. Normalmente são associados aos processos de deterioração físicos e químicos por causa de seus mecanismos de penetração e a liberação de componentes ácidos e quelantes. Adicionalmente, podem ser influenciados por causas antropogênicas, como depósitos de partículas e gases. Esses micro-organismos se adaptam a extremas condições microclimáticas, incluindo altas temperaturas, dessecação, estresse osmótico e também passam a ter peculiar resistência a biocidas. Somado a isso, em ambientes ao ar livre, os biocidas comerciais aumentam o descoramento. Com isso produtos naturais representam enorme potencial como fonte de componentes inibitórios para atividade biológica, incluindo fitotóxicos, os quais podem ser utilizados diretamente como pesticidas ou produtos bases dos pesticidas (GAZZANO *et al*., 2013).

3.7. O ACOMPANHAMENTO DAS PESQUISAS DO PATRIMÔNIO CULTURAL

Dada à grande importância do legado histórico e cultural dos monumentos, diversos trabalhos têm sido produzidos, em diferentes partes do mundo sobre deterioração desses símbolos. Comparando o número de trabalhos publicados por pesquisadores estrangeiros e brasileiros, percebe-se a necessidade de um empenho maior da comunidade científica na questão de preservação do patrimônio cultural nacional. Atualmente, o continente europeu é o que apresenta maior participação em pesquisas que envolvem a conservação do patrimônio cultural. Em destaque estão países como Espanha, Itália, Portugal e Reino Unido, berços históricos e culturais, influenciadores especialmente da cultura ocidental.

Na Itália, trabalhos De' Gennaro *et al*. (2000) avaliaram a deterioração de construções de pedras da antiga cidade de Nápoles pela exposição atmosférica, que permitiu adotar uma estratégia de preservação do patrimônio cultural. Outro exemplo, é o estudo realizado por Bernardi *et al*. (2009), caracterizando pátinas em monumentos históricos de bronze UNSC83600 na cidade de Bologna por ação da chuva ácida, que ainda encontraram poros em decorrência da atuação de micro-organismos e consequente biodeterioração. Pepe *et al.* (2010) isolaram e identificaram micro-organismos heterotróficos nas paredes de uma igreja medieval em Campania, sul da Itália. As pinturas apresentaram diferentes níveis de contaminação, sendo

bactérias e fungos os mais comuns, apresentando descoramento e destacamento como o dano mais comum, causado principalmente por fungos e bactérias.

Na Espanha, González *et al.* (2004) estudaram a deterioração do ferro em obras artísticas do século XVIII, determinando a composição, textura e estrutura do ferro utilizado na construção do palácio real de Madri. Os autores também avaliaram os danos gerados pelas transformações causadas pelo tempo. As propriedades do ferro permitiram avaliar os mecanismos de deterioração, prevendo-se que a origem foi eletroquímica, química e/ou microbiológica. Ainda nesse país, Sarró *et al.* (2006) avaliaram a biodeterioração em estátuas dos leões de Fontana, no Palácio de Alabama em Granada. Neste estudo, foram identificadas diferentes espécies de bactérias, algas, musgos e briófitas na edificação. Por último, Lopez-Arce e Garcia-Guinea (2004) determinaram o tipo de intemperismo sofrido por tijolos antigos de construções históricas em Toledo.

No Palácio de Pena em Portugal, construído no século XIX e com as paredes decoradas com azulejos de características peculiares do país, foi estudada por Coutinho *et al*. (2013) a formação de pátinas verdes e pretas causadas por micro-organismos. A identificação foi realizada por técnicas de biologia molecular, microscopia ótica, microscópio confocal e microscopia eletrônica de varredura, sendo possível afirmar que o biofilme era composto por microalgas, cianobactérias, bactérias e fungos.

Para Cutler *et al*. (2013) a investigação da comunidade verde, principal biofilme para deterioração de construções em Belfast, no Reino Unido, foi realizada a partir de técnicas de biologia molecular de Polimorfismo de comprimento de restrição terminal (TRFLP) e pirosequenciamento 454. Como resultado foram obtidos como principais agentes biodeteriorantes as microalgas que se apresentaram em grande quantidade e fungos em ampla diversidade.

Países da América Latina estão conduzindo estudos sobre a conservação de monumentos e edificações em sítios históricos. Trabalhos como o de Videla *et al*. (2000) relataram que diversos monumentos da civilização Maia, localizados na península de Yucatan no México, estavam sofrendo deterioração causada tanto pela ação natural como pela ação antropogênica. Neste estudo, foi observada a diversidade de micro-organismos organizados em biofilmes, implicando diretamente na integridade dos patrimônios culturais.

Herrera e Videla (2004) estudaram a deterioração de monumentos antigos em países da América Latina, como as igrejas de Vera Cruz e de Santo Inácio na Colômbia, a Casa das Tartarugas, o Palácio do Governador e a Pirâmide dos Mágicos no México, e o Castelo de Tulum e a Catedral de La Plata na Argentina. Os autores observaram que a deterioração das igrejas na Colômbia foi causada pela presença localizada de micro-organismos e fatores ligados a poluição atmosférica e não por conta da fragilidade da estrutura, como inicialmente imaginado. De um modo geral, o estudo permitiu estabelecer a existência de sinergismo entre a atuação biológica e os efeitos atmosféricos sobre a deterioração, e que os patrimônios culturais localizados nas regiões litorâneas e zonas urbanas/industriais, tiveram efeitos deteriorantes mais intensos comparados as zonas rurais.

No caso do Brasil, a preservação e proteção histórica e cultural do patrimônio brasileiro vem sendo estudada de forma lenta, conduzida pela academia, concentrada nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e mais recentemente Rio de Janeiro. Em São Paulo, estudos conduzidos por Campos (2010) determinaram as melhores técnicas de conservação e restauração pela aplicação de pátinas artificiais, de modo a simular pátinas naturais. Além disso, o autor avaliou a possibilidade de utilizá-las na recolocação das partes removidas e/ou perdidas de peças metálicas de bronze. Hernández *et al.* (2010) estudaram o mecanismo da formação de produtos corrosivos, e sua caracterização, sobre amostras de cobre expostas a deposições ácidas sintéticas, similares as observadas nas cidades do Rio de Janeiro e de São Paulo, a fim de buscar soluções para a recuperação do metal. Shirakawa *et al.* (2011) estudaram diferentes formulações de tintas acrílicas expostas ao intemperismo por sete anos em São Paulo e Ubatuba, avaliando a descoloração e o destacamento das pinturas e foram identificados inúmeros micro-organismos fototróficos.

No Rio de Janeiro, Lutterbach *et al*. (2013) desenvolveram um estudo de identificação e controle da ação de micro-organismos em diversas áreas da carruagem usada pelo imperador em sua coroação, no salão e no ar onde fica exposta. Das amostras coletadas foram isolados trinta e sete fungos filamentosos, seis leveduras e quatro bactérias, identificados por biologia molecular e, no caso dos fungos, também por taxonomia clássica.

No Rio Grande do Sul, Gaylarde e Gaylarde (2005) pesquisaram sobre micro-organismos de biofilmes em superfícies de monumentos históricos incluindo fungos, bactérias e microalgas,

e a causa da descoloração e consequente biodeterioração. Várias biomassas foram avaliadas em duzentos e trinta biofilmes de sete construções latino-americanas e seis europeias. Para os monumentos históricos latino-americanos as cianobactérias foram as mais encontradas seguidas dos fungos e por fim as microalgas. Em contrapartida, para os patrimônios europeus foram mais abundante microalgas seguido de cianobactérias.

Em alguns casos também foi possível observar uma interação entre os grupos de pesquisa do Rio Grande do Sul e São Paulo, como no trabalho que reporta a descrição da sequência da colonização dos fungos e a influência da incorporação de biocidas em pintura. Dentre os resultados discutidos pode ser observado que a população fungíca foi menor em tintas sem biocidas quando comparadas com tintas com biocidas, demonstrando uma redução da quantificação de micro-organismos (SHIRAKAWA *et al*., 2002).

3.7.1. A semelhança entre a igreja de são roque e o museu de arte contemporânea

A concepção contemporânea de patrimônios culturais, não está mais limitada as grandes obras de arte, como no passado, hoje é mais ampla, abrangendo qualquer obra com contexto histórico e cultural (KULH, 2006). Neste cenário, a expressão monumentos históricos se refere a obras de valor histórico pela significância na memória coletiva.

O historiador de arte vienense Alois Riegl foi um dos primeiros a valorar os patrimônios históricos, dando a ênfase a sua preservação. Em 1903, foi por ele publicada a obra “O culto moderno dos monumentos”, um tratado sobre a reorganização da legislação de conservação dos monumentos austríacos, contendo princípios teóricos e práticos para a preservação histórica (CUNHA, 2006).

Do ponto de vista atual, a preservação de monumentos apresenta uma abordagem multidisciplinar, e deve se fundamentar em diversas análises antes de serem definidas as medidas a serem adotadas para evitar intervenções desastrosas. Como exemplo, a igreja da San Roque (Figura 3.7), que foi totalmente reformada sem considerar a presença de micro-organismos, sem utilização de biocidas para eliminar micro-organismos presentes na superfície (JURADO *et al.,* 2014). Quatro anos depois da restauração, é visível a deterioração da construção devida a intensa colonização microbiana das paredes, similar à que havia sido registrada antes.

Figura 3.7. Igreja de São Roque, antes da reforma (A), logo após a reforma (B) e 4 anos mais tarde (C). Créditos de imagens: Jurado *et al*. (2014).

Segundo Gauri *et al.* (1992), em geral, as edificações são os lugares preferenciais para a visitação dos turistas para conhecimento do legado cultural de um país. Contudo, valiosas construções históricas perdem suas características por fatores diversos, em particular, fatores físicos, químicos (vento, radiação solar, mudanças de temperatura, umidade, chuva ácida, poluentes do ar, entre outros) e fatores microbiológicos. Como se evidencia no restauro da Igreja de São Roque (Figura 3.7), estes fatores, principalmente os de origem microbiológica não foram considerados, o que tornou o tratamento inútil em pouco tempo. Isto denota a importância de caracterizar em detalhe a área ao redor da construção bem como o seu real estado para a adoção de um tratamento de preservação adequado caso a caso.

O presente estudo contribui no tema, com análises microbiológicas de dois monumentos, que permitiu elaborar um protocolo para quantificação das populações microbianas normalmente presentes em construções ao ar livre. Neste contexto, ainda foi possível contextualizar as populações microbianas cultiváveis e totais em função das condições climáticas das áreas de localização dos monumentos. Ainda será apresentado ensaios laboratoriais de forma acelerada, para avaliar a participação dos micro-organismos no processo de deterioração de argamassa e se o seu recobrimento com tinta propiciava o efeito protetor desejado, em condições de alta umidade ou névoa ácida. Os resultados que serão apresentados validarão a importância destes experimentos para traçar a conduta a ser tomada em campo.

Assim, espera-se que os dados obtidos possam dar subsídios para novos ensaios e, particularmente, para os próximos restauros do MN e MAC. Nota-se que, enquanto esta

investigação estava em andamento, o MAC sofreu uma reforma, em princípio sem considerar a atividade microbiana no local (Figura 3.8).

Figura 3.8. Museu de Arte Contemporânea antes da reforma (A e B), teto (C) (ou parte inferior da rampa de cima) e janela (D) reformados, parte do teto apresentando indícios de corrosão e pigmentação amarelada (E). Créditos de imagens: Acervo pessoal

Passado pouco tempo, é possível constatar indícios de deterioração nos mesmos pontos de amostragem deste estudo, incluindo coloração amarelada similar ao encontrado anteriormente e falhas no revestimento, ou seja, observa-se focos de deterioração associados ao desenvolvimentos de micro-organismos.

Considerando o grande legado histórico cultural do Brasil, somado ao cenário turístico, observa-se a necessidade do país em criar uma maior política de investimentos, para a preservação dos patrimônios históricos culturais. Comparando as referências não somente a área de preservação, mas também a área de restauração, o Brasil se apresenta pouco participativo, necessitando mais da participação acadêmica, bem como da sociedade em geral. Por isso iniciativas de investimentos a essa área se tornam cada vez mais necessárias e indispensáveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi estruturado de modo a contemplar o monitoramento microbiológico de áreas externas de dois museus do Estado do Rio de Janeiro e também avaliar a ação deterioradora do consórcio microbiano de um dos sítios sobre corpos de prova confeccionados com argamassa em ensaios laboratoriais. Para atender os dois principais escopos, o trabalho foi desenvolvido seguindo as etapas esquematizadas na figura 4.1.

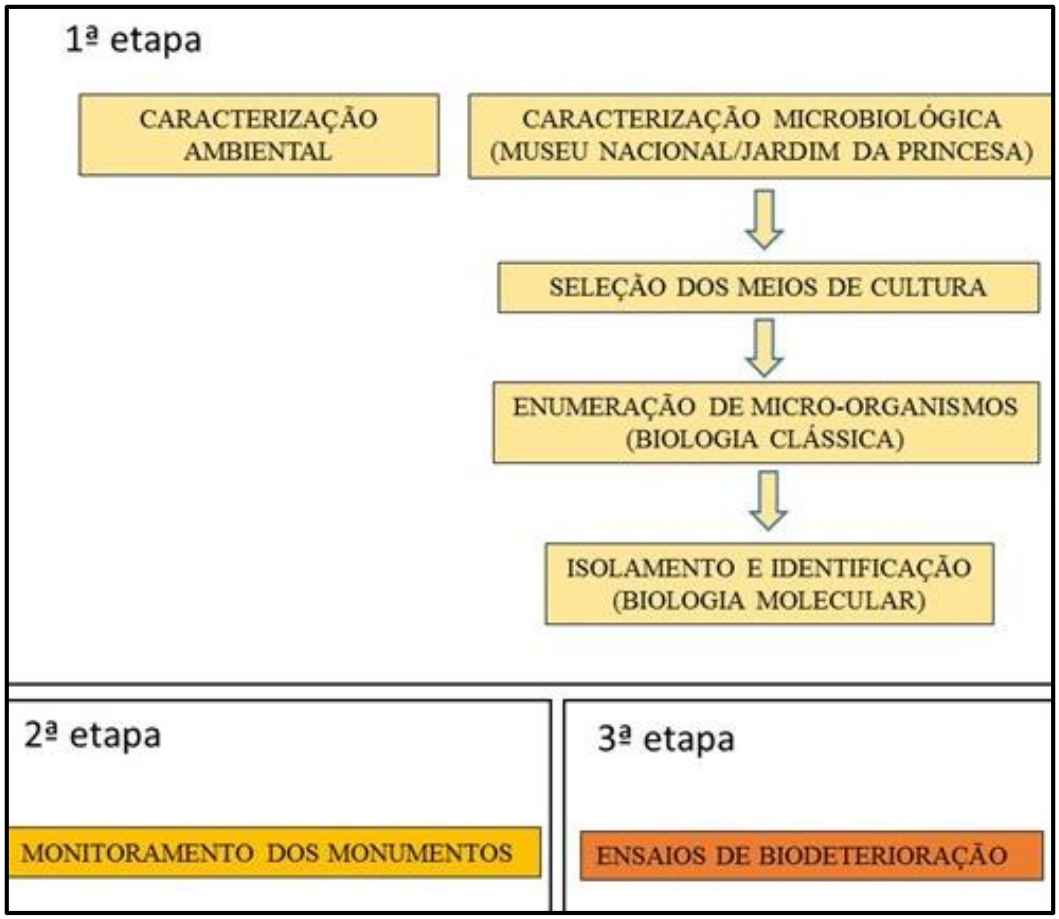


Figura 4.1. Detalhamento esquemático do escopo da 1ª etapa, na qual foi dado o suporte para desenvolver as seguintes etapas (2ª e 3ª) do trabalho.

4.1. PATRIMÔNIOS HISTÓRICOS

O presente estudo contemplou dois museus do estado do Rio de Janeiro em função da sua localização e diferentes influências do ambiente em seu entorno: O Museu Nacional do Rio de Janeiro e o Museu de Arte Contemporânea.

- **Museu Nacional do Rio de Janeiro (MN)**

No MN foram feitas coletas de duas paredes do Jardim da Princesa (Figura 4.2). Essas paredes continham argamassas revestidas com tinta, em estado avançado de deterioração, uma vez que a última restauração foi realizada há mais de 30 anos.

Figura 4.2. Paredes do Jardim da Princesa do Museu Nacional do Rio de Janeiro, indicando os dois pontos onde foram realizadas as coletas (A). Os locais de coleta foram amplificados, ponto 1 (B) e ponto 2 (C) para melhor visualização de seu estado de deterioração. Crédito da figura: Acervo pessoal

O MN está situado em zona urbana, com um intenso tráfego de veículos, embora o local seja bem arborizado, caracterizando uma zona comumente muito úmida (60-70%). As paredes estão expostas à incidência de luz solar e intempéries. Quando chove, além da incidência direta da água pluvial, ocorre o escoamento da água da parte superior, na qual há circulação de pessoas, onde ocorre o acumulo de detritos (folhagens, poeira, entre outros). Segundo a pesquisadora do Museu Nacional, este local não recebe a devida manutenção periódica devido à pouca disponibilidade de recursos financeiros.

- **Museu de Arte Contemporânea (MAC)**

A estrutura do MAC, além das intempéries e da incidência prolongada à luz solar, sofre danos uma vez que o museu está localizado em área aberta na encosta do mar. Logo, está

exposta à maresia, isto é, à névoa fina, úmida e salgada, resultado da ação do vento sobre a crista das vagas e da rebentação das ondas.

As amostragens foram feitas em dois pontos distintos, próximos entre si, de modo a avaliar a colonização microbiana na parede, o teto da entrada principal, concreto armado, nivelado com argamassa e revestido de tinta e a estrutura metálica de uma das janelas externas do monumento (Figura 4.3). Segundo relatos do técnico do MAC, são constantes os problemas de deterioração do material metálico, que resulta em altos custos de manutenção e torna importante uma estratégia de prevenção à corrosão.

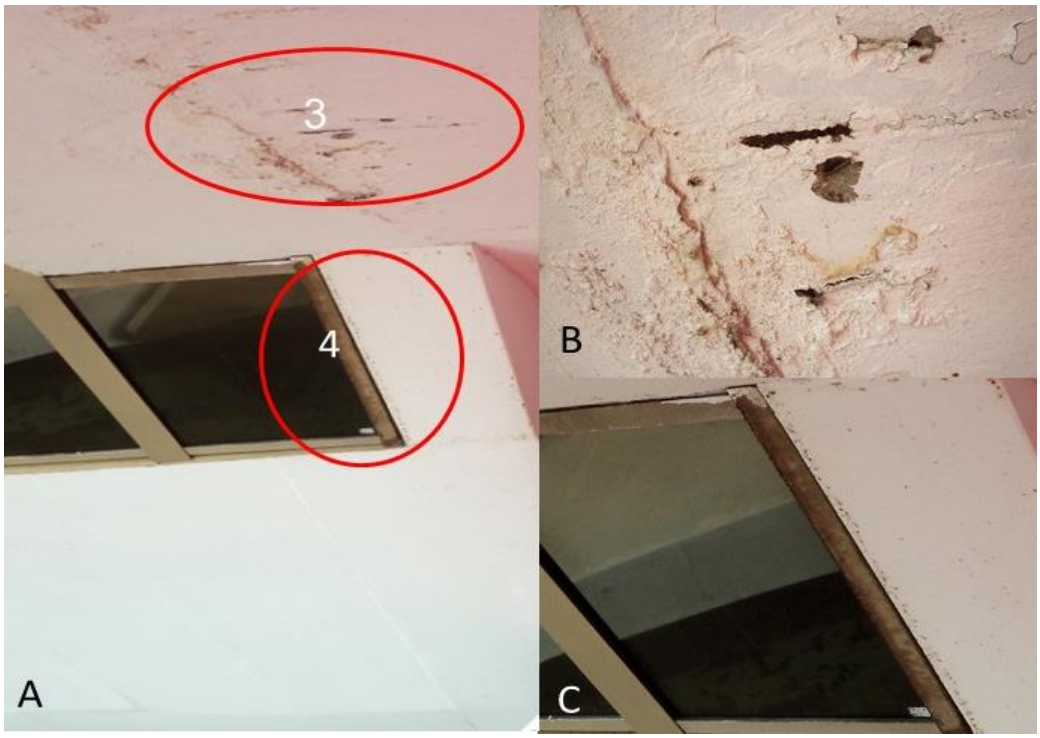


Figura 4.3. Entrada do Museu de Arte Contemporânea, indicando os dois pontos onde foram realiza realizadas as coletas (A). Os locais das coletas foram amplificados, ponto 3 (B) e ponto 4 (C) para melhor visualização de seu estado de deterioração. Créditos da figura: Acervo pessoal.

4.1.1. Coleta de materiais

As coletas dos materiais foram realizadas assepticamente *in loco*, com auxílio de fogareiro portátil (Nautika, Jupiter). E, com vistas a permitir expressar os resultados das análises microbiológicas por área, foi confeccionado um molde de plástico, com abertura interna 2 cm x 2 cm, com área total de 4 cm^2 (Figura 4.4), que antes de cada uso foi aspergido com álcool 70ºINPM.

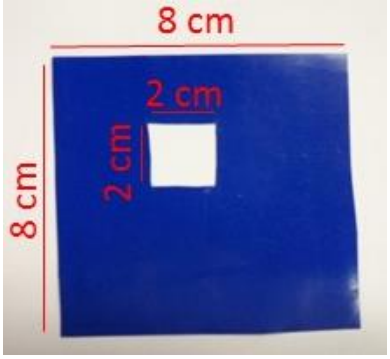


Figura 4.4. Molde plástico flexível com abertura interna de 4 cm^2. Crédito de figura: Acervo pessoal

Foram utilizados bisturis de plástico estéril (Medbisturi, modelo 23) para as raspagens das paredes do MN. E, de modo a garantir a representatividade das amostragens, para cada coleta foram obtidas 5 amostras simples (subamostras) para formar uma única amostra composta. As coletadas foram realizadas ao acaso, totalizando 20 cm^2. Teve-se o cuidado de que as amostragens abrangessem área de 1 m^2 para cada parede (para a estrutura metálica do MAC a área foi um pouco mais restrita cerca de 0,1 m^2). Os materiais obtidos em cada uma das cinco amostragens foram adicionados em um mesmo frasco de penicilina contendo 50 mL de solução redutora, cuja composição se encontra no Anexo A. Em seguida, os frascos, devidamente identificados e acondicionados em caixa de isopor, contendo gelo reciclável, foram transportados para o laboratório para execução das análises. O tempo entre as coletas e as análises foi de no máximo 2 h.

4.1.2. Monitoramento meteorológico

O levantamento dos dados diários de temperatura mínima e máxima, umidade relativa do ar e índice pluviométrico foram obtidos de registros eletrônicos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), órgão governamental de informação do tempo e do clima no território brasileiro, de uma única estação - 22º 89’ de latitude sul e a 43º 18’ de longitude oeste - por ser a mais próxima tanto do MN quanto do MAC.

4.1.3. Determinação do teor de umidade

Com o propósito de determinar a umidade dos materiais do MN (expressar os resultados das análises por massa seca) também foram realizadas coletas para a obtenção de amostra composta seguindo o mesmo protocolo anteriormente descrito (item 4.1.1).

Neste caso, o teor de umidade das 5 subamostras de cada parede do MN foram acondicionadas em placa de Petri, que foi identificada e lacrada com filme plástico. No laboratório, aproximadamente 1 g da amostra apropriadamente homogeneizada foi transferida para cadinhos previamente tarados, no total de três, e levados à estufa (Fabbe modelo119) a 105°C, até massa constante. Antes da determinação da massa (cadinho e material) os cadinhos foram alocados em dessecador com sílica gel ativa para resfriamento, e só então pesados (balança TDS FA2104N). O teor de umidade foi determinado dividindo a perda de massa (massa úmida – massa seca), pela massa inicial da amostra e, multiplicando por cem. As pesagens foram feitas ao décimo de miligrama, sendo os resultados expressos em valores médios.

4.2. DETALHAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1. Ensaios preliminares: avaliação da diversidade microbiana de patrimônio

Nesta etapa foram realizados ensaios microbiológicos com material oriundo das paredes do Jardim da Princesa (figura 4.2), com o propósito de definir os meios de cultura e técnicas de cultivo para dar suporte à continuidade do estudo, em face das diversificadas informação na literatura disponível. Paralelamente, foi realizado o levantamento dos dados diários de temperatura mínima e máxima, umidade relativa do ar e índice pluviométrico em período total de 30 dias, compreendendo 15 dias antes e 15 dias após a data da coleta, conforme detalhado no item 4.3. A partir dos cultivos para enumeração das bactérias heterotróficas aeróbias e dos fungos filamentosos foram realizados os isolamentos das culturas predominantes, que posteriormente foram identificadas pelo emprego de técnicas moleculares.

4.2.2. Caracterização microbiológica clássica

De acordo com a literatura especializada, as diferentes populações microbianas cultiváveis normalmente encontradas colonizando superfícies expostas ao ar livre, são as bactérias heterotróficas, bactérias produtoras de ácido, ferrobactérias, bactérias redutoras de sulfato (BRS), fungos e micro-organismos fotossintetizantes (cianobactérias e microalgas), com o intuito de enumerar essas populações foram empregados métodos clássicos de cultivo microbiano (SUIHKO *et al.*, 2007; SARRÓ *et al.*, 2006; NUHOGLU *et al.*, 2006; VIDELA *et al.*, 2000).

Alguns meios de cultura normalmente utilizados em publicações científicas de biodeterioração de monumentos históricos foram empregados (VIVAR *et al.*, 2013; GAYLARDE *et al*., 2008; GAYLARDE *et al.*, 2006). Concomitantemente, foi investigado o emprego de agentes antibacterianos: 0,05 g/L Amoxicilina (Medley) ou 0,1 g/L de Cloranfenicol (Sigma), e fungicidas: 0,05 g/L Nistatina (Legrand). A Tabela 4.1 apresenta os meios de cultura empregados para cada população microbiana, cujas composições estão descritas no Anexo A.

Os cultivos foram incubados em estufa (Nova Ética, 411D) a 28±1°C e em tempos distintos, de acordo com a velocidade de crescimento de cada população (Tabela 4.1). No caso dos micro-organismos fotossintetizantes, a incubação foi conduzida ainda sob luz fluorescente branca fria (2 lâmpadas - Famastil 60 W) à distância de 20 cm.

Foram testadas duas técnicas de quantificação - Número Mais Provável e plaqueamento Spread Plate - seguindo as recomendações da literatura especializada (APHA, AWWA e WEF, 2012). Primeiramente, alíquotas de 1 mL de cada solução de coleta (item 4.2.1), devidamente homogeneizada foi diluída em série na proporção de 1:10 de 10-1 a 10-8, em solução fisiológica (8,5 g/L de NaCl) para quantificação dos micro-organismos aeróbios, ou em solução redutora (micro-organismos anaeróbios).

Para a técnica de plaqueamento, uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição em solução fisiológica foi disposta sobre o meio sólido em placas de Petri, e a seguir dispersa homogeneamente com auxílio de micropérolas de vidro de 3 a 4 µm de diâmetro (previamente lavadas com álcool, para remoção de resíduos presentes e, a seguir autoclavadas a 121°C por 30 minutos). No caso da técnica NMP, alíquotas de 1 mL de cada diluição em solução redutora (ou fisiológica) foram semeadas em 9 mL de meio apropriado contidos em frascos do tipo penicilina, em triplicata. As contagens das populações microbianas foram expressas em Número Mais Provável (NMP/cm^2) ou em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/cm^2) de acordo com a técnica adotada, correlacionando o volume inicial de solução diluente contida no frasco e a área de amostragem (20 cm^2 a cada 50 mL de solução).

Tabela 4.1. Meios de cultura utilizados para enumeração, metodologia, tempo de cultivo e agente antimicrobiano testados para grupos específicos de micro-organismos

Populações Microbianas		Meios de cultura	Agente antimicrobiano	Técnica de Contagem	Incubação (dias)
Bactérias					
Heterotróficas Cultiváveis Totais	Aeróbias	Agar Nutriente	Nistatina	*Spread plate*	2
	Anaeróbias	Meio fluido ao tioglicolato	-	NMP	14
Produtoras de ácido	Aeróbias	Agar Vermelho de Fenol glicosado	Nistatina	*Spread plate*	2
	Anaeróbias	Caldo Vermelho de Fenol glicosado	-	NMP	
Ferrobactérias		Agar Citrato férrico Amoniacal	Nistatina	*Spread plate*	7
Bactérias Redutoras de Sulfato		Postgate E modificado	-	NMP	14
Actinobactérias		Agar Jausen; Agar 72C; Agar Amido-Caseína	Nistatina e Amoxicilina		14
Fungos filamentosos		Agar Sabouraud, CYA, Agar extrato de malte, Agar Czapeck, Agar Batata-Dextrose	Amoxicilina	*Spread plate*	5
Fotossintetizantes		Agar e caldo Knop's-MKM modificado; Agar e caldo Difico	Cloranfenicol Nistatina	*Spread plate* NMP	21

4.2.3. Isolamento das espécies bacterianas e fungícas cultiváveis

As colônias predominantes nos plaqueamentos realizados para as contagens de bactérias heterotróficas totais e bactérias produtoras de ácido, e fúngicas foram isoladas e novamente semeadas nos respectivos meios de cultura pela técnica de esgotamento para obtenção de culturas puras, conforme Vasconcelos (2011).

Cada colônia isolada foi analisada quanto à pureza, por observações ao microscópio. As bactérias foram coradas pela técnica de Gram e, uma vez confirmada a pureza, mantidos em tubos contendo meio Agar Nutriente inclinado, sob refrigeração a 5ºC. Para os fungos, a morfologia microscópica do crescimento foi feita pela técnica de microcultivos em lâmina, com Agar Sabouraud ou com Agar extrato de malte, e por preparações a fresco com azul de algodão. As culturas fúngicas foram estocadas no respectivo meio a 5°C.

4.2.4. Identificação das bactérias e fungos predominantes

As culturas bacterianas e fúngicas isoladas (item 4.2.3) foram identificadas no Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação (LABIO), do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), por técnicas de Biologia Molecular.

a) Extração do DNA

As bactérias isoladas tiveram seu DNA extraído por lise térmica. Para este procedimento uma colônia isolada, comprovadamente pura, foi repicada e suspensa em 50 µL de água ultrapura (MilliQTM) contidos em tubo Eppendorf (capacidade 500 µL). A suspensão microbiana foi submetida a choque térmico utilizando "banho seco", de acordo com o programa: 96ºC por 10 minutos, seguido de 4ºC por 30 minutos. Logo após, o material foi submetido a centrifugação por 1 minuto a 10000x g e o sobrenadante transferido para novo tubo, estocado a -20ºC, até o momento do uso para quantificação e amplificação do material.

Para a extração do DNA dos fungos isolados, foi empregado o kit comercial *PowerSoil®* DNA *Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, Inc.), de acordo com as orientações do fabricante. Entretanto, antes do uso do *kit*, as células foram submetidas a lise térmica. Para tanto, cada colônia isolada foi retirada do tubo de ensaio por raspagem com auxílio de alça de platina e transferida para tubo Falcon com capacidade de 15 mL. Em seguida, foi conduzido o choque

térmico: 10 minutos em nitrogênio líquido, e posteriormente 10 minutos em banho-maria a 60ºC.

b) Sequenciamento das regiões 16s RNA de bactérias e ITS de fungos para identificação molecular

A amplificação dos segmentos gênicos foi realizada pela técnica PCR em termociclador PCR System 9700, *Applied Biosystems*, empregando Taq PCR Master Mix KitTM (Qiagen) acrescido de 0,2 µM de iniciadores específicos, 5 µL de solução de corantes CoralLoadTM (Qiagen) e água ultra pura estéril q.s.p 50 µL. Em seguida a PCR, os produtos amplificados foram visualizados e comparados ao marcador de peso molecular de 1 Kb por meio de eletroforese em gel de agarose (1%, m/v), a uma corrente elétrica de 90 V, em tampão TBE 1X e corado com solução GelRedTM 1X (Biotium), que ao final da corrida, foi fotografado em sistema de foto documentação digital com auxílio de iluminação UV.

Para identificação dos grupos bacterianos foram utilizados os iniciadores Sadir e S17 (Altschul *et al*., 1990), que promovem a amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA). As condições da PCR foram 94°C a 30 s, 55°C a 30 s, 72°C a 30 s, com 30 ciclos.

Para identificação de fungos foi usada metodologia semelhante, porém com procedimento envolvendo a amplificação do gene codificante do RNA ribossômico da subunidade 5.8S e das regiões Espaçadoras Internas Transcritas I e II (ITS I e II - do inglês *Internal Transcribed Spacers*), utilizando os iniciadores ITS5 e ITS4 (WHITE *et al*., 1990) de diferentes espécies. As condições de PCR foram 94°C e 30 s, 50°C e 30 s, 72°C e 30 s, com 30 ciclos.

Após a verificação da eficiência da PCR pelos procedimentos de eletroforese, os produtos amplificados obtidos foram submetidos a purificação utilizando o sistema Wizard® PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as orientações do fabricante. Os amplicons foram então quantificados em Nanodrop Espectrophotometer (modelo ND-1000) para que fossem utilizados como moldes na reação de sequenciamento. Para o sequenciamento os tubos continham um iniciador Sadir e S17, para bactérias; e ITS4 e ITS5, para fungos, com as condições de PCR de 96°C a 10 s, 55°C a 5 s, 60°C a 4 s, com 25 ciclos.

Após a marcação, as amostras foram purificadas por precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 mL de formamida

Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95ºC por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e injetados em sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems).

c) Análise das sequências obtidas

Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"; e Analysis Module 1 "BC- 3500SR_Seq_FASTA.saz.

As sequências finais foram obtidas após edição com auxílio dos softwares Chromas Lite® e Bioedit, e então submetidas ao GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) onde puderam ser comparadas por similaridade com as demais sequências já depositadas, utilizando o *software online* BLAST. Tal procedimento de análise forneceu a identificação do fragmento gênico como pertencente à determinada gênero ou espécie, considerando o percentual de similaridade acima de 98%.

4.3. MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DOS MUSEUS

Os monitoramentos do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea foi feito de março a outubro de 2014, com análises mensais. A figura 4.5 apresenta de forma esquemática como foi feito o monitoramento. O procedimento de coleta de amostras no MN foi previamente descrito (item 4.1.1). No caso do MAC, as coletas foram conduzidas com auxílio de *swab*, posto que as amostragens foram realizadas na área de entrada do museu, e seria impróprio causar qualquer dano adicional ao patrimônio.

Foram feitas quantificações das populações de Bactérias heterotróficas totais, produtoras de ácido, ferrobactérias, BRS, fungos e micro-organismos fotossintetizantes, empregando as técnicas clássicas de cultivo, de acordo com protocolo elaborado na etapa preliminar (item 4.2.2). Paralelamente, foram realizadas coletas diárias de dados eletrônicos do INMET (item 4.1.2), no período total monitorado. Também foi feita a determinação do teor de umidade, conforme anteriormente detalhado (item 4.1.3).

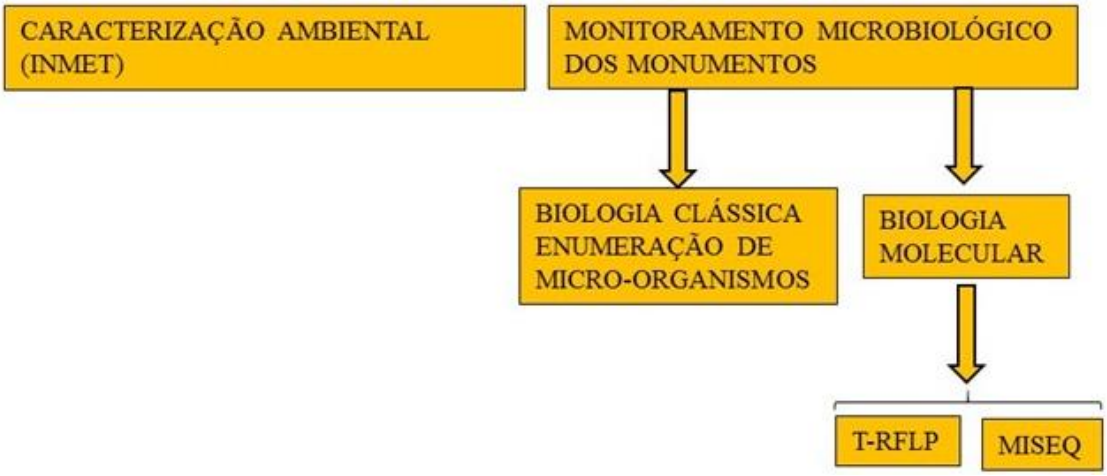


Figura 4.5. Detalhamento esquemático do monitoramento dos museus - 2ª etapa do trabalho.

A diversidade microbiana total dos materiais aderidos aos distintos sítios dos patrimônios foi avaliada por T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorfism*), que permite identificar variações na composição e estrutura da comunidade microbiana, e por sequenciamento em larga escala (MiSeq), com pretensões a determinar as inter-relações entre membros das comunidades, inclusive para micro-organismos não cultiváveis (SCHUTTE *et al*., 2008). Estas análises moleculares, cujas descrições seguem adiante, foram realizadas durante estadia na *Université de Pau et des Pays L'Adou*r, França.

4.3.1. Determinação da diversidade total

4.3.1.1.T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A Figura 4.6 descreve as vias para a determinação da diversidade microbiana. DAs amostras coletadas da parede do Museu Nacional e do Museu de Arte Contemporânea (4.1.1), foram retirados 10 mL e em seguida conduzido a filtração em filtro microporo (0,22 µm) com auxílio de bomba a vácuo, em seguida, encaminha para a fase de extração do DNA. Após a extração do DNA, foi realizada a dosagem (*Trinean*) para aferir a quantidade de DNA.

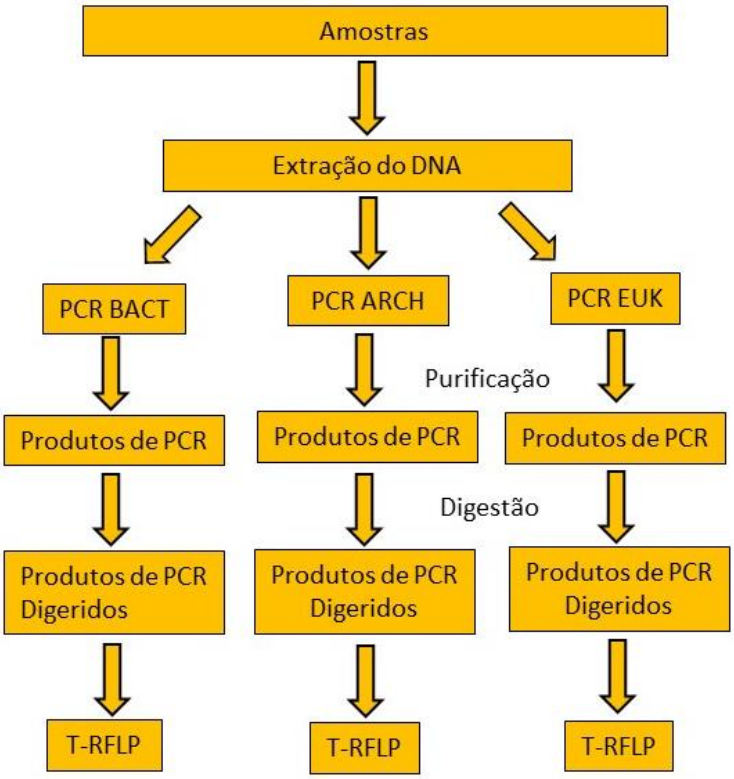


Figura 4.6. Diagrama do processo biomolecular para desenvolver a técnica de T-RFLP. Legenda: PCR (*Polymerase Chain Reaction*); Bact (bacteria); Arch (Archaea); Euk (Eucarioto); T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Em seguida o DNA foi submetido a técnica de PCR, para amplificação do DNA presente nas extrações, sendo cada amostra submetida no mínimo 3 PCRs diferentes, com o objetivo de amplificar genes de Bactéria, Eucarioto e Archaea. Posteriormente realizou-se a eletroforese, para aferir a amplificação. Após esse procedimento as amostras foram conduzidas a purificação e a eletroforese, para aferir a qualidade dos produtos amplificados, em seguida ocorreu a digestão por enzimas específicas com marcadores de terminais. E por fim, o material foi conduzido ao equipamento *ABI PRISM@3100 Genetic Analyser* para a leitura de T-RFLP. A seguir são apresentados os procedimentos adotados em cada passo:

1) Extração de DNA:

Após a filtração o material ficou retido na membrana de microporo foi levado a uma placa de Petri e cortado em inúmeras partes, para realizar a extração de acordo com o protocolo P*owersoill DNA isolation kit*.

2) PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Para a PCR ser realizada foi necessário fazer um mistura de água, *Amplitaq Gold®360 master mix* e dois marcadores. Nesse mix a água varia em função da quantidade de DNA a ser adicionado. No presente trabalho utilizou-se 1 e 5 µl de DNA, com volume final de 25 µl no tubo reacional, sendo 12,5 µl de *Amplitaq,* 0,5 µl para cada marcador. Os 11,5 µl restantes foram de água e 1 µl DNA (ou 7,5 µl de agua e 5 µl de DNA, para amostras com menor concentração de DNA). Após mistura em vortex (IKA vortex 2), os tubos foram conduzidos ao equipamento (*VERITI.96WELL, THERMAL CYCLER AB APPIED BIOSYSTEMS*) para a amplificação, que foi programada para cada grupo microbiano (Bactéria, Eucarioto e Archaea). Foram realizados inúmeros testes para detectar os melhores marcadores para cada extração. Por fim, as condições de PCR e marcadores adotados para esta etapa seguem na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Condições de PCR e marcadores adotados para cada grupo microbiano para aplicação final com a técnica de T-RFLP

	Marcadores	**Condições de PCR**
Bactéria,	63FAM e 1387R	95°C e 45 s, 58°C e 45 s, 72°C e 1 min, 35 Ciclos
Eucarioto	EUK1HEX e 516R	95°C e 30 s, 56°C e 45 s, 72°C e 1 min, 35 Ciclos
Archae	21F-FAM e 958R	95°C e 45 s, 56°C e 1 min, 72°C e 1 min, 35 Ciclos

3) Após as etapas de PCR e purificação foram realizadas as eletroforeses dos ácidos nucleicos (fragmentos de DNA).

Após a amplificação foi realizada a eletroforese para aferir a qualidade da PCR bem como prever contaminações de produtos e reagentes. A preparação do gel para eletroforese foi realizada de acordo com a Tabela 4.3. De acordo com o número de amostras foram realizados géis de tamanho pequeno (5 cm) e grande (10 cm) de comprimento, com altura e largura idênticas (0,5 cm e 5 cm).

Tabela 4.3. Composição do gel de eletroforese

Composição do gel de eletroforese		
Tamanho de Gel	Pequeno	Grande
Agarose	0.25g	0.50g
Tampão de TBE1x	25mL	50mL
BTE diluido	1 gota + 1 gota	2 gotas + 1 gota

Para o preparo do gel colocou-se 50 mL de Tampão de TBE1x e adicionou-se Agar, em seguida foi realizado o aquecimento até dissolver o agar. Em capela, e depois de leve resfriamento adicionou 3 gotas de BTE, após ser homogeneizado adicionou-se ao estojo do gel de eletroforese, e por fim esperou-se um período de 20 minutos para o resfriamento/endurecimento do gel. Para corrida eletroforética foi preparado o tampão de carregamento das amostras (1 µl de *Loading Buffer* (Sigma) + 8 µl de H_2O destilada) e adicionou-se 1 µl do material amplificado, isso para cada amostra (normalmente é produzido 1000 µl do tampão de uma vez, para que realizasse rapidamente inúmeras amostras para a eletroforese). Após endurecer o gel, colocou-se na cuba de eletroforese, na posição que migre do negativo pro positivo (as amostras foram colocadas no lado negativo dentro dos poços do gel), com tampão TBE 0.5x encobrir o gel, adicionou-se em sequência a mistura (material amplificado + tampão de carregamento). Adicionalmente foi colocado ao poço o *Smart Ladder* (Padrão) 2 µl. As condições de migração foram 100 V e 30 min. Após a migração o gel foi conduzido ao (*ImagerMaster®VDS-PharmaBiotech*) para a revelação.

Em seguida as amostras foram conduzidas a etapa de purificação, seguindo o protocolo Ilustra *GFX 96 PGR Purification Kit*, novamente foi realizada a eletroforese para aferir a qualidade dos resultados. Para realizar a T-RFLP foi necessária a etapa de digestão enzimática, na qual foram realizados testes com cinco enzimas de restrição que foram: *Alu1, Hinf, Rsa1, Hae III e Msp*, utilizadas como rotina pelo *group Melody (Université de Pau et des Pays de L'Adour*), dessas cinco enzimas, as duas que apresentaram melhores resultados nos testes para cada grupo microbiano (bactérias, eucariotos e Archaea) foram selecionadas. Para a digestão, normalmente utilizou-se entre 1,5-2,5 de DNA amplificado e purificado. Desta forma, foi realizada uma mistura de acordo com as especificações do fornecedor da enzima como apresentado na Tabela 4.4, com volume final apresentando 10 µL e digestão realizada em incubação em banho quente controlado à 37°C.

Tabela 4.4. Enzimas de restrição para a T-RFLP

	Alu1	**Hinf**	**Rsa1**	**Hae III**	**Msp**
Enzima (µL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,15
Tampão(µL)	1	1	1	1	1
DNA (µL)	1,5-2,5	1,5-2,5	1,5-2,5	1,5-2,5	1,5-2,5
Água (µL)	7,2-6,2	7,2-6,2	7,2-6,2	7,2-6,2	7,35-6,35

Em seguida foram preparadas as amostras para realizar a T-RFLP. Com isso utilizou-se uma mistura de ROX (agente utilizado para normalizar o sinal fluorescente) e formaldeído, na proporção de 0,25/8,75, após essa mistura, foram retirados 9 µL e adicionados a cada poço da placa em seguida adicionado 1 µL da respectiva amostra digerida, que foi centrifugada e levada ao *ABI PRISM@3100 Genetic Analyser* para a leitura da T-RFLP. O equipamento forneceu resultados que foram analisados no Microsoft Excel para selecionar os dados, em seguida submeter ao software *T-REX (T-RFLP analysis EXpedited*) e por sequência no software *PRIMER 6.*

4.3.1.2.Miseq Illumina Sequencing

Para utilizar a plataforma *MiSeq Illumina Sequencing* foi realizada a PCR selecionando 3 amostras de cada Museu. As PCRs foram realizadas em diversas condições, incluindo diferentes marcadores, para os grupos microbianos de Bactéria e Eucarioto, e são apresentados as melhores condições descritas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Condições de PCR e marcadores adotados para cada grupo microbiano para aplicação final com a tecnologia *MiSeq Illumina Sequencing*

	Marcadores	**Condições de PCR**
Bactéria	104F-ill e 530R-ill	95°C a 30 s, 68°C a 30 s, 72°C a 45 s, 30 Ciclos
Eucarioto	EUK1-ill e 516-ill	95°C a 45 s, 56°C a 45 s, 72°C a 1 min, 35 Ciclos

Após finalizações do procedimento, foi aferido por eletroforese a qualidade da amplificação, e os produtos amplificados são conduzidos para o congelamento e posteriormente embalado em caixa com resfriamento, e em seguida enviado para o *group NED (Toulouse Genomic core facility-Université de Toulouse),* para análises na plataforma *MiSeq Illumina Sequencing*.

Com a finalidade de comparar as comunidades de bactérias e de eucariotas (dados padrões de T-RFLP) de acordo com o tratamento e o tempo, duas dimensões (Nanométric Multidmensional sacaling ordination – NMDS), baseada sob distâncias de *Bray-Cusrtis* foi medida usando o *software Primer* 6 (*Primer E, Plymouth, UK*). As diferenças significativas entre os grupos foram analisadas usando testes de similaridade (ANOSIM) utilizando o *software primer* 6. O software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) foi usado

a análise de leitura de sequencias de genes de bactérias 16S rRNA e de genes eucariotos 18S rRNA (CAPORASO *et al.*, 2010).

4.4. ENSAIOS DE BIODETERIORAÇÃO DE CORPOS DE PROVA DE ARGAMASSA EM LABORATÓRIO DE FORMA ACELERADA

Ensaios em laboratório foram realizados para contemplar a formação de biofilmes sobre os corpos de prova confeccionados de argamassa, com composição similar à parede do MN, de modo acelerado. Este estudo teve como propósito avaliar a colonização microbiana das superfícies de paredes de argamassa, sem e com revestimento (tinta), expostos a duas condições ambientais distintas: deposição de água destilada ou ácida.

A Figura 4.7 apresenta a representação das etapas contempladas para a realização deste ensaio. Primeiramente, foi realizada a análise da composição elementar do material da parede do MN por espectroscopia de fluorescência de raios-X (FRX) de modo a confeccionar corpos de prova com características químicas similares (SANTOS *et al.*, 2013). Nos ensaios, foi empregado como inóculo para formação dos biofilmes sobre as superfícies sólidas, um consórcio microbiano composto das populações microbianas oriundas do MN. A tinta foi adquirida no comércio local, com o cuidado de escolher uma das líderes do mercado. A névoa ácida foi preparada segundo as características químicas da atmosfera do município do Rio de Janeiro.

Decorridos 100 dias, os materiais aderidos às superfícies dos corpos de prova foram analisados por técnicas de biologia clássica e de biologia molecular para enumeração das populações microbianas e caracterização da diversidade microbiana, respectivamente. Os corpos de prova foram analisados por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação do grau de deterioração dos materiais, e assim avaliar o emprego de tinta como revestimento de proteção à biodeterioração.

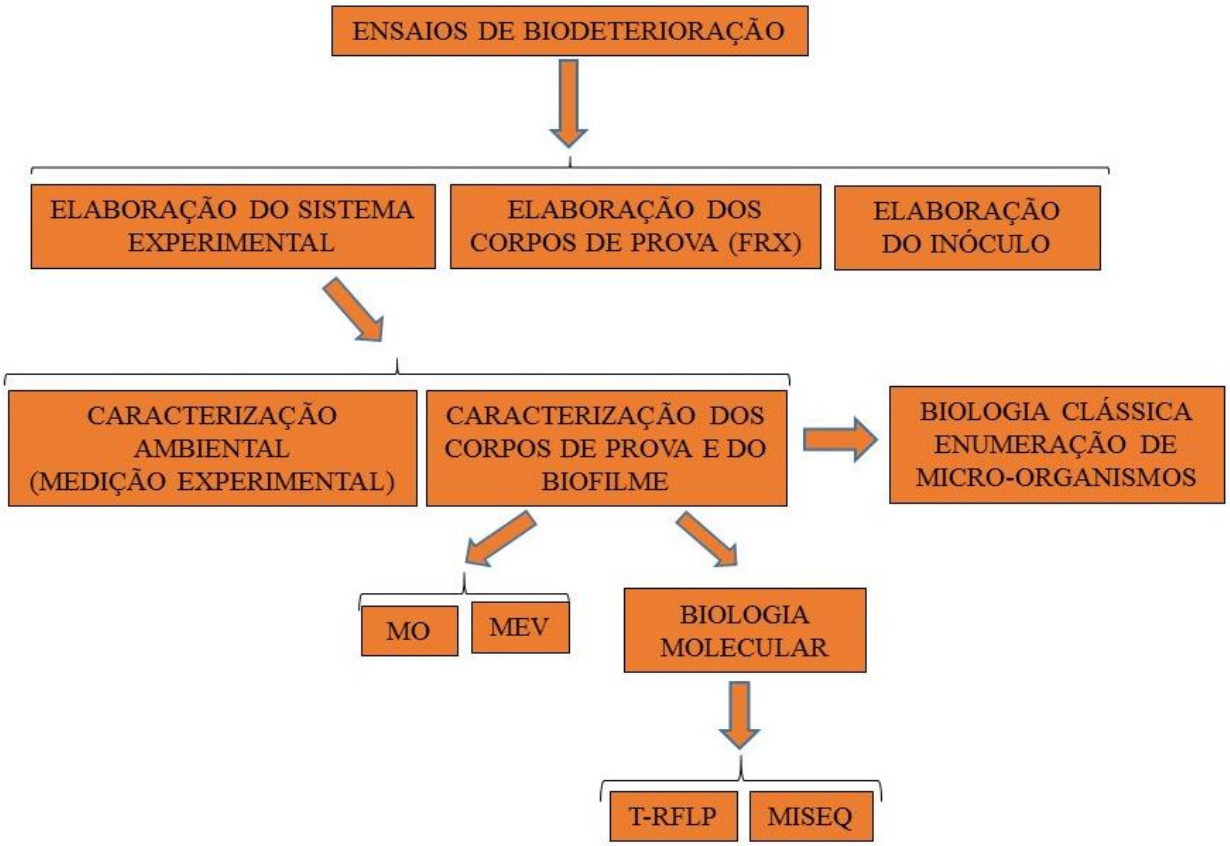


Figura 4.7. Detalhamento esquemático dos ensaios de biodeterioração - 3ª etapa do trabalho. Fonte: Elaboração própria.

4.4.1. Elaboração dos corpos de prova

Os corpos de prova foram preparados com cimento/areia/barro/água na proporção 20:30:5:13, de modo a obter uma argamassa para comparar as paredes do MN. Foram confeccionados corpos de prova (Figura 4.8), de diferentes formatos, de acordo com a finalidade, como especificado a seguir:

- Retangular (4 cm de comprimento x 2 cm de largura x 1 cm de altura) - avaliar a formação de biofilmes pela técnica convencional de contagem de micro-organismos.
- Circular (1,5 cm de diâmetro x 1 cm de altura) - caracterizar o biofilme e a superfície do corpo de prova após sua remoção, por MEV; o biofilme também foi analisado por técnicas de biologia molecular.

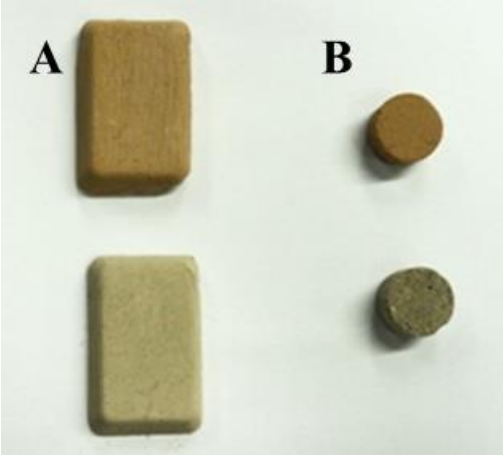


Figura 4.8. Tipos distintos de corpos de prova com e sem revestimento usados para avaliação da formação do biofilme por quantificação celular (A) e para análise da superfície por MEV e biologia molecular (B). Créditos da figura: Acervo pessoal

4.4.2. Descrição do sistema experimental

Para a realização dos ensaios foi desenvolvido um sistema experimental (Figura 4.9) composto de um reator de vidro de 60 cm de largura x 30 cm de profundidade x 40 cm de altura, com tampa, dotado da parte superior de um sistema de iluminação artificial, composto de duas lâmpadas fluorescentes tubulares de 60W (Famastil) com bandeja de vidro, um higrômetro (*INCOTERM®, INDÚSTRIA DE TERMOMETRO*), um termostato (*ATMAN, AT-100*), um termômetro (I*ncoterm*) e um umidificador (*Multitoc Health*) utilizado para realizar a deposição de água destilada e ácida.

Figura 4.9. Reator desenvolvido para os experimentos acelerados de biodeterioração (A) e vista superior da disposição dos corpos de prova (B). Fonte: Elaboração própria

Antes do início do experimento, o reator foi rinsado com álcool 70°INPM para sua desinfecção. No fundo do reator em até 2 cm abaixo do suporte de vidro, foram depositados suportes para colocar os corpos de prova. A umidade na parte interna do reator foi controlada em 30-50%, com auxílio adicional de umidificador e por medição com higrômetro. A temperatura foi monitorada e apresentou valores de 29 ± 3°C aferida em termômetro fixado ao suporte de vidro onde serão dispostos os corpos de prova. A radiação luminosa de fótons foi contínua, tendo como finalidade garantir a fonte de energia necessária para o metabolismo das culturas fotossintetizantes (cianobactérias e algas).

4.4.3. Ensaio do desenvolvimento do biofilme em presença de névoa ácida em escala laboratorial (avaliação das variáveis)

a) Revestimento (Tinta)

Sobre alguns corpos de prova foi realizada a aplicação de duas demãos de tinta de alta qualidade disponível no mercado (Coral Premium, lote n° 11101799304, 09/201, validade 09/2014, antibactéria (99,9%) e antimofo (3 vezes mais proteção)), cujo fabricante informa a adição de antibacteriano e antifúngico. Para fins comparativos, foram ensaiados, simultaneamente, corpos de prova não revestidos e revestidos para avaliação da formação do biofilme sobre as superfícies.

b) Presença ou ausência de micro-organismos

Para promover a formação do biofilme sobre os corpos de prova, primeiramente foram preparados cultivos dos micro-organismos oriundos da amostragem direta da parede do Jardim da Princesa (ver item 4.1.1) em meios líquidos específicos: bactérias heterotróficas aeróbias (caldo nutriente), heterotróficas anaeróbias (Meio fluido ao Tioglicolato) e de ferrobactérias (caldo citrato férrico amoniacal), fungos (caldo Sabouraud) e micro-organismos fotossintetizantes (caldo Difco). Em seguida, considerado o tempo e a temperatura de incubação apropriados para cada grupo, foram recolhidos volumes iguais de cada população em frasco Erlenmeyer de 50 mL estéril e homogeinizados. A seguir 2 mL e 0,5 mL de suspensão celular foram espalhadas sobre a superfície dos corpos de prova retangular e circular, respectivamente, revestidos e não revestidos, de modo a dispersar quantidade similar por área de cupom. A suspensão celular foi mantida na geladeira e usada para mais aplicações semanais por um período de 14 dias.

c) Névoa/ Névoa ácida:

Os ensaios foram conduzidos em atmosfera úmida saturada com água destilada e água adicionada de sais mimetizando uma solução ácida. A formulação da névoa ácida artificial foi baseada na composição atmosférica da cidade do Rio de Janeiro (Tabela 4.6), segundo Hernandez *et al*. (2010). Essas soluções de água destilada e ácida foram dispersadas em forma de névoa com a utilização de umidificador (*Multitoc Health*).

Tabela 4.6. Composição de névoa ácida artificial (pH 5,12)

Componentes	µg/L
$NaNO_3$	1607
$CaSO_4.2H_2O$	5281
K_2SO_4	1570
$(NH_4)Cl$	1118
NaCl	3680
NaOH	212

Fonte: (Hernandéz *et al*., 2010)

Foram avaliadas 8 condições (Tabela 4.7), as quais foram investigadas as três variáveis citadas anteriormente: Influência microbiana, tipo de névoa (ácida ou água destilada) e a proteção dos corpos de prova com revestimento comercial.

Tabela 4.7. Condições avaliadas no estudo de formação de biofilmes

Condição	Micro-organismo	Revestimento	Dispersão
1	Ausente	Ausente	Névoa
2	Ausente	Presente	Névoa
3	Ausente	Ausente	Névoa Ácida
4	Ausente	Presente	Névoa Ácida
5	Presente	Ausente	Névoa
6	Presente	Presente	Névoa
7	Presente	Ausente	Névoa Ácida
8	Presente	Presente	Névoa Ácida

* Névoa ácida segundo Hernández *et al.* (2010), pH = 5,12 e névoa de água destilda pH = 6,50

O tempo total para cada condição foi de 100 dias, sendo realizadas análises de quantificação celular das culturas adicionadas aos corpos de prova e dos micro-organismos desenvolvidos ao final do processo de biodeterioração.

4.4.3.1.Caracterização do biofilme por biologia clássica e molecular

Após raspagem dos corpos de provas retangulares em solução redutora foram realizadas a enumeração das populações microbianas: bactérias (aeróbias e anaeróbias heterotróficas totais, ferrobactérias, aeróbias e anaeróbias produtoras de ácido), fungos totais e micro-organismos fotossintetizantes (ver seção 4.2.2).

As análises biomoleculares seguiram as metodologias descritas na seção 4.3.1, com modificação representada pelo fato dos corpos de prova terem sido raspados com bisturi estéril em placas de Petri e rinsados com água destilada estéril (10 mL) para posterior filtração por membrana de microporo (0,22 µL).

4.4.3.2.Caracterização do biofilme nos corpos de prova

Os corpos de prova foram analisados quanto aos aspectos relacionados à biodeterioração do material, conforme especificado na Tabela 4.8. Foram estudadas a formação de biofilme e a alteração na superfície, empregando a Fluorescência de Raio-X (FRX), a Microscopia Óptica (MO) e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Tabela 4.8. Condições e técnicas utilizadas para caracterização da biodeterioração

Condição do corpo de prova	Técnica	Periodicidade
Sem biofime	Microscopia óptica (MO)	Inicial
	MEV	Inicial
	FRX	Inicial
Com biofilme	Quantificação microbiológica	Inicial /final
	Microscopia óptica (MO)	Inicial /final
	MEV	Final
Após Raspagem	Microscopia óptica (MO)	Final

A caracterização mineralógica dos corpos de prova foram realizadas por fluorescência de raios X (FRX) no Centro Tecnologia Mineral (CETEM). As amostras foram preparadas em prensa automática VANEOX (molde de 20 mm, P = 20ton e t = 30s), utilizando como aglomerante ácido bórico na proporção 1:0,5 (2g da amostra para 1,0g de ácido bórico).

Os resultados são semi-quantitativos expressos em %, calculados como óxidos normalizados a 100%. A determinação da perda por calcinação (PPC) das amostras foram feitas em equipamento Leco TGA-701. Primeira rampa de aquecimento 10°C/min de 25-107°C,

segunda rampa 40°C/min de 107-1000°C. O ensaio foi finalizado após 3 pesagens sequencias idênticas.

Para a caracterização da superfície foi realizada uma Microscopia Ótica (MO) e Eletrônica de Varredura (MEV). Um estereomicroscópio (*Opton)* foi empregado para MO. Finalmente para análise por MEV, foi utilizado equipamento Bruker e Flash (*QUANTA 400, FEI*), com a amostra previamente metalizada com ouro/carbono utilizando *BAL-TEC (SCD 005, Sputter Coater)*. A caracterização da superfície foi realizada em corpos de prova com presença e ausência de revestimento, sem a adição de micro-organismo e com biofilme desenvolvido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, conforme já citado em Materiais e Métodos, foi desenvolvido um trabalho experimental visando definir uma metodologia para as coletas de material em campo e para padronizar a execução das análises microbiológicas de modo a contemplar a diversidade de grupos microbianos relacionados a deterioração de monumentos históricos.

Seguem-se a análise e a discussão dos resultados referentes ao monitoramento microbiológico do Museu Nacional (MN) e Museu de Arte Contemporânea (MAC), e, por fim, dos resultados dos ensaios realizados no laboratório para avaliar a influência de biofilmes na biodeterioração de argamassa e o emprego de tinta como revestimento.

5.1. TESTES PRELIMINARES E DEFINIÇÃO DA METODOLOGIA

A seguir são apresentados os resultados de caracterização climática dos arredores do MN e a caracterização microbiológica de materiais oriundos das paredes do Jardim das Princesas (MN), de uma única amostragem realizada em 30 de setembro de 2012. Este trabalho foi realizado fundamentalmente para identificar os grupos microbianos aderidos às paredes, definir os meios de cultura para sua enumeração e ainda avaliar a influência do comportamento sobre o desenvolvimento das populações microbianas.

5.1.1. Caracterização ambiental da área (Museu Nacional)

No período de 15 de setembro a 15 de outubro de 2012, foi realizado o levantamento de dados do INMET, de modo a contemplar o comportamento diário da temperatura e da umidade, 15 dias antes e 15 dias após a data da coleta do material no MN (30/09/2012). A figura 5.1 apresenta uma compilação dos valores médios de temperatura e umidade deste período.

Os patrimônios culturais constantemente sofrem processos de degradação causados por fatores físicos (temperatura; umidade relativa do ar; luz natural e artificial), químicos (poluição atmosférica, poeira) e biológicos (micro-organismos, insetos, roedores). Os fatores físicos e químicos, além do efeito direto, têm ação no desenvolvimento dos micro-organismos, que por sua vez influenciam na intensidade e na velocidade do processo de deterioração. Por isso, há a necessidade de ser realizado um levantamento de dados climáticos da área onde a obra está

instalada para delinear a estratégia e plano de ação no combate à deterioração das obras culturais (LOPES, CARVALHO; MOREIRA, 2003).

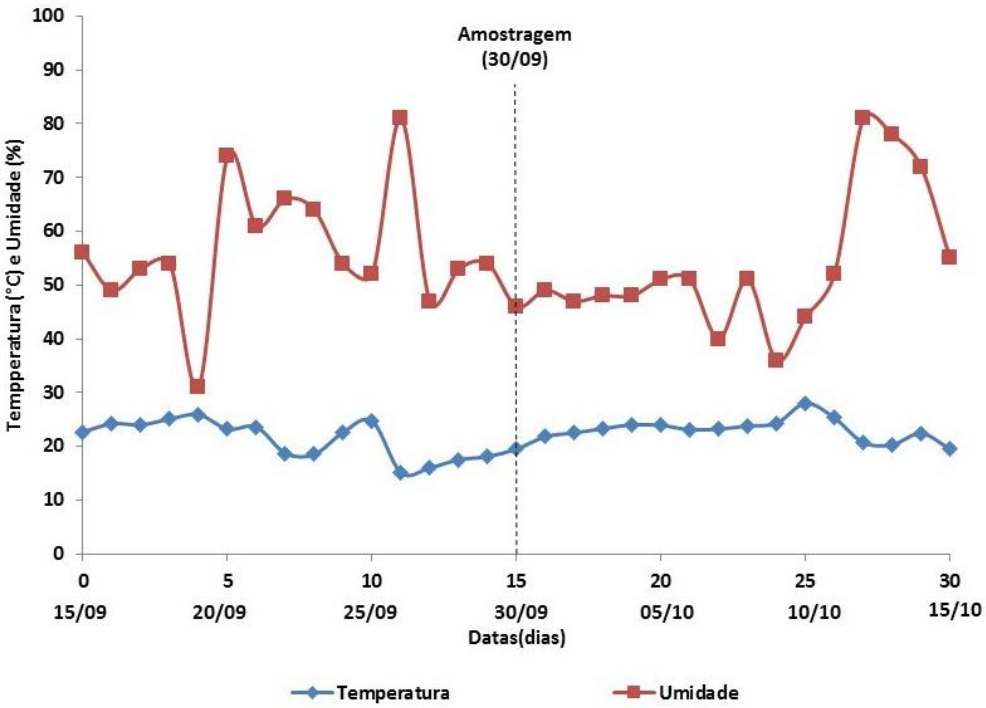


Figura 5.1. Variação da temperatura e da umidade no período de coleta segundo levantamento de dados meteorológicos na cercania do Museu Nacional (Fonte: INMET).

De acordo com a Figura 5.1, a temperatura média no período analisado variou de 15,1°C a 28,0°C, enquanto a umidade relativa do ar esteve entre 31% e 81%. Portanto, em apenas 30 dias, ambos fatores climáticos apresentaram uma intensa amplitude. Contudo, como pode ser constatado pela análise da figura 5.2, na maior parte do período, a temperatura foi amena, variando entre 23°C e 25°C, e a umidade se situando entre 40% e 60%. No período supracitado, houve um pico de umidade no décimo primeiro dia, correspondente a quatro dias antes da data da amostragem, o que acarretou em aumento da umidade relativa e decréscimo da temperatura. Após a coleta, mais três dias apresentaram chuva (vigésimo sétimo, vigésimo oitavo e vigésimo nono), o que teve como consequência a elevação da umidade relativa (Figura 5.2), porém não teve influência na temperatura, provavelmente devido ao baixo volume de chuva.

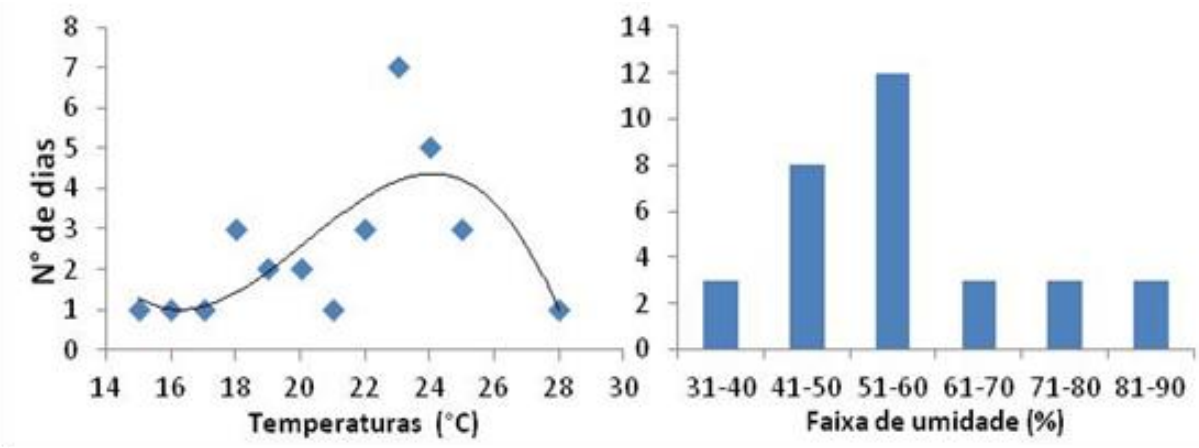


Figura 5.2. Comportamento da temperatura e da umidade entre 15 de setembro e 15 de outubro de 2012 (Data de amostragem: 30/09/2012).

Este é o comportamento característico da condição média da atmosfera no litoral brasileiro, em face das correntes marinhas. Porém, apesar da ampla variação climática, a temperatura média nestes locais se situa na faixa de 20 e 25°C. Esta baixa amplitude térmica, isto é diferença entre as temperaturas máxima e mínima, se deve à maritimidade, medida da influência da umidade do mar sobre cidades próximas ao litoral.

A região Sudeste brasileira apresenta transição entre os climas quentes de latitudes baixas e os climas mesotérmicos de tipo temperado das latitudes médias. A sua localização latitudinal confere uma variada gama de regimes climáticos, que vão do tropical ao subtropical, com precipitações altamente irregulares no espaço e no tempo, e elevada evaporação mais ao norte (CAVALCANTI *et al.*, 2009).

Note-se que as condições climáticas (temperatura e umidade) à época da amostragem foram indicadas para a atividade metabólica de bactérias e fungos, o que, em consequência, resulta na geração de produtos, como ácidos orgânicos, que causam a degradação de materiais. Em geral, grau de umidade relativa do ar superior a 70% e temperatura entre 16 e 30ºC são considerados favoráveis ao desenvolvimento destes grupos microbianos. Portanto, se outros fatores necessários para a ocorrência de processo de respiração microbiano também forem propícios, tais como disponibilidade de nutrientes e oxigênio, ou outro aceptor final de elétrons, e pH, o processo de biodeterioração será intensificado (ROSADO *et al.*, 2013; HEYRMAN; SWINGS, 2003).

Ao avaliar diferentes repositórios (dois em Cuba e um na Argentina), Guiamet *et al.* (2011) detectaram maior número de bactérias e de fungos nos ambientes com umidade relativa e a temperatura do ar mais altas, aproximadamente 75% e 28,0°C, respectivamente. Por outro lado, menor densidade celular foi encontrada nos locais onde a umidade foi de 59% e a temperatura de 23,8°C. Comparativamente, foi constatado um número 3 vezes inferior para fungos e 35 vezes menor para bactérias. Isto sugere que a temperatura e umidade afetam mais a atividade metabólica das bactérias do que a dos fungos.

Shirakawa *et al*. (2011) observaram que o descoramento de tintas látex aplicadas às superfícies de paredes de concreto era maior na cidade de Ubatuba em comparação àquelas localizadas na cidade de São Paulo. Segundo os autores isso se deve a maior umidade relativa do ar em Ubatuba, em decorrência da maior precipitação de chuva e consequentemente maior deposição ácida.

5.1.2. Determinação do teor de umidade da superfície da parede

A umidade relativa de amostras da superfície de parede, em dois pontos distintos do Jardim da Princesa (MN), foi de 4,6% no ponto 1 e 1,1% no ponto 2, não obstante ser a umidade relativa do ar de 54% no dia da amostragem (Figura 5.1), de ter chovido três dias antes da amostragem, e da arborização do local, que participa efetivamente da manutenção da umidade e da amenização da temperatura.

5.1.3. Avaliação de diferentes meios de cultura para enumeração das populações microbiana

A Tabela 5.1 apresenta os valores correspondentes à enumeração de diferentes grupos microbianos em meios de cultura específicos para amostras coletadas em dois pontos distintos nas superfícies de paredes externas do MN, que estão expostas ao tempo.

Tabela 5.1. Enumeração dos micro-organismos do Museu Nacional (Jardim da Princesa)

		Enumeração	
		Ponto 1	**Ponto 2**
Umidade		4,6%	1,1%
Micro-organismos	**Meio para enumeração**	**UFC/cm^2**	**UFC/cm^2**
Bactérias aeróbias totais	Agar nutriente	3,3 x 10^6	2,6 x 10^4
Bactérias produtoras de ácido	Agar Vermelho de Fenol glicosado	8,2 x 10^5	2,8 x 10^4
Ferrobactérias	Agar Citrato férrico amoniacal	1,4 x 10^5	AD
Fungos	Agar Sabouraud	6,8 x 10^3	2,4 x 10^3
Fungos	Agar Extrato de Malte	4,2 x 10^3	2,1 x 10^3
Fotossintetizantes	Agar Difco	CNI	CNI
Actinobactérias	*	TNS	TNS
		NMP/cm^2	**NMP/cm^2**
Bactérias anaeróbias totais	Meio fluído ao tioglicolato	3,8 x 10^3	9,2 x 10^2
Bactérias anaeróbias produtoras de ácido	Caldo Vermelho de Fenol glicosado	1,2 x 10^3	1,3 x 10^3
Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)	Caldo Postgate E modificado	0	0

AD - Abaixo do limite de detecção; CNI - Colônias Não Individualizadas; TNS - Testes não satisfatórios; *diversos meios foram testados sem ter resultados satisfatórios

Para a enumeração, as diferentes populações bacterianas foram cultivadas em meios de cultura acrescidos ou não do agente antifúngico nistatina. Foi evidenciado o crescimento de fungos em todos os cultivos realizados sem adição de nistatina, que mesmo em pequena quantidade, interferiram na contagem celular, comprometendo a confiabilidade dos resultados. Já a adição de nistatina evitou o crescimento de fungos em todos os meios empregados. Desta forma assumiu-se a adição de nistatina aos meios para a quantificação de bactérias.

Para os fungos, apesar de testados cinco meios, foram compilados na Tabela 5.1, apenas as contagens em Agar extrato de malte e Agar Sabouraud, por terem proporcionado os melhores resultados. O crescimento de fungos no meio Agar Batata-dextrose foi intenso e variado, porém houve alta produção de exopolímeros, o que dificultou a contagem. Já nos meios Agar Czapeck e CYA, o crescimento foi reduzido. Similarmente, para a quantificação dos fungos, foi evidenciada a importância da adição do agente antibacteriano amoxicilina de modo a evitar o crescimento indesejável de bactérias nas placas.

A Tabela 5.1 apresenta as contagens das diferentes populações microbianas encontradas no material oriundo das paredes do Jardim da Princesa, nos meios de cultura selecionados pela maior amplitude qualitativa e quantitativa de culturas obtidas. A análise da tabela revela um elevado número de micro-organismos aderidos às superfícies das paredes, apesar do baixo teor de água determinado no material amostrado. A água, dentre os fatores ambientais, representa o de maior importância para a atividade de micro-organismos (MADIGAN *et al.*, 2010). A disponibilidade de água é essencial para o crescimento microbiano, por ser o veículo de transporte de nutrientes para dentro da célula e evitar o acúmulo de metabólitos gerados, além de manter a pressão osmótica intracelular. Logo, em caso de desidratação, a célula perde a capacidade de realizar o metabolismo energético, levando à morte. O conteúdo de água adequado ao metabolismo microbiano é de 50%

No caso das diferentes populações bacterianas, as maiores concentrações foram determinadas no ponto 1, o de maior umidade. Comparativamente, o teor de água não teve influência no número de fungos filamentosos, mostrando a maior capacidade destes em se estabelecer em ambientes de baixa umidade.

Apesar da maior dependência por água para atender suas necessidades fisiológicas, as bactérias aeróbias se apresentaram em maior número comparativamente aos fungos, micro-organismos aeróbios ou facultativos. A predominância de bactérias heterotróficas cultiváveis, grupo normalmente presente em maior número em biofilmes formados sobre superfícies de materiais imersos em água salgada ou doce, se deve a atividade das espécies produtoras de materiais poliméricos extracelulares (*extracellular polymeric substance*s, EPS), que permite a adesão irreversível das células microbianas às superfícies sólidas, conferindo a estas espécies a denominação de colonizadores primários. Neste grupo se destacam o gênero *Pseudômonas*, bastonetes Gram-negativos, presentes em diversos *habitats*, com capacidade de crescer na ausência e presença de oxigênio.

As morfologias macroscópicas das culturas bacterianas heterotróficas presentes nas amostras quando semeadas no meio Agar nutriente podem ser visualizadas na Figura 5.3 (A e B). Constata-se a diversidade de espécies bacterianas em cada amostra, bem como entre as amostras coletadas nos dois pontos. No ponto 1 (Figura 5.3A) houve ocorrência de colônias brancas leitosas de tamanho médio, bem como microcolônias, enquanto no ponto 2 (Figura

5.3B) se evidencia maior quantidade de microcolônias, entretanto destaca-se que o ponto 1 a imagem está uma diluição acima do ponto 2.

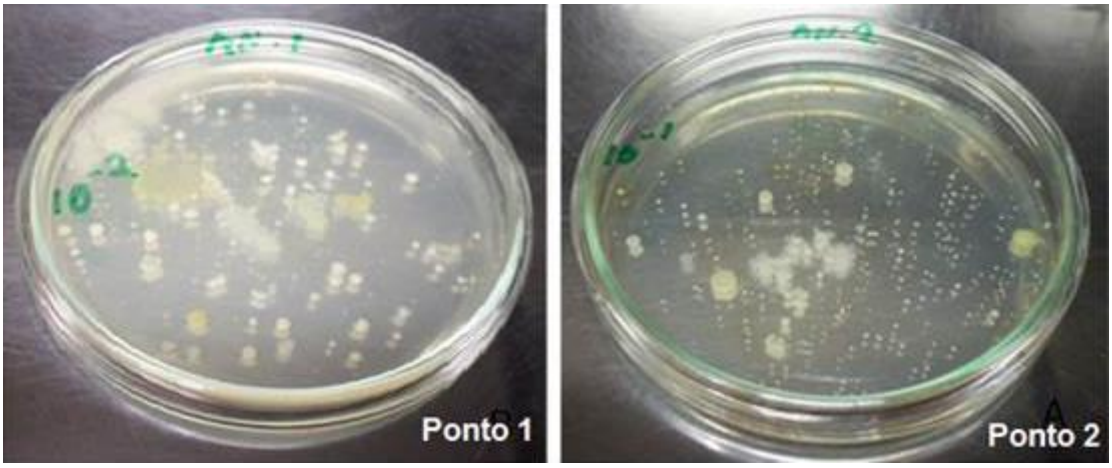


Figura 5.3. Morfologia das colônias de bactérias aeróbias heterotróficas em meio Agar nutriente oriundas de amostragem de paredes do Jardim da Princesa do Museu Nacional, em pontos distintos. Crédito de imagem: Acervo pessoal

A biodiversidade das bactérias denota a complexidade dos biofilmes aderidos as paredes. Cabe destacar que os biofilmes são ecossistemas estruturados altamente dinâmicos, onde os micro-organismos, interagem cooperativamente por conta da diferenciação metabólica e das características fenotípicas. A adesão microbiana e a interação entre os membros destas comunidades funcionais resulta em sistemas biológicos heterogêneos, inclusive com densidade variável das espécies, onde a diversidade microbiana é constatada.

Na Figura 5.4 são apresentadas as imagens do plaqueamento das amostras da superfície das paredes em meio Agar vermelho de fenol. O meio de coloração vermelha sofre alteração para amarelo pela redução do pH, quando há excreção de produtos metabólicos ácidos. Porém, como pode ser comprovado nas imagens (Figuras 5.4 A e B), verifica-se que a coloração do meio variou para rosa intenso, típica de ocorrência de alcalinização do meio. Isso pode ser explicado pelo fato do meio não conter açúcares, o que leva os micro-organismos a consumirem os materiais proteicos (extrato de carne e peptona) preferencialmente como fonte de carbono. Por causa disto há acumulo da fonte de nitrogênio na forma de íon amônio, culminando no aumento do pH. A fim de impedir essa mudança, ao meio foi adicionada glicose. Neste caso, a cor amarelada foi evidenciada (Figura 5.4C).

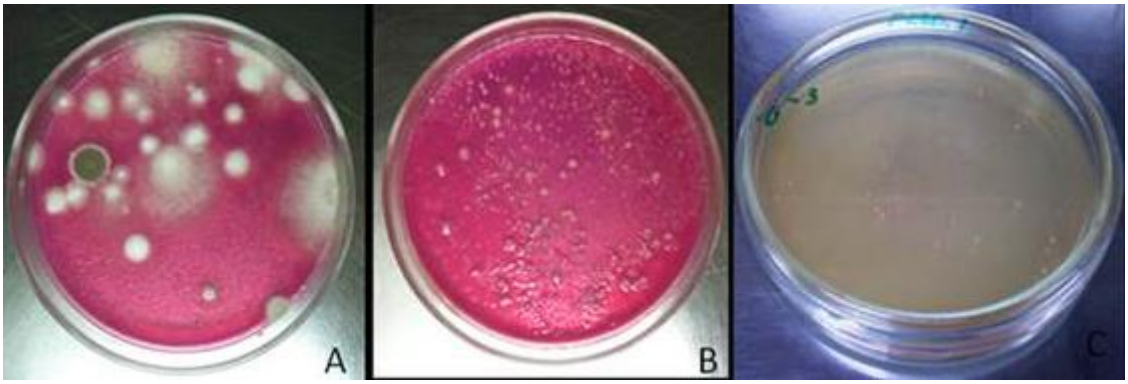


Figura 5.4. Crescimento de bactérias aeróbias produtoras de ácido em meio Agar vermelho de fenol sem adição de nistatina (A), com adição de nistatina (B), e com adição de glicose e nistatina (C). Crédito de imagem: Acervo pessoal

A Figura 5.4A ainda permite observar que a não adição de nistatina ao meio permite que os fungos se desenvolvam comprometendo a contagem de bactérias, enquanto a adição do antifúngico não interfere no crescimento das bactérias (Figura 5.4B e Figura 5.4C).

Em relação às bactérias produtoras de ácido é importante mencionar que o crescimento das culturas preponderantes (Figura 5.4C) quando isoladas, não houve alteração da coloração do meio vermelho de fenol glicosado para amarelo. Portanto, estas espécies não produziram ácido. Desta forma, a contagem de bactérias aeróbias produtoras de ácido (Tabela 5.1) no meio Agar vermelho de fenol glicosado passou a ser desenvolvida em caldo pela técnica de Número Mais Provável (NMP). Adicionalmente foi aferido que ao passar para essa técnica, não se fez necessário a adição de nistatina.

As ferrobactérias foram encontradas em ambos os pontos amostrados (Figura 5.5). Mas, apesar de presentes em número elevado no ponto 1 (Tabela 5.1; Figura 5.5 A), encontravam-se no número abaixo do limite de confiabilidade da técnica de plaqueamento para o ponto 2 (Figura 5.5B). Ainda no ponto 2, não foi adicionada a nistatina e foram detectadas a presença de fungos. Assim a enumeração adotada passa a ser realizada com adição de nistatina pela técnica de plaqueamento.

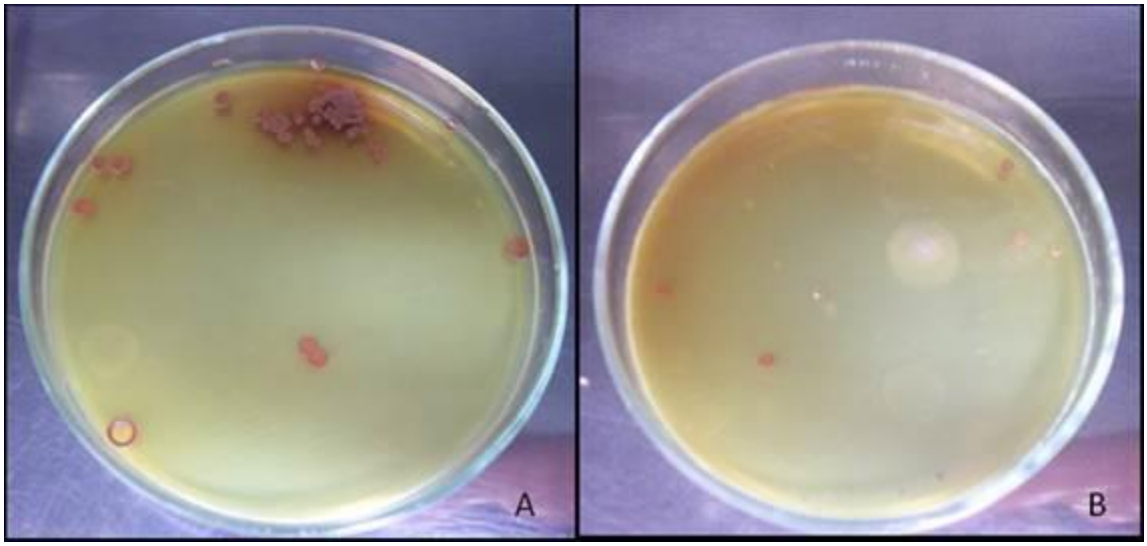


Figura 5.5. Enumeração de ferrobactérias em Agar Citrato Férrico Amoniacal (A) no ponto 1 com adição de nistatina e (B) no ponto 2 sem adição de nistatina. Crédito de imagem: Acervo pessoal

Para os fungos, apesar de testados cinco meios (Tabela 5.1), apenas as contagens em Agar Extrato de Malte e Agar Sabouraud foram compiladas, por terem proporcionado os melhores resultados (Figura 5.6 A e B). O meio Agar Batata-dextrose foi descartado, pois houve alta produção de exopolímeros, o que pode interferir na contagem, além de outros micro-organismos (Figura 5.6C). Já nos meios Agar Czapeck e CYA, o crescimento foi reduzido. Para o meio Agar Extrato de Malte o crescimento foi bom, mas menor que o meio Agar Sabouraud, assim para as seguintes enumerações foi adotado o meio Agar Sabouraud com a adição de amoxicilina.

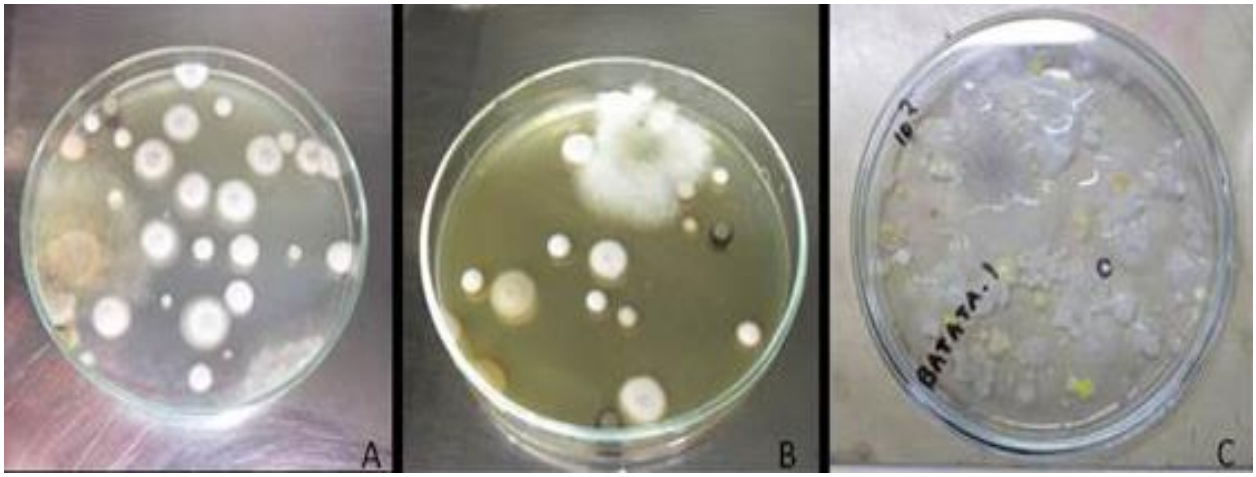


Figura 5.6. Enumeração dos fungos presentes nas amostras coletadas das paredes externas do Museu Nacional em Agar Sabouraud (A), Agar Extrato de Malte (B) e Agar Batata-Dextrose (C). Crédito de imagem: Acervo pessoal

O maior desenvolvimento dos micro-organismos fotossintetizantes se deu no meio Difco, sem adição de cloranfenicol (Figura 5.7A). Mas, como não foi possível a distinção das colônias de microalgas/cianobactérias nas placas por sua interação com fungos, foi definido, para continuidade do trabalho, a determinação qualitativa de micro-organismos fotossintetizantes totais, pela técnica do NMP em meio Difco, na forma líquida, sem adição de cloranfenicol (Figura 5.7C). A literatura reporta alta incidência de micro-organismos fotossintetizantes em paredes (GAYLARDE; GAYLARDE, 1998; CRISPIM *et al.*, 2004; HERRERA *et al*., 2004).

Para as bactérias cultivadas em condição de anaerobiose, analogamente ao observado para as bactérias cultivadas de modo a atender a respiração aeróbica, foram detectados números semelhantes de heterotróficas e das produtoras de ácido (Tabela 5.1). Porém, não foi detectada a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS). A contagem de BRS foi contemplada posto que são encontradas em solos (VIDELA, 2002), e havia canteiros margeando as paredes. Logo, os respingos das chuvas poderiam ter favorecido a sua presença nos biofilmes formados sobre as paredes.

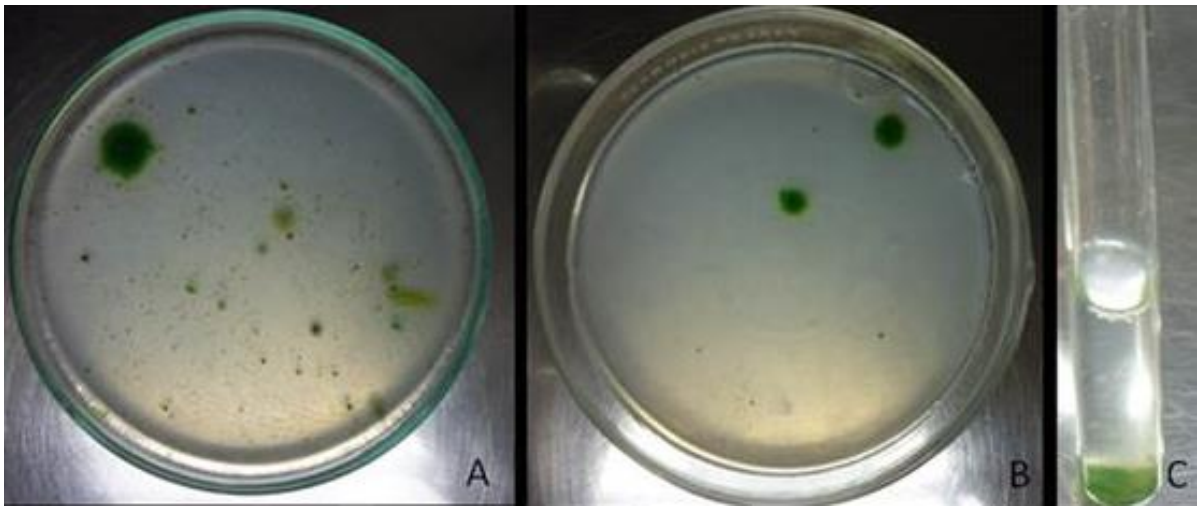


Figura 5.7. Colônias de micro-organismos fotossintetizantes presentes nas amostragens das paredes externas do Museu Nacional em Agar Difco (A), Agar MKM (B) e meio liquido Difco (C). Crédito de imagem: Acervo pessoal

Ademais, o segundo patrimônio a ser avaliado - Museu de Arte Contemporânea - está situado na costa litorânea, portanto, sujeito a maresia e, sabe-se que a água do mar contém BRS e sulfato, aceptor final de elétrons necessário para o seu metabolismo desassimilativo. Este argumento é suportado por Videla *et al.* (2000) que relataram a presença de BRS na Peninsula

de *Yucatan* no México, especificamente em Tulum, situada ao longo da costa do mar das Caraíbas.

No caso das actinobactérias, foram testados três diferentes meios de cultura (Agar Jausen, Agar 72C e Agar amido-caseína), com base na literatura científica (Anexo A). Cada um dos meios foi testado com e sem adição de agentes antimicrobianos, nistatina e amoxicilina, na forma isolada ou combinada. Contudo, como pode ser comprovado pela observação da Figura 5.8 (A-C), nenhuma das condições ensaiadas para cultivo promoveu o crescimento tão somente de actinobactérias.

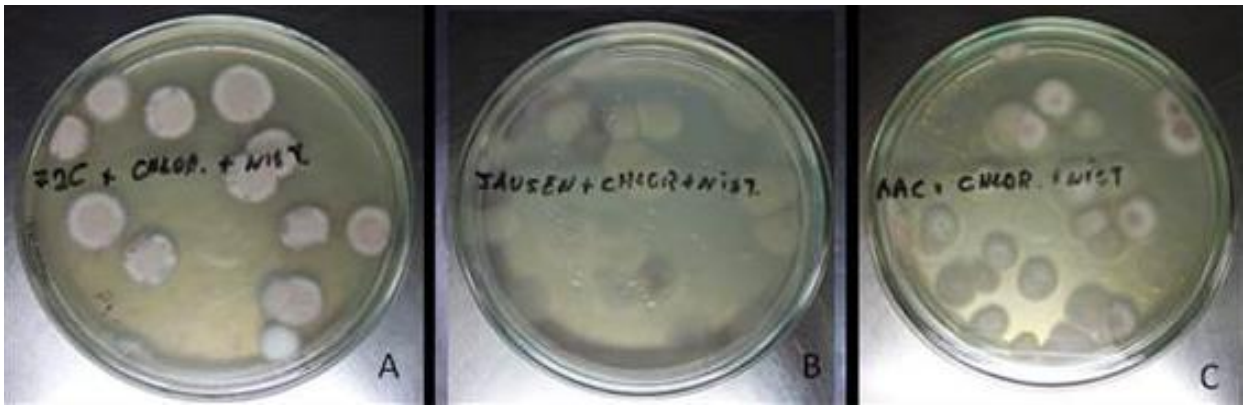


Figura 5.8. Colônias obtidas a partir do cultivo das amostras oriundas das paredes externas do Museu Nacional em meios indicados para crescimento/enumeração de actinobactérias (A: Agar 72C; B: Jausen; e C: Agar amido-caseína), com adição de bactericida (amoxicilina) e fungicida (nistatina). Crédito de imagem: Acervo pessoal

Os resultados obtidos demonstram que mesmo em condições consideradas inóspitas para a atividade dos micro-organismos, como baixa umidade e alta irradiação solar, é possível encontrar a presença de micro-organismos. De fato, diferentes populações microbianas, incluindo bactérias, fungos, algas e, inclusive, líquens, já foram relacionados à deterioração de monumentos históricos (ROSADO *et al*., 2013; CAPODICASA *et al*., 2010; PANGALLO *et al.*, 2009). A partir da análise dos dados obtidos foi elaborada a Tabela 5.2 definindo as análises microbiológicas e os meios de cultura a empregar caso a caso.

Tabela 5.2. Protocolo das análises microbiológicas a serem executadas na investigação da colonização microbiana de monumentos

População microbiana cultivável	**Meio de Cultura**	**Técnica de cultivo**
Bactérias heterotróficas aeróbias totais	Agar Nutriente	*Spread Plate*
Bactérias produtoras de ácido aeróbias	Caldo Vermelho de fenol glicosado	NMP
Ferrobactérias	Agar citrato férrico amoniacal	*Spread Plate*
Bactérias heterotróficas anaeróbias totais	Meio fluido ao tioglicolato	NMP
Bactérias produtoras de ácido anaeróbias	Caldo Vermelho de fenol glicosado	NMP
BRS	Postgate E modificado	NMP
Fungos filamentosos	Agar Sabouraud	*Spread Plate*
Micro-organismos fotossintetizantes	Caldo Difco	NMP

5.1.4. Caracterização biomolecular

Foram isolados os micro-organismos preponderantes a partir dos cultivos das amostras coletadas na superfície de paredes do Jardim da Princesa (pontos 1 e 2), área externa do MN (Figura 4.4), em meios de cultura de diferentes composições químicas, visando atender as necessidades nutricionais de populações microbianas normalmente relacionadas ao processo de biodeterioração de monumentos. No caso das bactérias, foram isolados um total de 17 diferentes colônias: 10 no ponto 1 e 7 no ponto 2. As culturas foram identificadas empregando técnicas de Biologia Molecular, a exceção de uma que perdeu a capacidade de cultivo *in vitro* durante plaqueamento/repiques para testes de pureza e preservação. A tabela 5.3 apresenta as diferentes espécies bacterianas identificadas, com índice de similaridade superior a 98%, o que é bem aceito como certeza para definir uma espécie ou um gênero.

Dentre os micro-organismos isolados, o maior número de identificados pertencente ao gênero *Artrobacter,* embora nenhuma delas tenha sido identificada a nível de espécie. Esta bactéria foi encontrada em ambos os pontos, embora com maior predomínio no ponto 1. Este gênero se apresenta na forma de bacilos Gram-positivos, com metabolismo estritamente aeróbio. *Artrobacter* spp. são comumente encontradas no ambiente, principalmente em solos (FUNKE *et al.*, 1996), o que indica que sua presença nas paredes amostradas esteja relacionada à proximidade à canteiros onde havia o cultivo de plantas; sendo a disseminação possivelmente decorrente da ação do vento e/ou da chuva. Este micro-organismo também foi encontrado por Gorbushina *et al.* (2004), estudando a biodeterioração da igreja de Martins, na Alemanha.

Tabela 5.3. Espécies bacterianas isoladas dos pontos 1 e 2 das paredes externas do Jardim da Princesa (MN)

Meio de cultura	Ponto 1		Ponto 2	
	Espécie Bacteriana	**S**	**Espécie Bacteriana**	**S**
AN	*Artrobacter* sp	85%	*Artrobacter sp*	99%
	Ensifer sp.	97%	*Bacillus megaterium*	100%
	Ensifer sp.	92%	*Stenotrophomonas rhizophila*	100%
VF	*Artrobacter sp*	100%	*Bacillus megaterium*	-
	Artrobacter sp	100%	*Enterobacter* sp.	84%
	Artrobacter sp	100%	*Enterobacter* sp.	91%
	Artrobacter sp	100%	*Rhodococcus* sp.	90%
	Pseudomonas mexicana	100%		

AN: Agar Nutriente; VF: Vermelho de Fenol glicosado; S: Similaridade.

O gênero *Rhodococcus* compreende células Gram-positivas, imóveis, não esporulantes, e aeróbias. Este representante do filo Actinobactéria já foi encontrado em diversos ambientes, incluindo solo e água (BURKOVSKI, 2008). Outra actinobactéria *Ensifer*, sinonímia do gênero *Sinorhizobium*, comumente encontrada em solos, também foi identificada. Esta cultura tem como característica ser fixadora de nitrogênio e ter a capacidade de lisar outras espécies bacterianas (ROGEL *et al*., 2001).

É comum o isolamento de espécies do gênero *Pseudomonas* nos mais diferentes tipos de ecossistemas, em função da versatilidade nutricional das espécies. Salvato *et al.* (2008) isolaram uma espécie deste gênero de solo que foi caracterizada pela capacidade de degradar 2,6-diisopropilnaftaleno. Estas bactérias possuem necessidades nutricionais mínimas, o que lhes permite desenvolver em uma grande variedade de ambientes, estando amplamente distribuídas em solo e água. As células se apresentam como bacilos Gram-negativos, são aeróbios ou facultativos. Isolados de *Pseudomonas* spp. também foram reportados em estudos anteriores, como, por exemplo, no processo de biodeterioração nos Leões do Palácio de Alhambra, na Espanha (SARRÓ *et al.*, 2006).

Também a espécie *Bacillus megaterium* é comumente encontrada em solos. São Gram-positivos, aeróbios, e têm capacidade de solubilizar fosfatos naturais existentes no solo,

disponibilizando o fósforo (ASCASCO *et al.*, 2002). Nuhoglu *et al*. (2006) relataram a aceleração da biodeterioração de monumentos de pedra na Turquia por *Bacillus sp*.

Stenotrophomonas rhizophila tem sido isolada de inúmeros locais, como solo, água e de plantas. Tem ganhado destaque nos estudos de controle biológico, contribuindo para o crescimento de plantas (SCHMIDT *et al.*, 2010). Porém nenhum trabalho foi encontrado relacionando a sua participação em processo de biodeterioração.

As células do gênero *Enterobacter* se apresentam como bacilos pequenos Gram-negativos, anaeróbias facultativas, portanto capazes de realizar metabolismo respiratório ou fermentativo. São ubíquas, podendo ser encontradas em água doce, solos, esgotos, vegetais, entre outros locais. Em geral, espécies deste gênero são relacionadas a alterações químicas e deterioração de alimentos e patógenos oportunísticos multirresistentes (DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015; FRIEDEMANN, 2007; GRIMONT; GRIMONT, 2006), mas ainda não existem relatos sobre a sua participação em processos de biodeterioração de monumentos históricos.

A Tabela 5.4 apresenta a identificação de um total de 10 fungos isolados, dos quais 5 no ponto 1 e 5 no ponto 2. Houve predominância do gênero *Fusarium* no ponto 1, enquanto no ponto 2 houve maior diversidade dos isolados. Pode-se inferir que mesmo a uma pequena distância, de aproximadamente 5 metros, a biodiversidade microbiana seja diferenciada, embora a ordem de grandeza tenha sido similar (Tabela 5.1).

Tabela 5.4. Espécies Fungícas isolados nos pontos 1 e 2 de paredes externas do Jardim da princesa (MN).

Meio de cultura	**Ponto 1**		**Ponto 2**	
	Fungo	S	Fungo	S
AS	*Hypocreaceae* sp.	100%	*Cladosporium* sp	100%
	Fusarium oxysporum	99%	*Pestalotiopsis disseminata*	99%
	Penicillium sp.	99%	*Pestalotiopsis* sp	99%
AEM	*Fusarium domesticum*	96%	*Hypocreales* sp.	100%
	Fusarium domesticum	96%	*Pleosporales* sp.	99%

AS: Agar Sabouraud; AEM: Agar Extrato de Malte.

Alguns trabalhos demonstram ser comum a presença de *Fusarium, Penicillium* e *Cladosporium* em patrimônios culturais. Shirakawa *et al.* (2002) encontraram predominância do gênero *Cladosporium*, enquanto espécies do gênero *Fusarium* foram encontrados em pontos isolados em investigações sobre edifícios recém construídos. Nuhoglu *et al.* (2006) encontraram os gêneros *Cladosporium e Penicillium* em diversos sítios em seus estudos de aceleração dos efeitos da poluição atmosférica e das condições climáticas na biodeterioração de monumentos de pedras em Erzurum na Turquia. Já Guiamet *et al.* (2011) identificaram os gêneros *Cladosporium, Fusarium* e grande concentração de *Penicillium* isolados a partir de arquivos históricos do museu de La Plata (Argentina) e arquivos da República de Cuba. Os gêneros *Cladosporium e Penicillium,* bem como *Pestalotiopsis* foram isolados da Berlinda de Dom Pedro no Museu Imperial, em Petrópolis, Rio de Janeiro (LUTTERBACH *et al.,* 2013).

A maioria das espécies de *Fusarium* se encontra amplamente distribuída no solo, em regiões temperadas e subtropicais. Este fungo é capaz de sobreviver na água e no solo alimentando-se de materiais em decomposição. O gênero *Penicillium* é encontrado especialmente no solo, assim como em outros ambientes úmidos e escuros, contendo matéria orgânica biodegradável (BESSA *et al.,* 2005; BRITO *et al*., 2005).

Cladosporium é um gênero muito comum em todo o mundo, tendo sido isolado de ar, solo, produtos têxteis, alimentos e sementes. Mesmo nos ambientes domésticos é de ocorrência corriqueira. É uma espécie associada à decomposição de material vegetal, ninhos de aves e penas, papel, madeira e poeira atmosférica, indicando, dessa forma, ser um potencial agente de degradação (LUTTERBACH *et al*., 2013).

A família *Hypocreaceae*, cuja forma assexuada inclui o gênero *Trichoderma*, são encontrados normalmente em florestas, na forma de parasitas, e reconhecidos pelo colorido de seu corpo de frutificação, geralmente amarelo, laranja ou vermelho. Esse gênero também é encontrado na forma linquênica. O gênero *Pestalotiopsis* está amplamente distribuído, ocorrendo em solos, ramos, sementes, frutos e folhas podendo ser parasitas (SILANES *et al.,* 2009; JEEWON *et al.,* 2004).

Apesar dos resultados promissores do trabalho da identificação molecular, com o desenvolver da pesquisa foi consolidada a parceria com o *Melody Group,* que possibilitou a abordagem metagenômica. Assim foi possível investigar do ponto de vista da metagenômica a

comunidade microbiana, uma vez que a plataforma MiSeq permite identificar tanto as culturas cultiváveis quanto as não cultiváveis.

5.2. MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE DAS ESTRUTURAS EXTERNAS DO MN E DO MAC

5.2.1. Monitoramento meteorológico

A figura 5.9 apresenta os parâmetros climáticos a partir de 03 de março de 2014, data de início do monitoramento microbiológico, até 31/10/2014, quando findou o ensaio. No período do monitoramento, a temperatura variou entre 15 e 34°C, situando-se entre 20 e 28°C, nas datas de coleta dos materiais para análise. Pode-se também notar uma ampla variação de umidade de 36 a 93% no período, embora nas datas de coleta, a umidade relativa média do ar tenha se restringido a faixa de 60-80%.

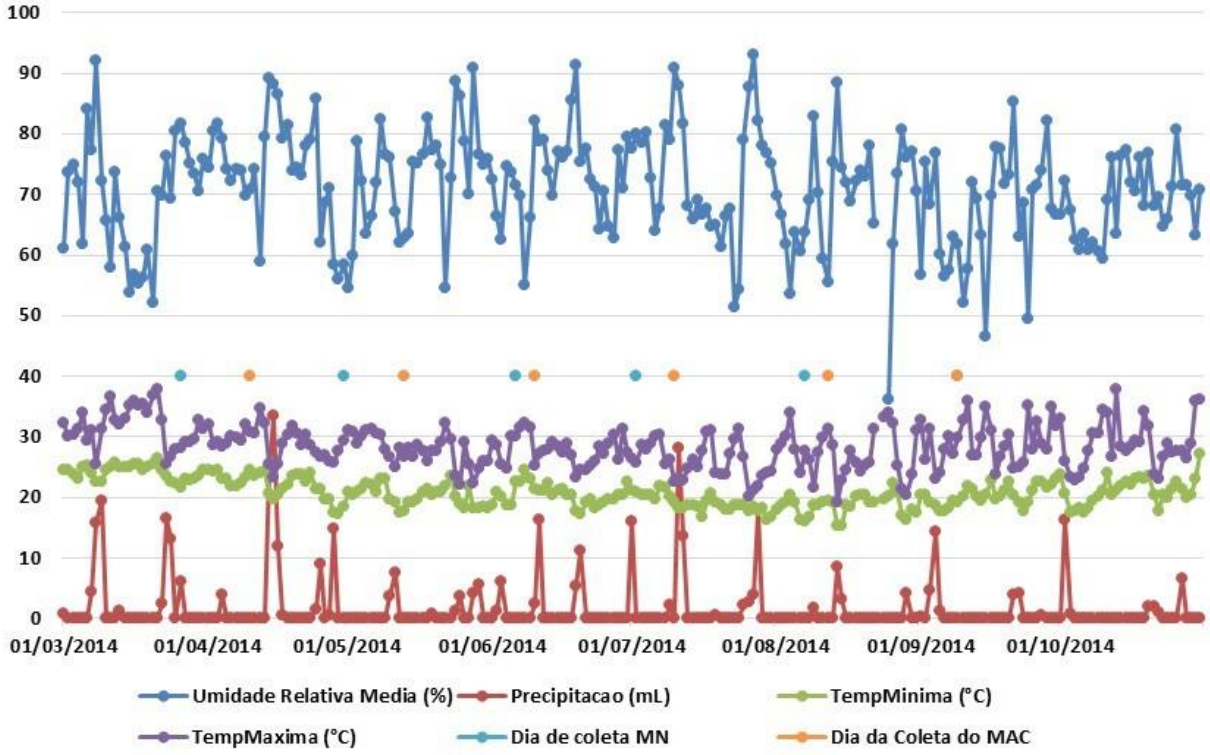


Figura 5.9. Monitoramento de variáveis meteorológicas.

A amplitude da umidade e temperatura pode estar relacionada aos poucos períodos de precipitação de chuvas, sendo o mais longo de 15 dias, enquanto os valores máximos de precipitação ocorreram em maio e julho, atingindo 34 e 29 mL de chuva, respectivamente. Este

comportamento pode ser observado a cada mês, conforme também evidenciado quando realizado o ensaio preliminar.

Os climas tipicamente tropicais induzem ao intemperismo físico e químico dos patromônios culturais e favorecem uma prematura colonização de comunidades de base fototrófica (JURADO *et al.*, 2014). Além disso, as temperaturas das superfícies das construções variam devido à absorção da radiação solar e da chuva. Amplas diferenças de temperatura conduzem a expansão térmica dos materiais, que por sua vez podem causar a quebra ou abalo dos materiais, bem como alteram a quantidade de água presente no material. Por exemplo, temperaturas em torno de 30°C e alta umidade favorecem a aceleração do processo de biodeterioração, enquanto em temperaturas de 4°C ou abaixo, a atividade microbiana é reduzida e, por conseguinte, o fenômeno é retardado (WU *et al.*, 2013).

Em locais onde a umidade do ar é elevada, acima de 80%, durante longos períodos, há uma alta probabilidade de bioameaças para as construções, uma vez que água favorece a corrosão de materiais, e no caso do concreto ou argamassas a água pode conduzir a solubilização de seus minerais. A chuva tem acesso as paredes verticais pela força do vento. Outras influências são a infiltração da água e a sua acumulação nos poros das superfícies dos materiais. Por isso, chuvas pesadas, em curto período de tempo, podem conduzir à corrosão da superfície e deterioração estrutural. Os ventos podem mover partículas no ar e acelerar a evaporação da água nos materiais de construção e, deste modo, aumentar a cristalização dos sais. Adicionalmente, chuvas com ventos fortes em contato com a superfície da parede podem danificar o material, pela ação abrasiva (WU *et al.*, 2013).

Os materiais das paredes do Jardim da Princesa, pontos 1 e 2, do Museu Nacional, coletados mensalmente ao longo de 6 meses foram analisados para determinação do conteúdo de água (Tabela 5.5). No ponto 1, os valores mais elevados foram em relação a coleta do mês 1 e sobretudo no mês 4. Isto se deveu a realização de amostragens em períodos de precipitação de chuva, o que contribuiu de forma significativa para o aumento da umidade na superfície da parede. Já no ponto 2, em geral, a parede apresentou valores menores de umidade, o que pode ser devido a sua localização. Neste ponto, a incidência de luz solar é mais intensa, e a vegetação é escassa e baixa.

Tabela 5.5. Teor de umidade na parede do Museu Nacional do Rio de janeiro

Mês	Ponto 1	Ponto 2
1	14,9	1,5
2	3,0	9,3
3	2,1	3,3
4	20,8	11,5
5	4,5	2,87
6	8,6	2,1

Importante destacar que, no decorrer do período do estudo, houve inúmeras ações externas sobre estas paredes, entre elas, a manutenção do Museu Nacional, com varrição na área do Jardim e poda dos arbustos no canteiro que margeiam as paredes. Isto pode ter também concorrido para a flutuação das medições.

De um modo geral, as paredes se encontravam em estado avançado de deterioração e heterogêneas. A olho nu, era perceptível que a área do ponto 1 estava mais umedecida do que a do ponto 2. Também era evidente que a superfície do ponto 1 se apresentava homogênea, enquanto a do ponto 2 possuía regiões diferenciadas. Neste caso, o material próximo ao canteiro era mais úmido e esfarelava facilmente enquanto o da parte superior, apresentava-se seco e endurecido.

Com relação ao Museu de Arte Contemporânea a coleta foi realizada com *swab* não sendo possível realizar a medição do teor de umidade na parede (raspagem com bisturi – mais agressiva). Ambos os pontos de coleta estavam situados na entrada do museu, não possibilitando mais danos ao patrimônio. No ponto na região superior (teto), era visível o revestimento deteriorado, com alteração de coloração, com exposição da estrutura metálica interna. No outro ponto de coleta, a janela de metal, havia bastante quantidade de produtos de corrosão. Nessa parte do museu há bastante circulação de pessoas bem como a proximidade do mar que aumenta significativamente a probabilidade de ocorrência de diferentes micro-organismos.

5.2.2. Enumeração microbiologia clássica

A Figura 5.10 apresenta as densidades das diferentes populações microbianas cultiváveis, e ainda seus respectivos valores percentuais nos biofilmes, monitorados no MN, nos pontos 1

e 2. Como anteriormente constatado, a exceção das BRS, as demais populações microbianas foram detectadas.

Em ambos os pontos, as bactérias heterotróficas aeróbias totais foram as predominantes, com números variando de 8,3 x 10^3 a 7,9 x 10^4 UFC/cm^2 no ponto 1 e 8,5 x 10^2 a 5,0 x 10^4 UFC/cm^2 no ponto 2. Logo, diferentemente do verificado no ensaio preliminar, a concentração celular foi semelhante independentemente da área investigada.

As bactérias heterotróficas anaeróbias apresentaram variação mais ampla, de 5,0 x 10^2 a 3,5 x 10^4 NMP/cm^2 e 8,0 x 10^1 a 2,8 x 10^3 NMP/cm^2, nos pontos 1 e 2, respectivamente. Mas, como as aeróbias, a sua densidade celular não sofreu influência da área de amostragem. Pode-se inferir ainda, que a maior parte das bactérias heterotróficas é facultativa.

As bactérias produtoras de ácido aeróbias se mantiveram na maioria das coletas entre 10^2 e 10^3 NMP/cm^2, em ambos os pontos de amostragem. Já as produtoras de ácido cultivadas em condição de anaerobiose apresentaram variação maior de 6,3 x 10^0 a 3,8 x 10^3 UFC/cm^2 no ponto 1 e de 5,0 x 10 a 2,8 x 10^3 NMP/cm^2, não obstante os valores máximos tenham sido similares aos dos cultivos incubados em aerobiose. Comportamento similar ao observado para as heterotróficas. Comparativamente, tem-se que grande parte das heterotróficas são produtoras de ácido.

Interessante notar que a presença das ferrobactérias nos biofilmes formados sobre as superfícies das paredes nem sempre foi possível de ser detectado nos dois pontos de amostragem. Salvo nestas ocasiões, suas enumerações se mantiveram próximas 10^3 e 10^2 UFC/cm^2, nos pontos 1 e 2, respectivamente.

Os fungos também tiveram comportamento diferenciado a depender do ponto de amostragem. No ponto 1, a densidade celular se manteve em 3 ordens de grandeza durante o período de monitoramento, enquanto no ponto 2, houve variação de 5,0 x 10 a 4,7 x 10^3 UFC/cm^2.

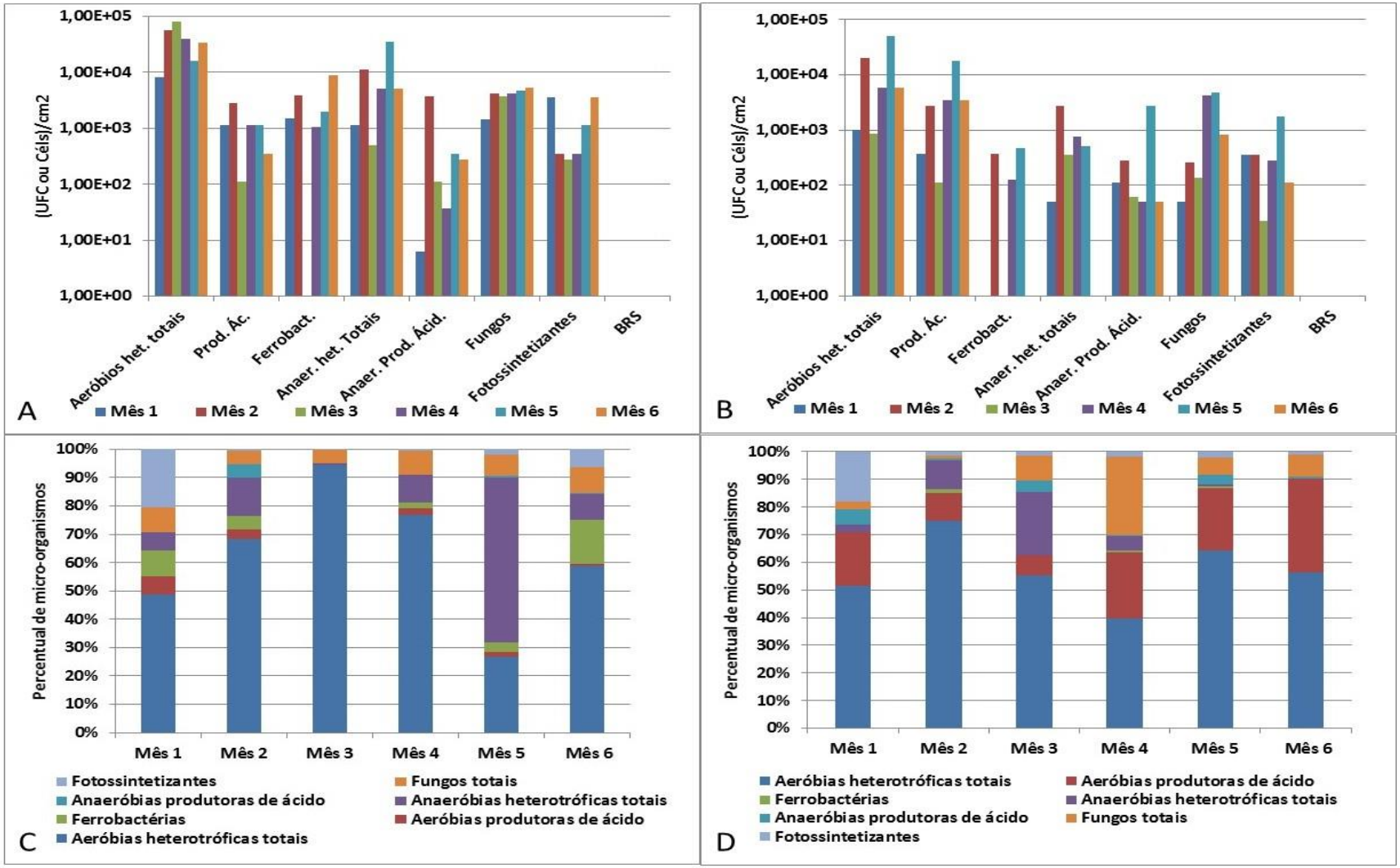


Figura 5.10. Quantificação dos micro-organismos no ponto 1 (A) e no ponto 2 (B) ao longo de 6 meses. Percentual de micro-organismos no ponto 1 (C) e no ponto 2 (D) ao longo de 6 meses.

Os micro-organismos fotossintetizantes apresentaram comportamento similar ao dos fungos em função do ponto de amostragem. Os valores máximos foram de 3 ordens de grandeza, embora maiores variações de número tenham sido observadas no ponto 2.

De um modo geral, as populações microbianas apresentaram maior número no ponto 1. A única exceção foi a população das bactérias produtoras de ácido cujo maior valor foi determinado no ponto 2. Em termos percentuais, as bactérias heterotróficas aeróbias totais foram as predominantes em ambos os pontos. Seguiram-se as bactérias heterotróficas anaeróbias totais no ponto 1, e as bactérias produtoras de ácido aeróbias no ponto 2, ainda que em alguns meses as heterotróficas anaeróbias totais tenham prevalecidos. Isto sugere que as bactérias produtoras de ácido correspondam a grande parte das heterotróficas quantificadas.

Os fungos apresentaram percentual variando entre 5 e 10%, no ponto 1. Já a participação dos fungos na comunidade microbiana no ponto 2 teve intensa variação no decorrer do monitoramento, variando de 2 a 30%.

Em geral, as ferrobactérias foram apenas detectadas no ponto 1, embora o percentual tenha variado mês a mês. No primeiro mês, representava 10% da comunidade microbiana. O percentual decresceu, sendo desprezível no terceiro mês. Depois voltou a aumentar, correspondendo a 15% da população microbiana total no sexto mês.

O monitoramento microbiológico também foi realizado na área externa do MAC, em dois sítios distintos, próximos, mas contemplando diferentes materiais. A Figura 5.11 apresenta a enumeração dos grupos microbianos e sua representação percentual nos pontos 3 (argamassa revestida de tinta) e 4 (aço carbono). Nestes locais, ao contrário do que se esperava não foi detectada a presença de micro-organismos fotossintetizantes. Por estar o MAC localizado na encosta da Baia de Guanabara e por se saber que esta água contém essas populações microbianas, era prevista a sua participação nos biofilmes ali presentes.

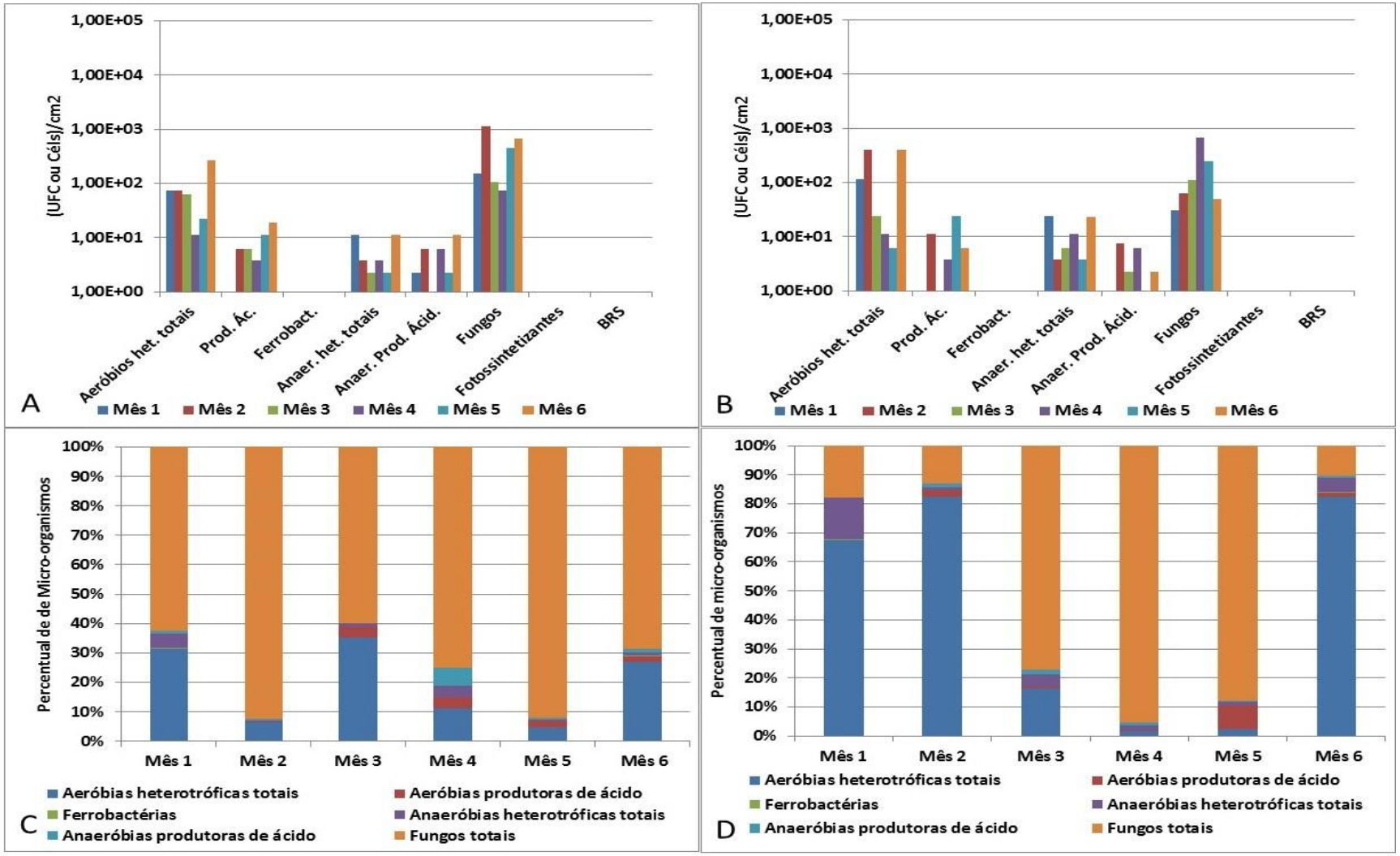


Figura 5.11. Enumeração dos micro-organismos no ponto 3 (A) e no ponto 4 (B) ao longo de 6 meses. Percentual de micro-organismos no ponto 3 (C) e no ponto 4 (D) ao longo de 6 meses.

As ferrobactérias, apesar de eventualmente detectadas, estavam em concentrações abaixo do limite de confiabilidade de detecção. E, mesmo assim, a presença só foi constatada no primeiro e no último mês, tanto no ponto 3 como no ponto 4.

No que tange o número de bactérias heterotróficas aeróbias totais, não houve variação expressiva nos biofilmes formados sobre os distintos materiais. Os valores mínimos foram 2,3 x 10 UFC/cm^2 e 7,0 x 10^0 UFC/cm^2 nos pontos 3 e 4, respectivamente; enquanto os valores máximos foram 2,7 x 10^2 UFC/cm^2 e 4,0 x 10^2 UFC/cm^2, respectivamente. A mesma população bacteriana cultivada em anaerobiose apresentou comportamento similar nos biofilmes analisados, sendo seus valores máximos uma ordem de grandeza inferiores nos dois pontos monitorados.

Neste caso, a população de bactérias produtoras de ácidos aeróbias também foi uma ordem de grandeza inferior ao das heterotróficas aeróbias totais, apresentando valores máximos no ponto 3 de 1,9 x 10 NMP/cm^2 e no ponto 4 de 2,4 x 10 NMP/cm^2. Ainda cabe destacar que em alguns meses não foram detectadas. Os resultados para as bactérias produtoras de ácido anaeróbias foram ainda menores, e como para as outras, o baixo número não permitiu a sua detecção em alguns meses.

No MAC, os fungos tiveram importante participação nos biofilmes, onde estavam presentes nas maiores concentrações: 7,5 x 10 a 1,1 x 10^3 UFC/cm^2 (ponto 3) e de 3,0 x 10 a 6,6 x 10^2 UFC/cm^2 (ponto 4).

Em termos percentuais, os fungos foram a população de maior predominância na comunidade microbiana aderida à parede e ao material metálico, variando de 60 a 95%. Muitos destes micro-organismos produzem ácidos orgânicos como produto final do metabolismo o que pode ter forte influência na biodeterioração dos mais diversos tipos de materiais. Em ordem de importância, seguiram-se as bactérias heterotróficas aeróbias totais, representando 5 a 35% das populações microbianas presentes nos biofilmes analisados, sendo que no quarto mês, as bactérias anaeróbias produtoras de ácido tiveram valores um pouco acima de 5%.

Considerando as análises microbiológicas realizadas nos dois museus pode-se inferir que, comparativamente, a maior diversidade e o maior número de populações microbianas relacionadas ao processo de deterioração no MN é indicativo que o ambiente úmido daquele

local é mais favorável a ocorrência do fenômeno. Porém, deve-se destacar que em ambos os casos, a coleta de amostra se deu tão somente na parte superficial dos materiais. E, se for analisada mais detalhadamente a imagem do teto do MAC, nota-se grande parte da área apresenta a parte interna da estrutura comprometida, o que pode ser devido à ação microbiana.

Enquanto efeitos de biodeterioração podem ser globais, sistemas microbianos interagem com seus ambientes em microescalas. Para ter explicações procura-se situações de interações entre as comunidades, que resultam em observar comportamentos padrões dentro da diversidade e da riqueza de fatores relevantes químicos, físicos e biológicos. Fungos e bactérias possuem papel importante na deterioração de materiais, a qual frequentemente está associada a disponibilidade de nutrientes e condições físicas que propiciem o crescimento dos micro-organismos. Quando o patrimônio cultural é atacado por micro-organismos, a persistência e a extinção de espécies de bactérias e/ou fungos colonizados nos objetos podem variar com o tempo e condições ambientais, variando fortemente a depender dos fatores físico-químicos bem como da competição entre as espécies (BUCKOVÁ *et al.*, 2014).

Em estudos realizados por Pepe *et al.* (2010) foram analisadas sete paredes de igrejas no sul da Itália (Campania), construídas nos séculos XIII ao XV, as quais continham áreas visualmente descoradas, com alterações de pontos destacados, patinas ou fluorescências. Com foco na microbiota heterotrófica, os pesquisadores observaram que, em geral, o nível de contaminação variou com a igreja e com o ponto de amostragem. As bactérias foram as predominantes e as que apresentaram maior densidade celular ($2,6 \times 10^2$ UFC/cm^2), seguidas dos fungos ($3,8 \times 10^1$ UFC/cm^2). Estes resultados se assemelham aos obtidos durante o monitoramento realizado no MAC. Provavelmente, se deva às condições meteorológicas do local (árido) por conta dos ventos frequentes e da intensa radiação solar.

Ainda, segundo Pepe *et al*. (2010), a grande variação da coloração das paredes pode ser explicada pela diversidade microbiana de cada local. Isto pode também explicar nossos resultados, tendo em vista a variação das populações microbianas nos biofilmes mês a mês. No caso do Museu Nacional, por mais próximos que os biofilmes estejam (5 subamostras por coleta dentro de 1 m^2), a parede é muito heterogênea e as condições dos arredores propiciam diferente colonização microbiana. Outra possibilidade, é a composição da parede, já que seu conteúdo diversificado de componentes orgânicos e inorgânicos pode apresentar diferentes nichos

ecológicos, levando ao estabelecimento de biofilmes variados. Por conseguinte, cada área estará sujeita a diferentes danos estéticos e estruturais.

O presente trabalho encontrou bactérias aeróbias e anaeróbias heterotróficas, porém não foram detectadas as BRS, contrariamente à Sarró *et al*. (2006) que detectaram BRS. Adicionalmente, os autores encontraram presença de 10^3 UFC/mL de bactérias heterotróficas aeróbias, entretanto a quantificação de anaeróbias sendo negativa, o material foi conduzido a filtração, utilizando a metodologia de microscopia de fluorescência e encontraram 10^5 micro-organismos/mL. Os autores justificam seus resultados são bactérias cultiváveis e como no caso de outros autores, alegam que 99% dos micro-organismos não são detectados por técnicas tradicionais de cultivo e que não foi realizada a abordagem de micro-organismos não cultiváveis.

5.2.3. Diversidade molecular total

Os resultados das dosagens de ácidos nucleicos são apresentados na Tabela 5.6. Note que o conteúdo de ácidos nucleicos, exceto para ponto 3 no mês 5, foram superiores a 2 ng/µL, valor que expressa a representatividade do DNA extraído, e indica a possibilidade de obter a amplificação do DNA dos micro-organismos por PCR.

Tabela 5.6. Dosagem de ácidos nucleicos do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea.

Mês	**Ácidos Nucleicos (ng/µL)**			
	Museu Nacional		Museu da Arte Contemporânea	
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
1	4,2	4,9	5,1	5,1
2	7,4	6,1	4,5	4,2
3	6,4	6,2	4,2	4,7
4	5,3	5,9	4,5	7,4
5	4,3	6,6	0,4	2,8
6	10,1	7,8	7,0	8,0

A dosagem dos ácidos nucléicos após a extração do DNA é importante garantir a qualidade do DNA resultante da PCR. Um excesso de DNA em uma amostra de PCR poderá saturar a reação, fazendo com que apareçam artefatos de técnica e amplificações inespecíficas que podem dificultar a análise. Já a ausência poderá acarretar na não amplificação das fitas de DNA (INTERNACIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS, 1992; BUTLER, 2005). Apesar do resultado impróprio do ponto 3/mês 5 do MAC, foi dado prosseguimento a sua análise molecular, posto que não pode ser confirmada sua inviabilidade.

Para cada PCR, após a amplificação, bem como após a purificação foram realizadas eletroforeses para aferir a ocorrência e qualidade das amplificações. Pelos resultados dos géis serem bastante similares só serão apresentados os géis após a etapa de purificação.

Para Bactéria e Eucarioto, as amplificações (PCRs) foram realizadas com sucesso, apresentando os seguintes pares de marcadores: 63F FAM e 1387R, EUK1 HEX e EUK 516R, respectivamente. A Figura 5.12A apresenta os resultados da eletroforese das amostras após os produtos da PCR serem purificadas OM1 até OM12, onde as letras OM (*Old Museum*) são referência ao Museu Nacional. As amostras OM1 a OM6 se referem ao ponto 1 do MN, sendo o número subsequente as letras OM indicativo do mês da coleta da amostra. Da mesma forma, as amostras OM7 a OM12 correspondem ao ponto 2 do MN, sendo os números referentes ao mês da amostragem, onde 7 se refere ao primeiro mês e 12 ao sexto mês.

A Figura 5.12B apresenta os resultados do Museu de Arte Contemporânea, sendo as amostras referendadas pelas letras NM (New Museum). As amostras NM1 a NM6 correspondem ao ponto 3, sendo 1 a 6 referente ao mês da coleta da amostra. As amostras NM7 a NM12 se referem ao ponto 4, os numeros 7 e 12 correspondendo ao primeiro e sexto mês, respectivamente. Para as amostras do MAC, à amplificação foi um pouco mais fraca em algumas análises, porém de forma presente.

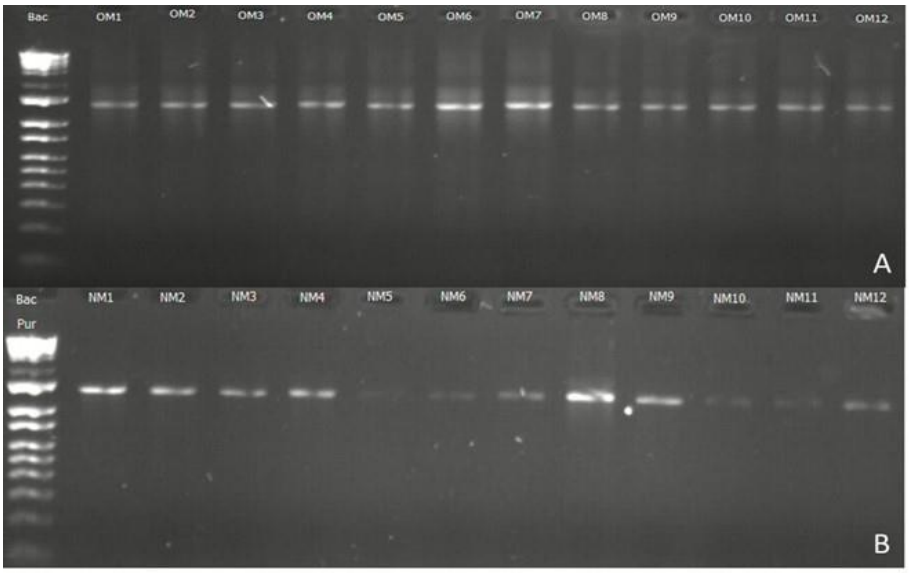


Figura 5.12. Eletroforese da amplificação de DNA 16S rRNA purificada de PCR de Bactéria das amostras do Museu Nacional (A) e do Museu de Arte Contemporânea (B).

As figuras 5.13A e 5.13B apresentam o resultado da eletroforese da amplificação dos Eucariotos no MN e no MAC, respectivamente. A nomenclatura segue a mesma lógica que a anterior. Em todos os casos foi bem sucedida.

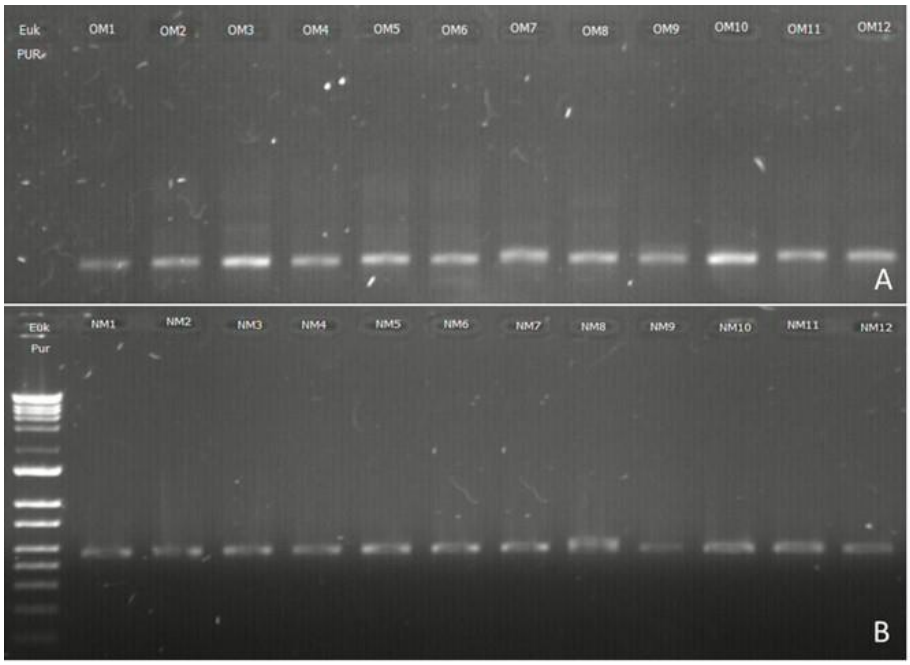


Figura 5.13. Eletroforese da amplificação de DNA 18S rRNA purificada de Eucarioto das amostras do Museu Nacional (A) e do Museu de Arte Contemporânea (B).

Para os testes com Archaea, foram utilizados diversos pares de marcadores, ainda assim não foi encontrada a banda representando a amplificação nas amostras do ponto 4 do Museu de Arte Contemporânea (NM7 a NM12) e da amostra do Museu Nacional do ponto 1 no primeiro mês (OM1). As análises que apresentaram as melhores respostas foram obtidas com os marcadores 21F FAM e 958R, mas, ainda assim, a maioria dos resultados apresentaram baixa concentração (Figura 5.14). Após a purificação foi realizada a digestão enzimática, sendo selecionadas as enzimas Alu1 e Rsa1 para o grupo Bacteria e Archaea, e as enzimas Alu1 e Hae III para o grupo Eucarioto. Após a digestão, são realizadas as análises de T-RFLP.

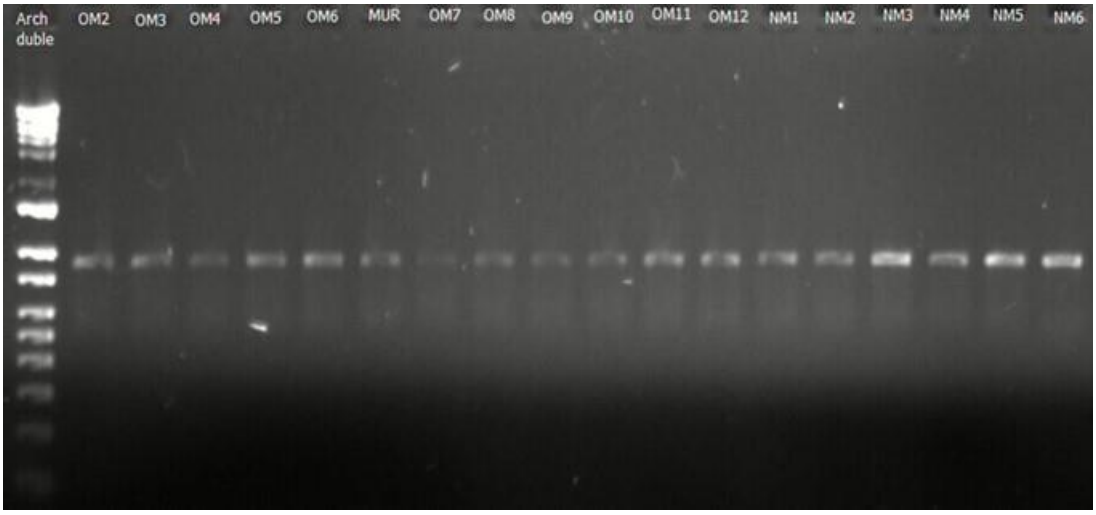


Figura 5.14. Eletroforese da amplificação de DNA 16S rRNA purificada das amostras do Museu Nacional e do Museu de Arte Contemporânea

A Figura 5.15 apresenta os resultados da T-RFLP do Museu Nacional e do Museu de Arte Contemporânea, que demonstra a similaridade das comunidades bacterianas. De acordo com os resultados da T-RFLP pode-se afirmar que as bactérias dos dois pontos do Museu Nacional apresentam uma comunidade bacteriana com similaridade de 55,86% entre os diferentes pontos (1 e 2), já entre os mesmos pontos os valores foram de 61,41% (ponto 1) e 54,12% (ponto 2).

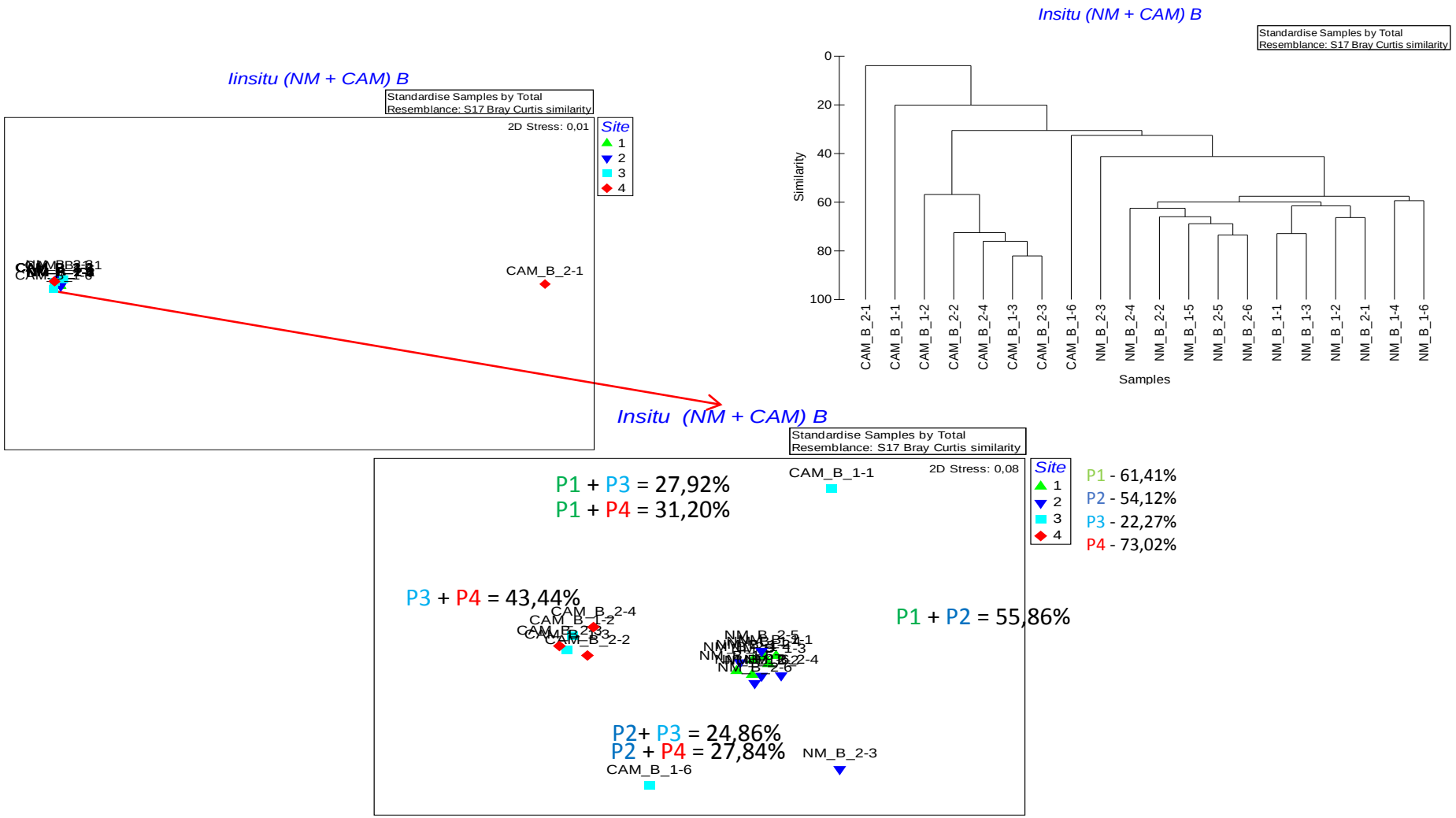


Figura 5.15. *NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e* dendrograma das comunidades de bactéria do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea. P1 – Ponto 1, P2 – Ponto 2, P3 – Ponto 3 e P4 – Ponto 4. P1 + P2 – Percentual de Similaridade entre as comunidades dos Pontos 1 e 2. NM – National Museum. CAM - Contemporary Art Museum.

Em alguns casos as amostras tem mais semelhanças entre os distintos pontos, que comparados ao mesmo ponto, assim pode-se assumir que os pontos do mesmo sítio podem ser considerados replicatas. A similaridade de algumas amostras apresentam aproximadamente 80%, em contrapartida a comunidade bacteriana do ponto 2.3 (ponto 2 do Museu Nacional, mês 3) apresentou menor similaridade, aproximadamente de 40% com relação as outras amostras. Neste período de estudo, que vem do decorrer das estações de outono, inverno e início da primavera, com comportamento atípico, sem muita amplitude, principalmente com relação a temperatura, as comunidades não convergem para um comportamento com o passar do tempo. Em alguns casos as comunidades em meses distantes são mais parecidas que em meses em sequência. Por exemplo as comunidades do ponto 2, apresentam menor similaridade entre os meses 1 e 2, do que entre os meses 2 e 4

Para algumas amostras do Museu de Arte Contemporânea não foi encontrada a presença de bactéria pela metodologia utilizada. Isto ocorreu para as amostras do ponto 3, meses 4 (NM4) e 5 (NM5) e para o ponto 4 nos meses 5 (NM11) e 6 (NM12). Os resultados para bactéria do MAC foram de baixa similaridade, sendo de 22,27% para ponto 3 e 36,88% para o ponto 4, e à similaridade total de 33,33%.

Novamente, as comunidades não apresentaram uma evolução com o tempo, sem convergência da comunidade bacteriana. Também os pontos 3 e 4 podem ser considerados como replicatas, uma vez que existem mais semelhanças entre comunidades destes diferentes pontos do que para o mesmo ponto. Por exemplo, as amostras do ponto 3 e 4 do mês são as mais similares. Foi observada a maior semelhança entre as amostras do Museu Nacional comparado ao Museu de Arte contemporânea, 55,86% e 43,44% respectivamente. Comparativamente, as similaridades entre os diferentes pontos dos museus estão em torno de 30% (27,22%; 31,20%, 24,86% e 27,84%).

Para as análises da plataforma MiSeq (Figura 5.16) foram selecionadas 3 amostras do museu Nacional do Rio de Janeiro, com intuito de verificar os principais grupos microbianos causadores da biodeterioração. As amostras do MN foram o mês 2 e 5 do ponto 1 (OM2 e OM5) e o mês 5 do ponto 2 (OM10). Para MAC foram o mês 2 e 6 do ponto 3 e o mês 3 do ponto 4. Dentre os grupos, principalmente Alphaproteobactérias, Acidobactérias, Cianobactérias e Actinobactérias, foram encontradas no MN, sendo as amostras muito diversificadas.

Esses quatro grupos microbianos são comumente encontrados em todos ambientes. As proteobactérias constituem o maior filo, que compreende bactérias Gram-negativas metabolicamente diversas, compreendendo diferentes vias de produção de energia. Fisiologicamente, distinguem-se em relação as fontes de energia e carbono em quimiorganotróficos, quimiolitotrófico e fototróficos, e quanto a tensão de oxigênio em aeróbias, aeróbias facultativas, microaerófilas e anaeróbias (MADIGAN *et al*., 2010).

As cianobactérias compreendem um grande grupo de organismos fototróficos oxigênicos, algumas apresentando a forma unicelular, outras a forma filamentosa, e ainda variações entre esses tipos morfológicos. Em especial, as cianobactérias têm somente a clorofila a, e todas apresentam ficocianinas, que atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese. A coloração azul destas ficobilinas em conjunto com a clorofila a (verde), é responsável pela coloração verde-azulada desse grupo. No entanto, algumas cianobactérias produzem ficoeritrina, uma ficobilina rubra, o que confere a estas espécies a coloração avermelhada ou marrom (TORTORA *et al*., 2016).

Dentre as acidobactérias, três foram caracterizadas em detalhes, *Acidobacterium capsulatum*, *Geothrix fermentans* e *Holophaga foetida*, todas Gram-negativas e quimiorganotróficas. *A. capsulatum* é uma bactéria aeróbia, capaz de metabolizar vários açúcares e ácidos orgânicos. *G. fermentans*, anaeróbio estrito, oxida ácidos orgânicos simples (acetato, propionato, lactato e fumarato) a CO_2 utilizando Fe^{+3} como aceptor de elétrons, e ainda é capaz de fermentar citrato e acetato. *H. foetida*, também é uma bactéria anaeróbia estrita, capaz de degradar compostos aromáticos metilados e acetilados. São conhecidas outras acidobactérias, mas a maioria não foi cultivada, apenas sequenciadas (MADIGAN *et al*., 2010).

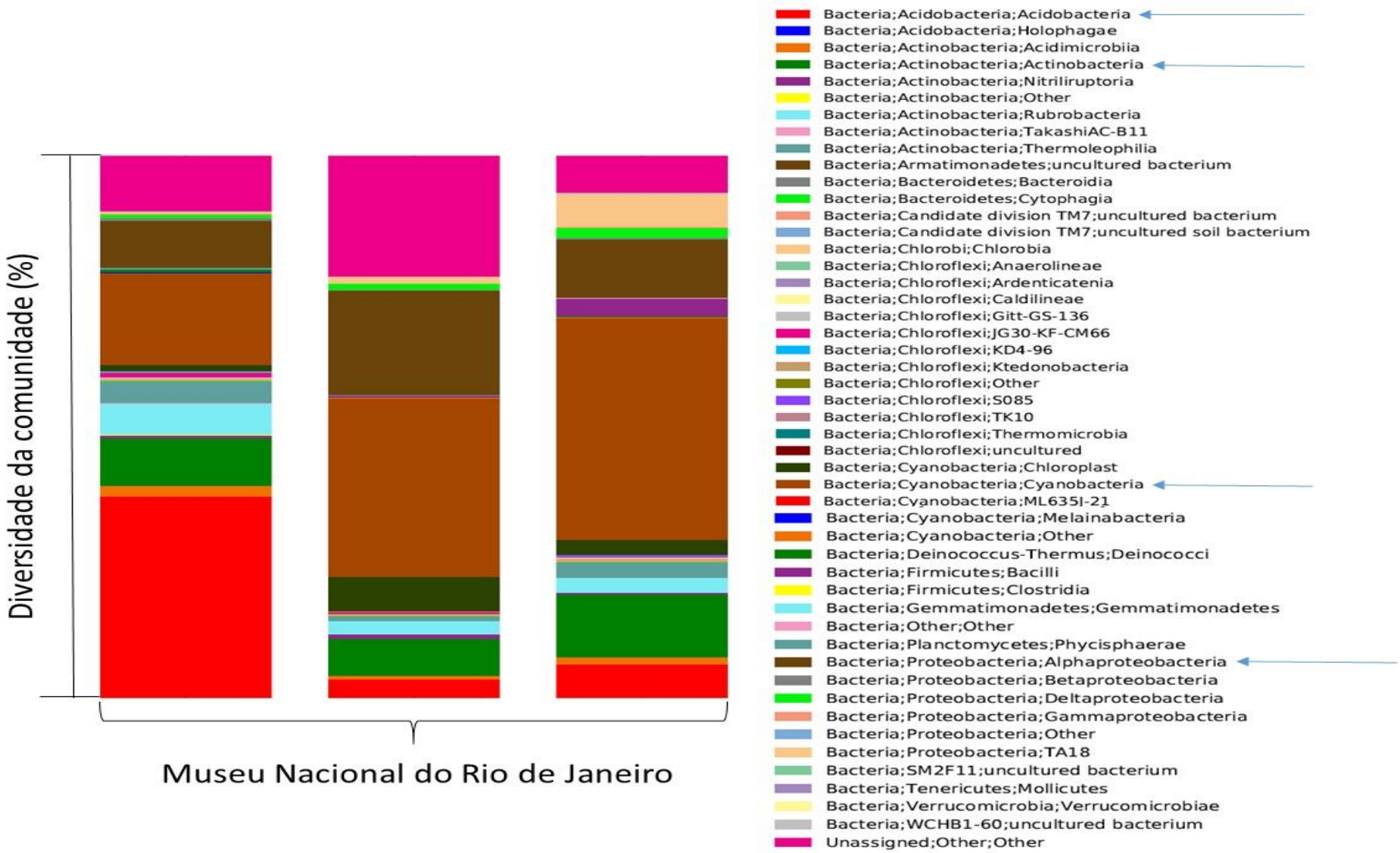


Figura 5.16. Diversidade da comunidade Bacteriana das amostras do Museu Nacional do Rio de Janeiro.

As actinobactérias são predominantemente aeróbias e sua morfologia varia de bacilar a filamentosa. Dentre os principais gêneros encontram-se *Corynebacterium, Arthrobacter, Propionibacterium, Mycobacterium, Streptomyces* e *Actinomyces*. Em especial, bactérias do gênero Arthrobacter são altamente resistentes a dessecação, carência nutricional, sendo um grupo heterogêneo com considerável versatilidade nutricional, capazes de degradar moléculas orgânicas complexas ou recalcitrantes, tais como fenóis (MADIGAN *et al*., 2010).

Para Bucková *et al.* (2014), os principais filos relacionados a biodeterioração de patrimônios históricos são Proteobacterias, Firmicutes e Actnobacteria. Os autores encontraram percentual de 76% de protobactérias e 24 % de firmicutes (negativos de filmes), e sobre cartões de arquivos, sendo novamente predominantes por Proteobacterias (58%), Firmicutes (5%) e Actnobactérias (25%). Corroborando o presente trabalho, com participação importante de Protobactérias e Actinobactéria, entretanto diferenciado pela presença de Cianobactérias e Acidobactérias. Tal diferença se deve principalmente pelas condições ambientais e atmosféricas que influenciam os micro-organismo, bem como os diferentes substratos.

Nos testes para amplificação para bactérias no MAC (Ver seção 4.3.1), ao realizar a eletroforese foi encontrado resultado negativo, logo não foi possível aplicar a tecnologia MiSeq para este grupo de amostras.

A Figura 5.17 apresenta os resultados da T-RFLP para o MN e o MAC, demonstrando a similaridade das comunidades eucariotas. Duas amostras não foram detectadas (amostras do MAC do ponto 4, do mês 1 e do mês 4). Para a comunidade eucariota, houve similaridade entre os pontos 3 e 4 do MAC, 61,86% e 53,63%, respectivamente. No entanto, as amostras do MN apresentaram baixa similaridade: 29,13% (ponto 1) e 22,91% (ponto 2). Com isso a similaridade para MN foi menor a do MAC, apresentando valores de 18,97% e 46,08%.

Novamente os pontos de cada museu podem ser considerados uma replicata do outro, pois algumas amostras apresentam similaridade mais próxima entre as comunidades dos diferentes pontos do que quando comparadas as amostras do mesmo ponto. Adicionalmente, sítios diferentes apresentaram similaridades em torno de 10% (10,19%, 11,37%, 9,46% e 9,74%) e não houve convergência das comunidades eucariotas com o tempo.

Para o resultado dos Eucariotos pela plataforma MiSeq (Figura 5.18), pode ser observada uma predominância de dois grupos para o Museu Nacional, em maior abundância Archaeplastida; Cloroplastida (verde) e Opisthokonta; outras (rosa), e mais alguns grupos também são encontrados em menor quantidade, Opisthokonta, Holozoa (amarelo); Opisthokonta, Nucletmycea (cinza); SAR, Alveolata (marrom). Para o Museu Arte Contemporânea, os eucariotos predominantes foram Opisthokonta, Nucletmycea (cinza), seguidos de Archeoplastida, Cloroplastida (verde), SAR, Alveolata (marrom), Opisthokonta, Holozoa (amarelo). Em suma, os dois museus apresentaram grupos de eucariotos bem semelhantes, porém em diferentes proporcionalidades.

O super grupo Opsthokonta contem animais (Metazoa) e fungos, bem como várias linhas de protistas heterotróficos. O grupo Archeoplastida é composto por 3 principais linhagens de fotossintéticas que contêm plastídios derivados de cianobactérias: (i) as glaucophytes são pequenos grupos de micro algas de água doce, plastídios exclusivamente como cianobactérias (eles podem reter a camada procariota de peptídeo glicano entre as membranas plastídias. (ii) a alga vermelha originária de diversos grupos algas unicelulares e grandes algas marinhas, (iii) Os organismos verdes, incluindo as algas verdes, na sua maioria unicelular de vida livre, parasitas não fotossintetizantes (por exemplo, Prototheca, Helicosporidum) e plantas (musgos, samambaias e angiospermas. O grupo SAR é existente exclusivamente pelas técnicas biomoleculares, seu nome é devido aos seus constituintes: stramenopolis, alveololates e Rhizaria (BURKI, 2014).

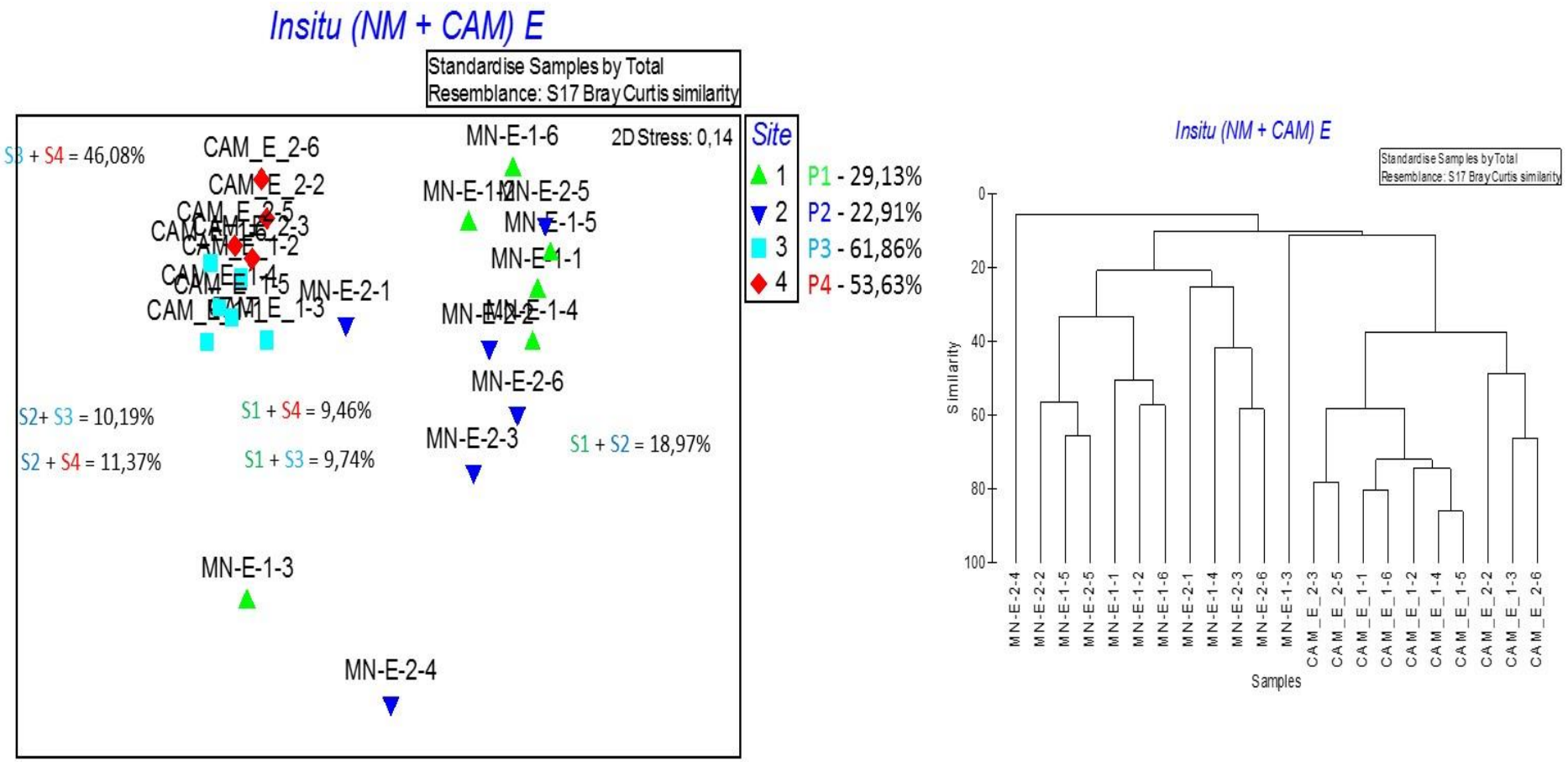


Figura 5.17. *NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e* dendrograma das comunidades eucariotas do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea. P1 – Ponto 1, P2 – Ponto 2, P3 – Ponto 3 e P4 – Ponto 4. P1 + P2 – Percentual de Similaridade entre as comunidades dos Pontos 1 e 2. NM – National Museum. CAM – Contemporary Art Museum.

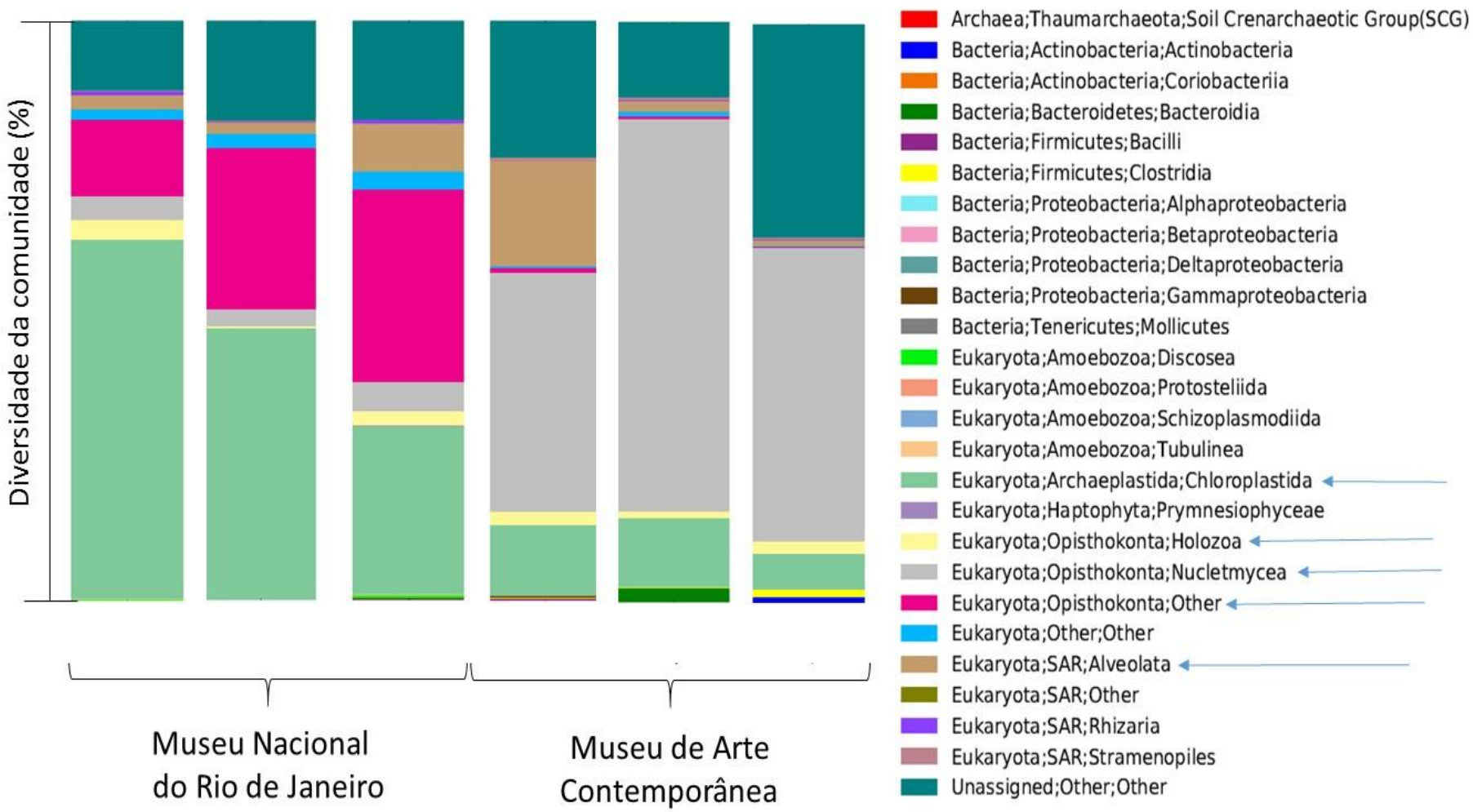


Figura 5.18. Diversidade da comunidade Eucariota das amostras do Museu Nacional do Rio de Janeiro e do Museu de Arte Contemporânea.

Em sua pesquisa Piñar *et al*. (2013) encontraram uma baixa diversidade de fungos comparado as bactérias, os fungos foram dominantes do filo Ascomycota, principalmente do gênero *Cladosporium*. Adicionalmente a superfície foi caracterizada por MEV e foi possível observar pites, que foram provocados por micro-organismos filamentosos, que provavelmente os responsáveis foram os fungos. Segundo os autores parte das bactérias encontradas foram espécies com habilidade de precipitar minerais, tais como *Delftia* sp., *Methylobacterium* sp., *Variovorax* sp., *Arthrobacter* sp., *Kocuria* sp e *Micrococcus* sp., bem como bacteriodetes, o qual pode explicar a presença de precipitação de minerais sobre a superfície. Além disso, algumas bactérias podem pigmentar laranja-rosa-vermelho tais como *Methylobacterium* sp., *Arthrobacter* sp. *Kocuria* sp e *Micrococcus* sp. Esses micro-organismos são pertencentes aos filos Alpha-protobacteria (*Methylobacterium* sp.), Beta-protobactéria (*Delftia* sp., *Variovorax* sp.), Actinobactéria (*Arthrobacter* sp., *Kocuria* sp. *Micrococcus* sp.). Parte destes filos são encontrados predominantemente no presente trabalho.

Para os ensaios com Archaea os resultados da T-RFLP foram negativos, apesar dos testes positivos na eletroforese, quando realizada a leitura pela T-RFLP o resultado foi negativo, consequentemente para o MiSeq não foram realizados os testes (Pré-requisito adotado pelo grupo *Melody-UPPA*). Ademais, os estudos de biodeterioração em patrimônios históricos são comumente realizados a partir de micro-organismos cultiváveis, ou seja, ocorre o isolamento e em seguida sua identificação. Desta forma o presente trabalho tem poucas referências para realizar comparação, e como neste último caso (Filmes e arquivos, e DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), substratos e técnicas diferentes.

5.3. ENSAIOS DE BIODETERIORAÇÃO EM CORPOS DE PROVA DE ARGAMASSA

5.3.1. Caracterização dos corpos de prova, do consórcio microbiano empregado e das condições climáticas

Este estudo teve como finalidade obter dados para melhor entendimento da participação de micro-organismos na deterioração de construções de argamassa e, deste modo, buscar estratégias para sua preservação. Neste caso, foi testada pintura como forma de preservação.

Quando as paredes estão expostas ao ambiente, os micro-organismos podem aderir sobre as superfícies, por mediação de chuvas e ventos, que adicionalmente trazem consigo partículas

de origem vegetal, animal, minerais e poluentes do ar. Uma vez sobre superfícies sólidas, os micro-organismos nelas aderem, pela secreção de EPS, e se desenvolvem, levando à formação de biofilmes. As velocidades de crescimento dos micro-organismos em biofilme variam, a depender da natureza do material/revestimento e disponibilidade de nutrientes, bem como das condições ambientais. Condições hidrotérmicas são particularmente importantes; em geral, alta umidade (80%) e temperatura ao redor de 30ºC são favoráveis ao crescimento (GAYLARDE *et al.*, 2011; PERCIVAL *et al.*, 2011; COSTERTON *et al.*, 1994; CHARACKLIS; MCFETERS; MARSHALL, 1990).

No caso da parede estar recoberta com tinta, os constituintes nela presentes podem afetar o desenvolvimento dos micro-organismos, quer inibindo quer estimulando o seu metabolismo. Alguns polímeros que são utilizados na composição de tintas, podem atuar como nutrientes para células de fungos, enquanto solventes orgânicos e metais pesados em pigmentos podem adversamente afetá-los (MELLO; SUAREZ, 2012; GAYLARDE *et al.*, 2011).

Para a execução dos testes em laboratório, foram preparados corpos de prova, buscando-se obter composição similar à parede do Museu Nacional. Para tanto, amostras do material da parede foram caracterizadas por Fluorescência de Raio-X (FRX). Os resultados da análise FRX do material da parede do MN e dos corpos de prova confeccionados são mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Análise de FRX demonstrando a composição (%) das paredes e do corpo de prova

	Na_2O	MgO	Al_2O_3	SiO_2	P_2O_5	SO_3	K_2O	CaO	TiO_2	Fe_2O_3	PPC
P1*1	0,3	0,5	3,9	60,8	0,4	1,3	0,7	17,6	0,2	0,6	13,4
P2*2	ND	0,6	4,2	60,4	0,2	1,7	0,8	18,8	0,1	0,6	12,1
CP*3	0,6	1,9	11,2	53,6	0,1	1,5	1,2	21,5	0,4	1,6	6,2

*1Parede do Museu Nacional (ponto 1); *2Parede do MN (ponto 2); *3Corpo de prova; perda por calcinação; ND: não detectado.

A composição das paredes em dois pontos distintos foram similares ao corpo de prova confeccionado. Houve também variação quanto a perda por calcinação, 13,4% e 12,1% nos pontos 1 e 2 das paredes, respectivamente, enquanto a perda do CP foi de 6,2%. Isto se deve a presença de matéria orgânica na tinta usada no recobrimento da parede e micro-organismos

aderidos, resíduos de plantas, partículas de solo e outros materiais presentes nos biofilmes, trazidos pelo vento e pela chuva, inclusive polissacarídeos produzidos pelo metabolismo microbiano que dão origem a matriz do próprio biofilme.

Segundo Nuhoglu *et al.* (2006) elementos como Ca, K, Mg, Zn, S, Mn, Na e Fe contribuem para o desenvolvimento de micro-organismos, e a grande maioria desses elementos existem em superfície de monumentos históricos. Os micro-organismos se desenvolvem naturalmente sobre os monumentos históricos, formando comunidades complexas (biofilmes), onde pode se estabelecer interações tanto sinérgicas quanto antagônicas entre as espécies de diferentes grupos microbianos envolvidos. Deste modo, é importante que os ensaios laboratoriais sejam conduzidos com consórcios microbianos, uma vez que o emprego de uma única espécie não irá reproduzir as condições normais que ocorrem na natureza (MILLER, *et al*., 2012)

No presente estudo, nos testes realizados na presença de micro-organismos, o consórcio microbiano empregado foi oriundo da amostragem feita no MN, em face da grande diversidade microbiana e do maior número das diferentes populações microbianas em comparação ao encontrado no MAC. A análise quantitativa do consorcio microbiano, obtido a partir da mistura de diferentes cultivos de amostra da parede do MN em meios específicos para cada população microbiana (bactérias aeróbias totais, ferrobactérias, bactérias anaeróbias totais, fungos e micro-organismos fotossintetizantes), que serviu como inoculo no ensaio, é apresentada na figura 5.19.

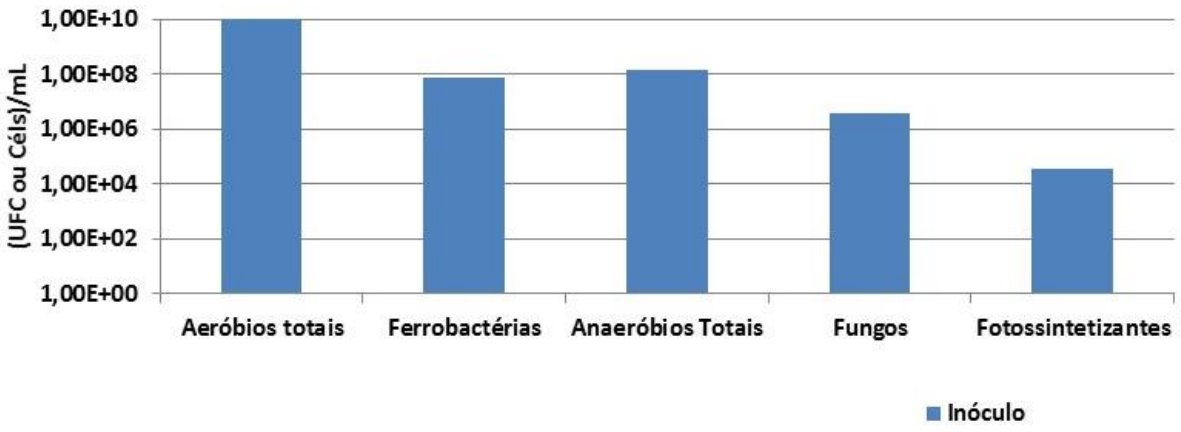


Figura 5.19. Caracterização do consórcio microbiano empregado.

O ensaio foi realizado em sala aclimatada, mesmo assim foi realizado o monitoramento da umidade e temperatura, considerando a iluminação do sistema e a aspersão de água buscando simular a exposição dos corpos de prova a chuva ou a chuva ácida, como ocorre com os materiais quando expostos ao ar livre. A Figura 5.20 mostra a variação de umidade e temperatura no interior do aparato experimental, onde os corpos de prova foram dispostos, durante o período ensaiado.

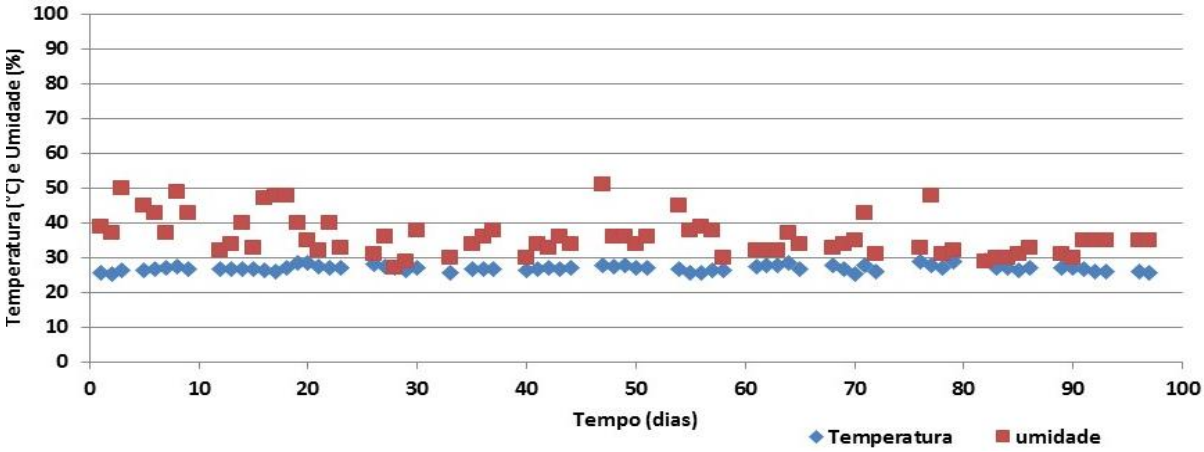


Figura 5.20. Perfil da umidade e da temperatura no interior do aparato experimental ao longo do ensaio.

A umidade apresentou pouca variação ao longo tempo entre 30-50%. No entanto, o perfil da temperatura foi mais constante, com picos máximos e mínimos de 29,2ºC e 25,7ºC, sendo a temperatura média de 27,4ºC. Adicionalmente o aparato foi frequentemente umedecido para auxiliar a manter um alto teor de umidade na superfície. Portanto, as condições atmosféricas no sistema montado se enquadravam nas faixas definidas para o desenvolvimento microbiano.

5.3.2. Enumeração por biologia clássica

Na Figura 5.21A foram compiladas as densidades celulares das diferentes populações microbianas nas quatro condições ensaiadas: CP + névoa (Condição 5); CP/pintura + névoa (Condição 6); CP + névoa ácida (Condição 7); CP/pintura + névoa ácida (Condição 8). Para fins comparativos, também é apresentado um gráfico contendo os percentuais das populações microbianas caso a caso. Os resultados correspondem a biofilmes de 100 dias.

Nota-se ainda que a colonização microbiana foi mais intensa nos CPs não revestidos em relação aos cobertos com tinta. Nos CPs expostos à névoa ácida, não houve diferenciação expressiva de algumas populações microbianas em função da presença ou não de revestimento.

Adicionalmente, a chuva ácida parece ter favorecido o desenvolvimento microbiano sobre os CPs, sobretudo os revestidos (Condições. 6 e 8). Em todas as condições ensaiadas, as bactérias heterotróficas foram as dominantes, sendo as aeróbias ligeiramente prevalentes sobre as anaeróbias. A pouca variação entre estas populações sugere a presença de bactérias facultativas, corroborando os resultados anteriores (Figuras 5.10 e 5.11).

Os números de bactérias heterotróficas aeróbias e produtoras de ácido aeróbias nos biofilmes foram similares em todas as condições, com valores em torno de 10^2 células/cm^2. Porém, as bactérias produtoras de ácido anaeróbias estavam em maior número, cerca de 2 ordens de grandeza, quando expostos a névoa (Condição 5) e névoa ácida (Condição 7). Já para os CPs cobertos com tinta, foi observada uma intensa redução desta população (Condições 6 e 8), independentemente da atmosfera (névoa ou névoa ácida).

Por outro lado, a pintura teve efeito ligeiramente adverso no desenvolvimento das ferrobactérias nos biofilmes expostos a névoa (Condições 5 e 6) e névoa ácida (Condições 7 e 8). Já a névoa ácida teve efeito positivo no crescimento das ferrobactérias, principalmente nas condições em dos CPs revestidos (condições 6 e 8). Os maiores crescimentos foram observados similares nas condições 5, 7 e 8, cerca de 5 ordens de grandeza.

Comportamento parecido foi observado para os fungos, embora o seu maior desenvolvimento tenha sido constatado na condição 5, de 1,6 x 10^6 UFC/cm^2. Densidade um pouco menor foi determinada nos biofilmes das condições 7 e 8, enquanto na condição 6 tenha sido evidenciado o menor valor 1,9 x 10^3 UFC/cm^2. Em suma, desenvolvimento decrescente foi observado para estes eucariotos na seguinte ordem: CP + névoa (condição 5) > CP + névoa ácida (condição 7) > CP/tinta + névoa ácida (condição 8) > CP/tinta + névoa (condição 6). Portanto, pode-se concluir que a tinta assegura a atividade dos fungos quando expostos a névoa ácida, ao contrário do que ocorre quando os biofilmes estão expostos à névoa.

Com relação aos fotossintetizantes, o seu desenvolvimento nos CPs com revestimento foi nulo (condição 6) ou quase nulo (3,1 cels/cm^2, condição 8), independente da condição atmosférica. Mas, os CPs sem revestimento de tinta favoreceram o crescimento desta população, em especial quando expostos a névoa ácida seu desenvolvimento é ligeiramente maior.

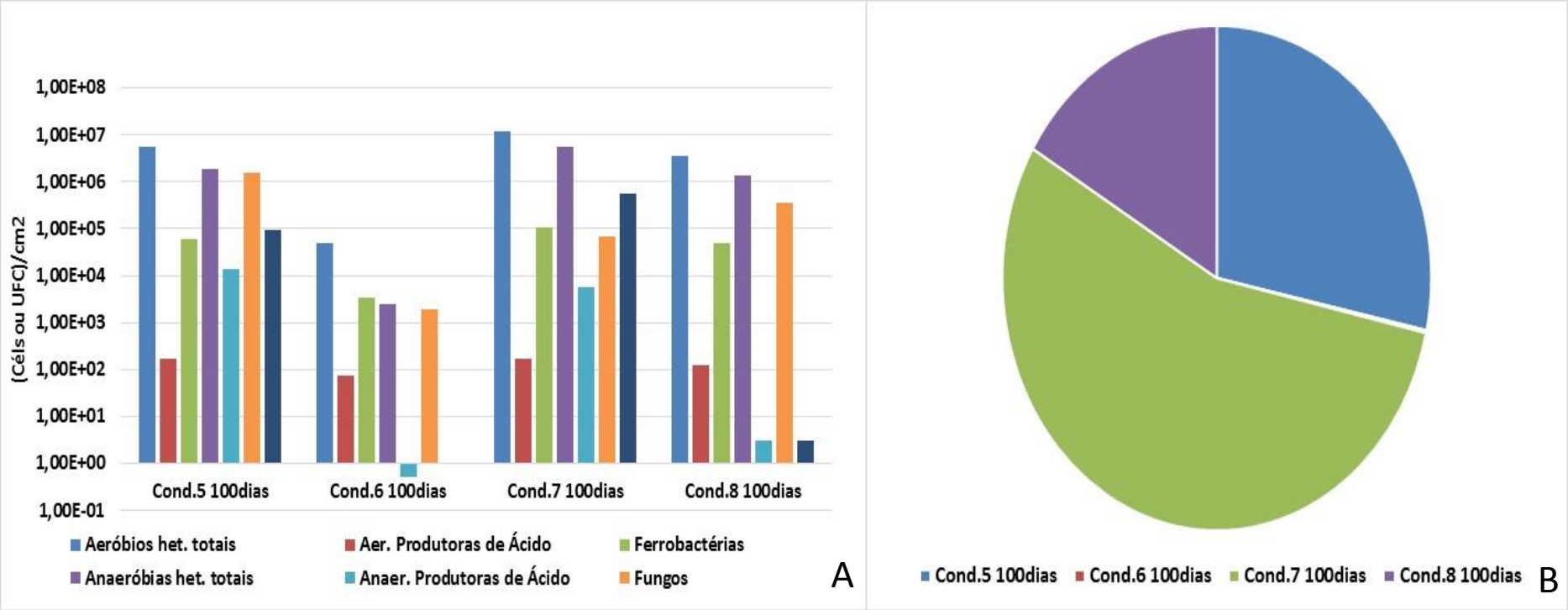


Figura 5.21. (A) Enumeração dos micro-organismos nos experimentos dos corpos de prova em condições de sem pintura + névoa (condição 5), com pintura + névoa (condição 6), sem pintura + névoa ácida (condição 7) e com pintura + névoa ácida (condição.8). (B) Percentual total de micro-organismos enumerados nas 4 condições. Condição 6 teve valor menor que 1%, por isso parece não está presente no gráfico B.

Em geral, o crescimento dos micro-organismos foi maior nos biofilmes formados sobre o CP com tinta exposto a névoa ácida (condição 7), equivalente a 55%, praticamente o dobro da condição 5 (CP + névoa), que foi de 28% (Figura 5.21B). Possivelmente, a névoa ácida leva a maior produção de exopolissacarídeos como forma de proteção, o que contribui para o desenvolvimento das espécies microbianas presentes. Comparativamente, o CP revestido com tinta exposto a névoa foi o que apresentou biofilme com menor densidade celular, correspondendo a valores menores que 1%. Porém, apesar disso, a densidade de mais de quase 10^5 células/cm^2 representa um grande potencial para a biodeterioração. Note que este foi o valor encontrado nas paredes do Jardim da Princesa, que se encontrava em estado avançado de deterioração.

Os experimentos apresentaram crescimento microbiano dentro do esperado, ou seja, maior crescimento sobre os corpos de prova com maior porosidade (CP sem revestimento), e também em consonância com nível de umidade (cond. 7 > cond. 5 e cond. 8 > cond. 6). Grande responsável pela redução da quantidade de micro-organismos se deve a presença do revestimento, uma vez que dificulta a adsorção dos micro-organismos a superfície, ou seja, dificulta a bioreceptibilidade, e sua composição que contêm dióxido de titânio e piritionato de zinco (além de amônio-solução aquosa, etano1,2-diol e Kaolin) utilizados como bactericida e fungicida.

5.3.3. Análise molecular dos biofilmes por T-RFLP e MiSeq

A Tabela 5.8 apresenta a dosagem da extração de DNA, verifica-se que os CPs sem revestimento, tanto aqueles expostos a névoa quanto os expostos a névoa ácida, apresentaram um excelente resultado, indicando boa qualidade de extração do DNA, bem como maior concentração de micro-organismos. Para os CPs revestidos, mesmo os valores sendo abaixo do indicado (2 ng/µL), foi dada continuidade aos experimentos de amplificação.

Tabela 5.8. Dosagem dos ácidos nucleicos do DNA extraído dos biofilmes formados sobre os corpos de prova ensaiados

Ensaio	**Ácidos Nucleicos (ng/µL)**		
CP + névoa	12,0	10,7	16,2
CP/tinta + névoa	1,0	0,7	1,0
CP + névoa ácida	3,2	9,1	10,9
CP/tinta + névoa ácida	0,0	1,8	1,8

As análises foram conduzidas para a amplificação de bactérias e eucariotos (Seção 4.3.1), uma vez que os micro-organismos são de consórcios provenientes do MN e foram obtidos de meios de cultivos para crescimento de populações específicas, não foi realizada amplificação de Archaea (Item 5.2.3 foi negativo para Archaea). Em seguida foi feita a purificação dos produtos da PCR. Entre as etapas, foram realizadas eletroforeses, porém devido à similaridade dos resultados, são apresentadas a seguir (Figura 5.22) somente a eletroforese dos produtos purificados. Os experimentos estão numerados de 1 a 12, sendo divididas em 4 grupos, de 1 a 3 (CP + névoa), 4 a 6 (CP/tinta + névoa), 7 a 9 (CP + névoa ácida) e 10 a 12 (CP/tinta + névoa ácida).

Os resultados foram bem sucedidos, com exceção da amostra 7, que apresentou dupla banda, isso provavelmente foi uma duplicidade gênica (podem amplificar igualmente, mas migram diferente no gel aparecendo duas bandas). Foram realizados outros testes com marcadores diferentes mas ainda assim apareceu a dupla banda. Foi dada continuação para a fase de digestão em todas as amostras

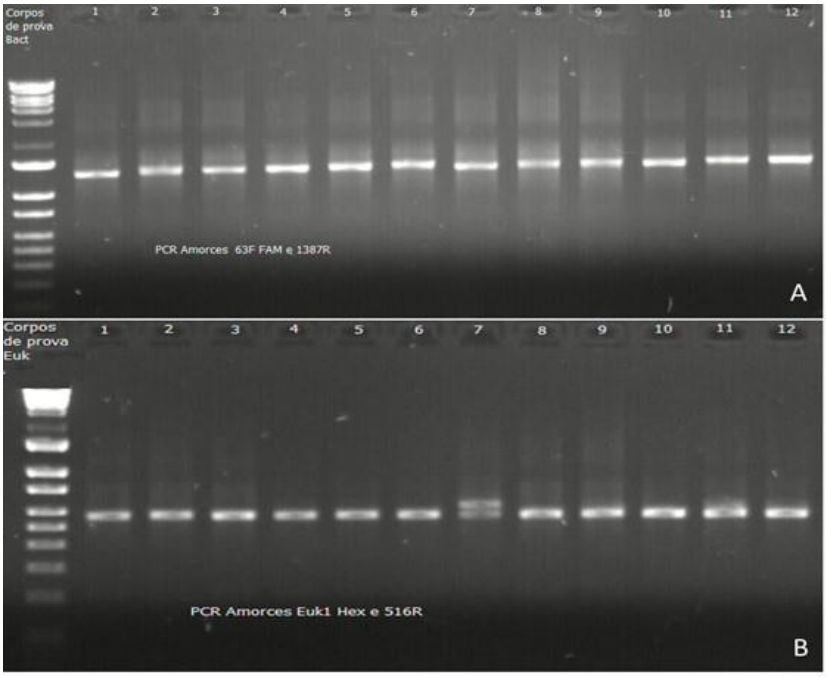


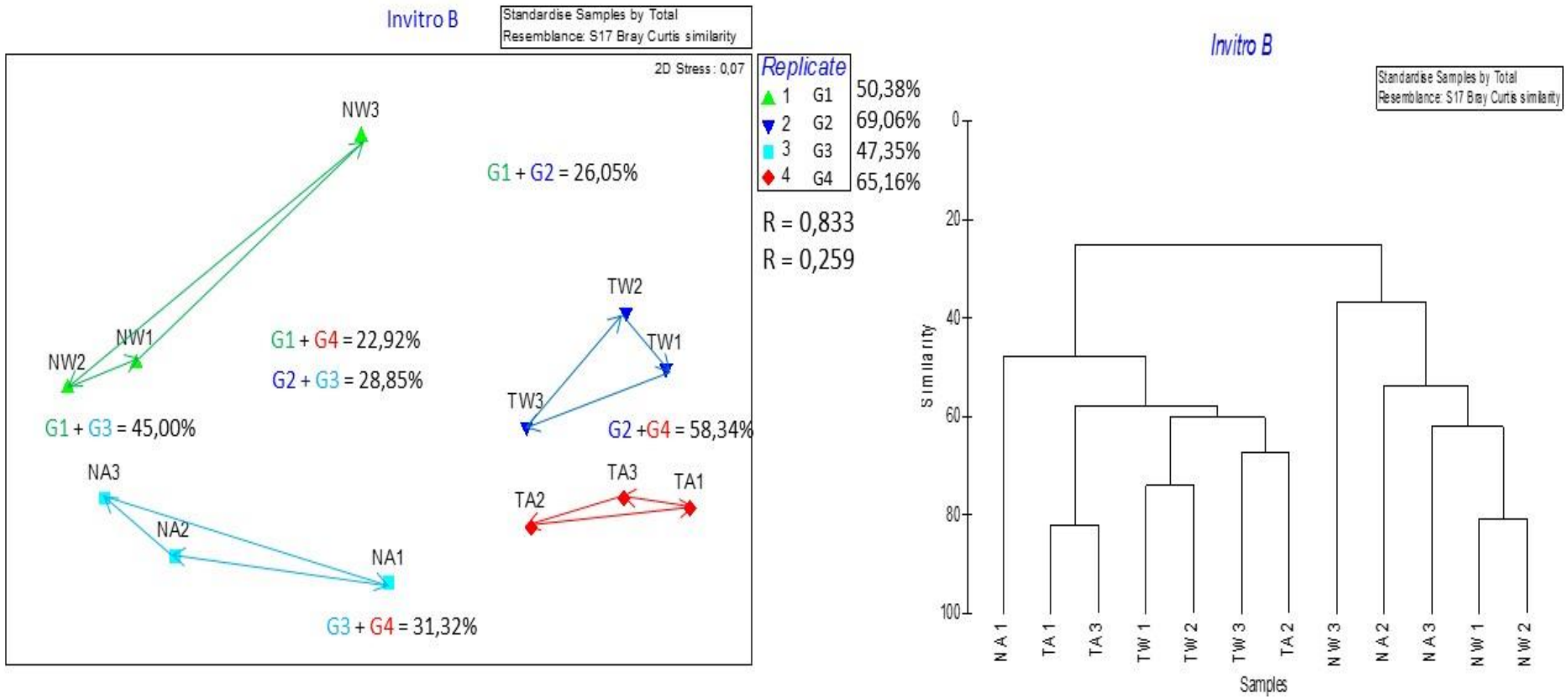
Figura 5.22. Eletroforese da amplificação purificada da comunidade bacteriana 16S (A) e da comunidade Eucariota 18S (B)

Os resultados da T-RFLP são apresentados na Figura 5.23. Nota-se que a comunidade de bactérias sofreu maior influência da variável revestimento (presença ou não) com R igual 0,833, quando comparado a influência do tipo de névoa 0,289, visto que o R quanto mais distante de

0, maior sua influência. As triplicatas das amostras apresentaram percentuais bem diferentes de similaridades, sendo a similaridade bacteriana para CP + névoa, condição 6, de 69,06%, o maior valor. Seguem-se, os percentuais de similaridade bacteriana de 65,16% e 50,38%, correspondentes as condições 8 (CP/tinta + névoa ácida) e 5 (CP + névoa). E, por fim, o valor de 47,35% para a similaridade do CP/tinta + névoa ácida (condição 7). Tal variação provavelmente se deu pois os corpos de prova com pintura tiveram menor crescimento de bactérias, o que pode estar relacionado à menor diversidade da comunidade bacteriana, e consequentemente maior domínio de alguns grupos.

Quando as comunidades bacterianas são comparadas nas diferentes condições, apresentaram maiores similaridades quando a variável foi o revestimento, ou seja, a similaridade entre as comunidade das condições 6 e 8 foi de 58,34%, em seguida os corpos de prova com a segunda maior similaridade foram os sem revestimentos, condição 5 e 7 (45,00%). Para a similaridade das condições 5 e 6, e 7 e 8, condições sob névoa e névoa ácida, foram de 26,05 e 31,05%. Novamente, o revestimento contribuindo para uma menor diversidade. Pelo dendograma gerado, as similaridades das comunidades bacterianas puderam ser analisadas separadamente. Com isso a similaridade das amostras ficaram divididas em função da influência da presença e ausência do revestimento, sendo que uma amostra sem revestimento foi mais similar as amostras com revestimento (NA1, condição 7, a amostra da dupla banda).

Como foi observado na T-RFLP a presença do revestimento nos corpos de prova acaba influenciando sobre as comunidades de bactérias, em especial nos CPs que não tinham revestimento, pode ser observado a presença de maior diversidade microbiana (Figura 5.24), em destaque dois grupos Actinobacteria (Azul) e Cyanobactéria (verde claro), porém foi notável que o desenvolvimento proporcional das cianobactérias foi maior quando havia a presença de névoa ácida, isso pois a composição é muito similar a composição do meio de cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes utilizado nesta pesquisa ($NaNO_3$, $CaSO_4.2H_2O$, K_2SO_4, NH_4Cl, NaCl, NaOH/ $NaNO_3$, $MgSO_4.7H_2O$, K_2HPO_4, NH_4Cl, $CaCl_2$ e Cloreto Férrico), ou seja, a deposição ácida contém substancias que auxiliam no desenvolvimento desses micro-organismos.



G1 - NW (Natural Water) - Sem revestimento + névoa.
G2 - TW (Treatment Water) - Com revestimento + névoa.
G3 - NA (Natural Acid) – Sem revestimento + névoa ácida.
G4 - TA (Treatment Acid) – Com revestimento + névoa ácida.
R – Resposta estatística que mede a Influência da variável.

Figura 5.23. *NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e* dendrograma das comunidades de bactéria com variáveis de revestimento (Natural and Treatment) e condições atmosféricas (Water and acid).

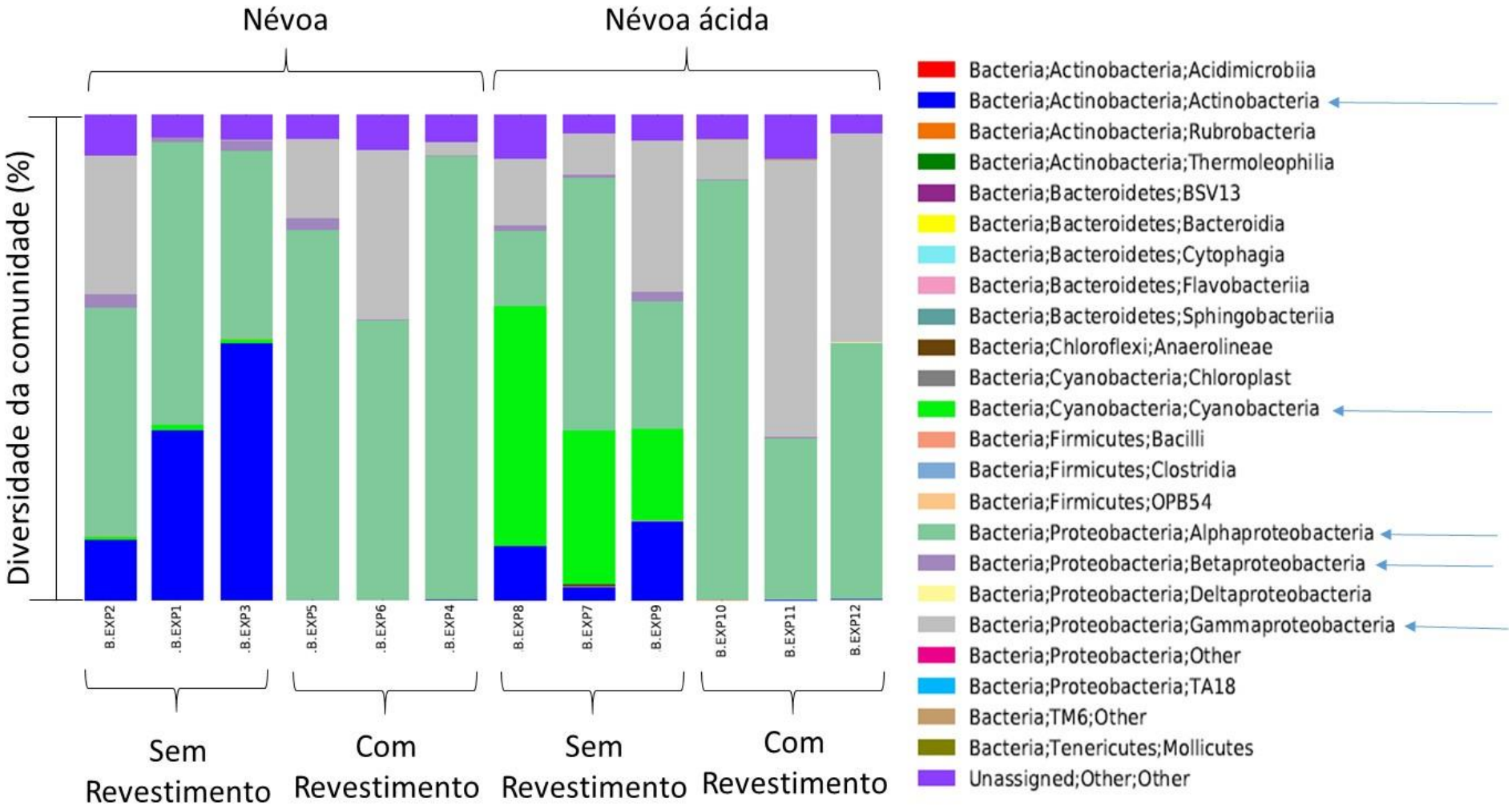


Figura 5.24. Diversidade da comunidade Bacteriana das amostras dos experimentos conduzidos em laboratório.

Em contra partida, as actinobactérias se desenvolveram mais na ausência de deposição ácida (em água destilada), provavelmente pela acidez do ambiente, uma vez que se desenvolvem melhor em ambientes neutros a ligeiramente alcalinos (MAIER, PEPPER e GERBA, 2000). Os grupos bacterianos que na maioria dos CPs se desenvolveram melhor foram Alphaproteobacteria (verde), seguido do Gamaproteobacteria (cinza) e por fim em menor proporcionalidade o grupo de Betaproteobacteria (roxo), esses dois últimos não presentes em todas as triplicatas.

Segundo informações dos fornecedores da tinta utilizada, os testes de viabilidade com bactericidas foram realizados com alguns micro-organismos, *Salmonella choleraesius*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, pertencentes à classe Gamaproteobactéria, e *Staphylococcus* aureus pertencentes aos Firmicutes, com aproximadamente 99,9% de eficiência, porém no presente trabalho foi encontrado uma boa diversidade presente da classe Gamaproteobactéria, não sendo eficiente. Em contra partida não foi notada a presença dos Firmicutes, indicando ser eficiente para este grupo.

A Figura 5.25 apresenta o resultado da T-RFLP para a comunidade eucariota e dessa forma foi possível ver um comportamento similar ao descrito anteriormente, sendo a influência da pintura (R = 0,389) maior que a influência da névoa ou névoa ácida (R=0,130). As triplicatas com maior similaridade foram da condição 6, com 96,51%, tal valor altíssimo, pelo baixo número quantificado de micro-organismos fotossintetizantes e por fungos não terem alto valor como nos outros experimentos.

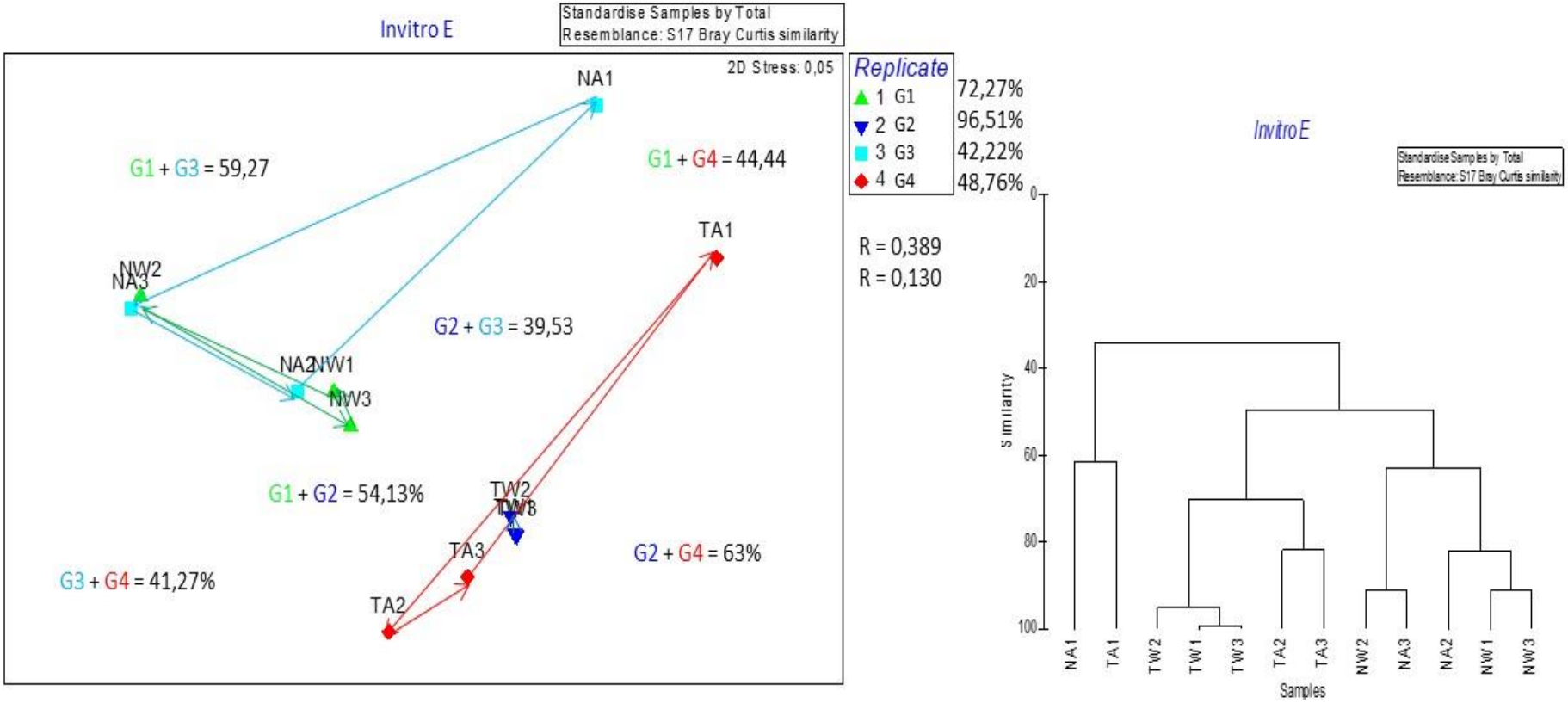
A segunda maior similaridade foi da condição 5, com 72,27%, isso talvez pela predominância de alguns grupos fúngicos, que poderá ser observada mais à frente pelas imagens dos CPs e pela microscopia óptica (seção 5.3.3). Em sequência as condições 8 e 7 apresentam uma similaridade de 48,76% e 42,22%, respectivamente.

Assim como as comunidade bacterianas, as comunidades eucariotas apresentaram maiores similaridades quando a variável foi revestimento (condições 6 e 8) com valor de 63,00%, em seguida os CPs com a segunda maior similaridade foram os sem revestimentos, condição 5 e 7 (59,27%). Pelo dendograma pode ser observado que amostras ficaram agrupadas em com revestimento e sem revestimento, e única exceção, condição 6, que teve suas amostras mais similares entre si. Apenas duas amostras, uma sem revestimento e outra com revestimento,

ambas sob ação de névoa ácida, que se apresentaram com menos similaridade comparada ao restante do grupo, abaixo de 40%. Para a similaridade das condições 5 e 6, e 7 e 8, condições sob névoa e névoa ácida, foram de 54,13 e 41,27%.

Para o resultado do MiSeq (Figura 5.26), em sua maioria os experimentos apresentaram um maior desenvolvimento de eucariotos Opistthokonta; Nucletmycea (cinza), com exceção de 1 amostra do corpo de prova revestido sob a ação de névoa ácida (experimento 7). Os outros dois grupos em maior quantidade foram Amoebozoa; Discosea (Bege), esse ausente apenas na condição sem revestimento sob a atuação névoa, e Archaeplastida; Chloroplastida (roxo), ausente nas condições onde tem revestimento, indicando uma possível eficiência do biocida contido no revestimento. De um modo geral as condições em que apresentaram maior diversidade foram os grupos microbianos sob efeito de névoa ácida, sendo a maior diversidade encontrada no corpo de prova sem revestimento. Dois grupos se desenvolveram apenas em condições com a presença de névoa ácida, SAR, Alveolata (marrom) e Opisthokonta; Other (rosa).

Os testes realizados pelos fabricantes da tinta avaliaram a ação fungicida para *Aureobasidium pullulans, Aspergillus niger* e *Penicillium,* sendo o primeiro pertencente a Ascomycota dothideomycetes e os outros pertencente aos Ascomycota Eurotiomycetes, justificando que houve a redução de 3 vezes a concentração dos micro-organismos. Para nossos testes os resultados dos eucariotos sendo Opistthokonta, Nucletmycea (cinza) que englobam entre outros grupos os fungos, que nos experimento com revestimento, obteve o maior percentual, sugerindo que o desenvolvimento de fungos não foi inibido.



G1 - NW (Natural Water) - Sem revestimento + névoa.
G2 - TW (Treatment Water) - Com revestimento + névoa.
G3 - NA (Natural Acid) – Sem revestimento + névoa ácida.
G4 - TA (Treatment Acid) – Com revestimento + névoa ácida.
R – Resposta estatística que mede a Influência da variável.

Figura 5.25. *NMDS (Non-metric multidimensional scaling) e* dendrograma das comunidades de eucariotos das amostras dos experimentos conduzidos em laboratório.

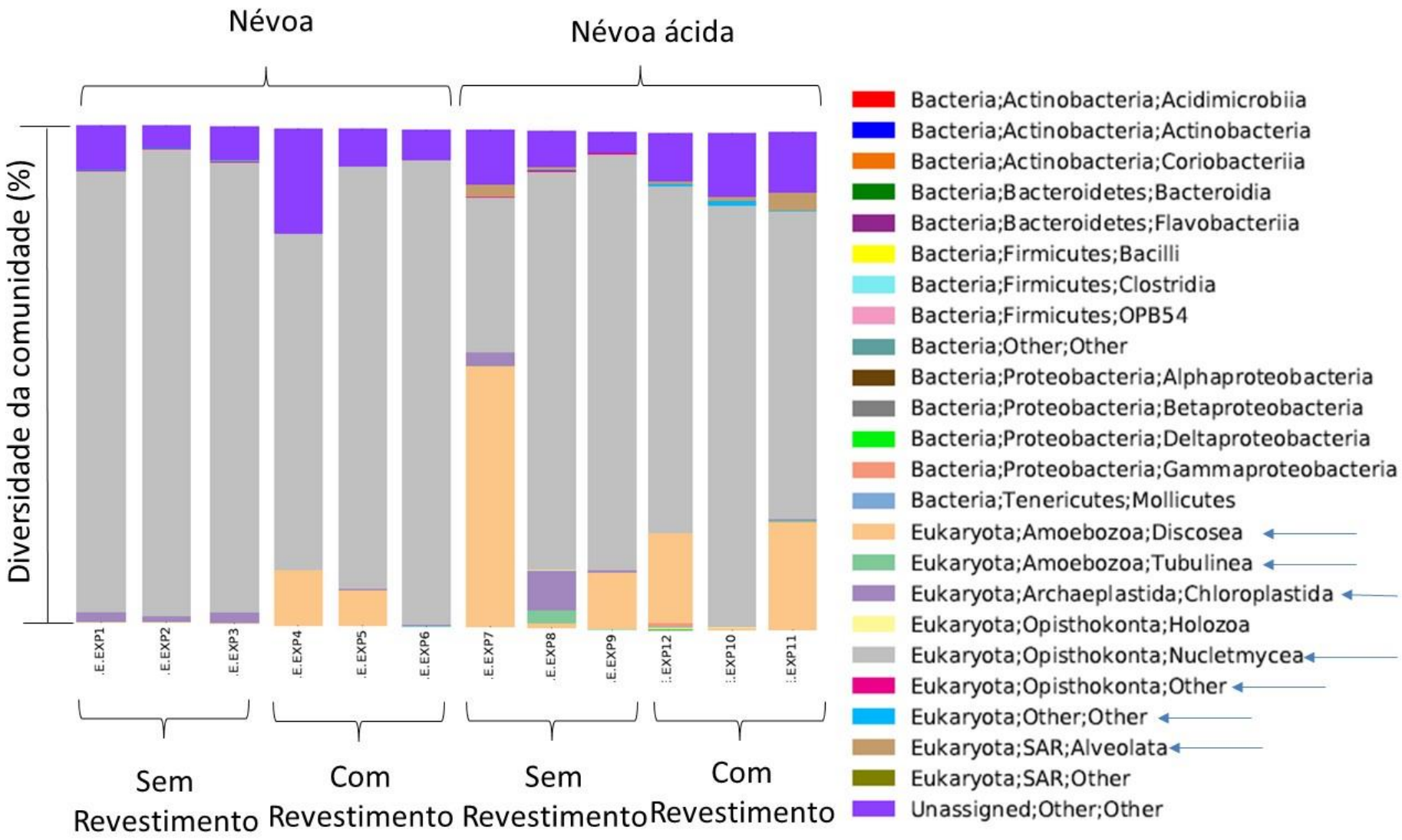


Figura 5.26. Diversidade da comunidade Eucariotas das amostras dos experimentos conduzidos em laboratório.

Quando se compara a diversidade da comunidade bacteriana e a eucariota pode-se afirmar que a diversidade bacteriana foi mais susceptível as condições estudadas, ou seja, quando se tem revestimento ou não, ou mesmo névoa ou névoa ácida, as comunidades se distanciam entre si, em cada condição (Figura 5.23 - triângulos separados) ficam cada vez mais diferentes. Pode-se observar também que os eucariotos apresentam maior similaridade total, um pouco abaixo de 40%, enquanto as bactérias um pouco acima de 20%. Para as bactérias os CPs foram mais homogêneos nas triplicatas sobre a influência da pintura, enquanto para os eucariotos foi o efeito da água destilada.

5.3.4. Imagens dos corpos de prova

A fim de avaliar o efeito da formação de biofilmes sobre os CPs na presença e ausência de revestimento (tinta), estes foram visualizados macroscopicamente e microscopicamente. Para fins comparativos, foram conduzidos experimentos nas mesmas condições (com e sem revestimento, e exposição à névoa ou névoa ácida) na ausência de micro-organismos. A seguir, as observações feitas:

a) Imagens macroscópicas

A Figura 5.27 apresenta as imagens dos corpos de prova nas condições ensaiadas. Na primeira coluna de imagens são apresentados os CPs, com e sem revestimento, logo antes de iniciados os experimentos. Na segunda coluna, têm-se os CPs decorridos 100 dias, na ausência de micro-organismos, enquanto na terceira foram compiladas as imagens dos CPs inicialmente inoculados. Por fim, a quarta coluna compreende os corpos de prova da terceira coluna após efetuar a raspagem das suas superfícies para remoção dos biofilmes sobre elas formados.

Com relação aos CPs sem atuação de micro-organismos (condições 1, 2, 3 e 4) ocorreu maior alteração da cor nos que continham revestimento (condições 2 e 4). Nota-se ainda que o clareamento dos CPs, ocorreu tanto quando foram expostos a névoa quanto à névoa ácida. Segundo a literatura, a descoloração pode ser causada pela umidade, e é tão mais intensa quanto mais elevada, quando demorada o contato com água (ATKINS *et al*., 2011).

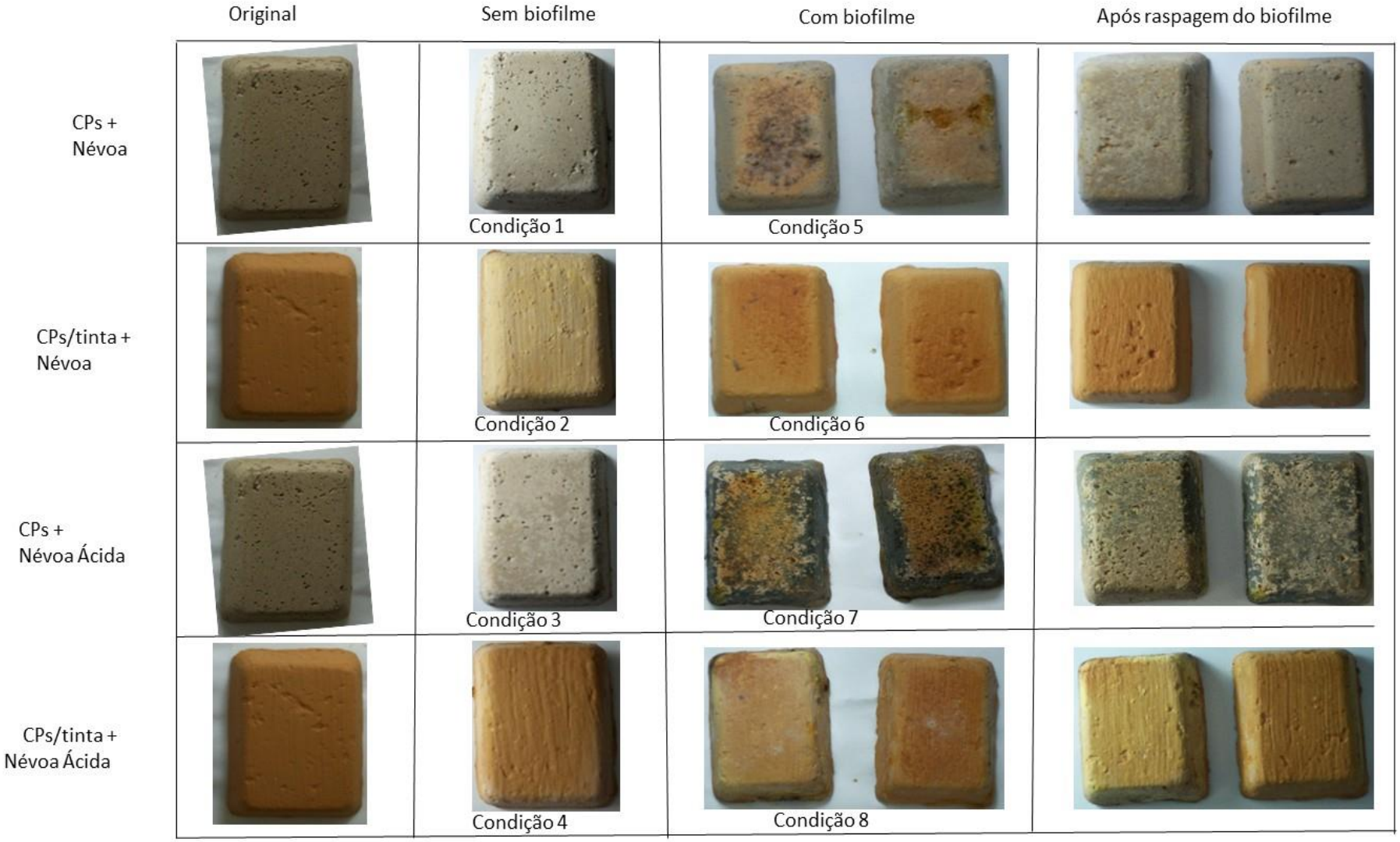


Figura 5.27. Fotografias dos corpos de prova em fase inicial, e com desenvolvimento das variáveis de corpo de prova revestido ou não, com ausência ou presença de micro-organismos e influência da névoa ou névoa ácida.

Contudo, ao contrário do esperado, as superfícies dos CPs/tinta com exposição a névoa (condição 2) apresentaram descoloração mais intensa do que aqueles expostos a névoa ácida (condição 4). Isto porque, a presença de solutos deveria reforçar a ação da umidade, ou seja, a presença desses solutos interferem nas trocas com o ambiente favorecendo uma maior umidade sobre a superfície (ATKINS *et al*., 2011).

Logo, em comparação com materiais expostos a névoa, para que haja evaporação da mesma quantidade de água em materiais sob névoa ácida, estes deverão permanecer expostos a maiores temperatura ou tempo, o que por sua vez terá influência no desenvolvimento do biofilme. Assim a descoloração pode estar relacionada à superfície não uniforme dos CPs, já que a confecção em laboratório não permite alcançar a mesma homogeneidade para todos.

Shirakawa *et al.* (2013) realizaram testes qualitativos com corpos de prova, com e sem biocida (nanopartículas de prata) com o intuito de avaliar a descoloração do material. Os autores atribuíram pontuação de 0 a 5, segundo a seguinte classificação: 0 - quando não havia nenhuma modificação, 1 - menos de 10%, 2 - de 10 a 30%, 3 - de 30 a 60%, 4 – de 60 a 80% e 5 - de 80 a 100% de alteração da cor em relação ao material original. Como conclusão os autores verificaram que em todos os casos ocorreu alteração da cor dos CPs, em especial escurecimento. Na presença do biocida, o efeito foi classificado como 2. Adicionalmente, eles observaram que o desenvolvimento dos biofilmes ocorreu de forma não homogênea.

Nos CPs com biofilme, também foi possível observar a presença de substâncias oriundas do crescimento microbiano, principalmente nos CP revestidos com tinta. O precipitado marrom pode ser devido a metabolização de material oriundo do meio de cultura carreado com inoculação, produzido por ferrobactérias.

Em estudo elaborados por Papida, Murphy e May (2000), ao monitorar a deterioração física e química de materiais compostos de dolomita e calcário, observaram ser os micro-organismos a principal causa desses fenômenos. A atividade dos micro-organismos sobre os materiais teve piores consequências em comparação com a ação da água, o que resultou em aumento da porosidade do material, com diminuição da sua resistência e provocando seu esfarelamento.

Adicionalmente, houve a diminuição do pH da superfície, o que resultou em aumento considerável da biosusceptibilidade da matriz. Em alguns casos, a colonização microbiana resulta em lixiviação dos minerais. A carbonatação é, dentre as reações químicas, a mais comum, o que concorre para o ataque de materiais à base de cimento. Por isso, os materiais a base de cimento quando expostos a fatores ambientais, tais como umidade, chuva ácida, e neve, entre outros, estão mais sujeitos à lixiviação (WIKTOR *et al*., 2009).

Os CPs sem revestimento expostos à névoa (condição 5) apresentaram aspectos diferenciados em sua área, abrangendo partes mais e menos ressecadas, e diferentes colorações, variando de amarelo mostarda a roxo. Após a raspagem do biofilme, os CPs perderam grande parte da pigmentação, retornando a cor original cinza.

Quando CPs/tinta foram mantidos sob névoa (condição 6), aparentemente apresentaram poucas alterações. Provavelmente em função do menor desenvolvimento microbiano (Figura 5.21). E, além disso, após a remoção do biofilme, os corpos de prova voltaram ao seu aspecto próximo do original.

As superfícies dos CPs sem revestimento e expostos a deposição ácida apresentaram coloração verde (condição 7). Provavelmente, decorrente do desenvolvimento de micro-organismos fotossintetizantes. Nota-se ainda que grande parte do material apresentava coloração alaranjada, possivelmente relacionada à atividade de ferrobactérias. Após a raspagem dos biofilmes, esses CPs foram os que mais apresentavam alterações visuais, com inúmeras manchas por toda a superfície.

Quando CPs/tinta foram expostos a névoa ácida (condição 8), partes das suas superfícies se tornaram esbranquiçadas, o que remete ao crescimento de micélio fúngico. Após remoção do biofilme, foi constatada a alteração de cor da tinta para amarelo forte, bem diferente dos CPs expostos a névoa. Tal fato ratifica que a névoa ácida causa mais danos ao material do que exclusivamente a umidade decorrente da névoa, conforme anteriormente reportado.

Gil *et al.* (2010) avaliaram o aspecto visual de amostras de diversos materiais expostos a condições atmosféricas distintas (rural, industrial e urbana). Segundo eles, em termos gerais, as amostras da zona rural apresentaram apenas poucos pontos de deterioração. Os demais corpos de prova apresentaram uma superfície coberta por produtos de corrosão, sendo que os da zona

urbana apresentavam um filme verde. Os autores indicam ser o grau de deterioração dessas áreas decrescente na seguinte ordem: zona urbana > zona industrial > zona rural.

Como esperado a condição 8 apresentou um maior descoramento quando comparado a condição 6, uma vez que a umidade mantinha-se maior, isso já se espera um maior dano ao material, bem como uma facilitação para o desenvolvimento dos micro-organismos. Cabe salientar que todos os CPs não são perfeitos, alguns possuem algumas ranhuras, buracos, entre outras imperfeições, que podem favorecer tanto o acúmulo de substâncias, como o desenvolvimento de micro-organismos, ou seja, uma maior susceptibilidade para a deterioração do material.

b) Microscopia ótica

Os CPs também foram visualizados em maior aumento - 8, 32 e 50 vezes - visando detectar em detalhes o ataque e, deste modo, possibilitar uma análise mais crítica dos resultados. De fato, a análise destas imagens possibilita distinguir melhor as imperfeições de cada CP, sobretudo daqueles sem revestimento. Isto já era previsto, uma vez que a aplicação de revestimento torna a superfície do material menos biosusceptível.

A Figura 5.28 apresenta a comparação entre as condições 1, 5 e a 5 após a raspagem (Cps sem revestimento + névoa, 1-sem micro-organismo/5-com micro-organismos). Como pode ser observado os micro-organismos se desenvolveram de forma heterogênea, pois foram submetidos as mesmas condições e formaram biofilmes diferentes, como podem ser observados um CP com hifas e outro como um provável exopolímero aderido. Isso que pode vir a ser decorrência da superfície não ser totalmente lisa. Após a raspagem as imagens são parecidas com corpos de prova com a condição 1, com algumas partes pigmentadas, porém com diminuição dos poros devido a raspagem da superfície.

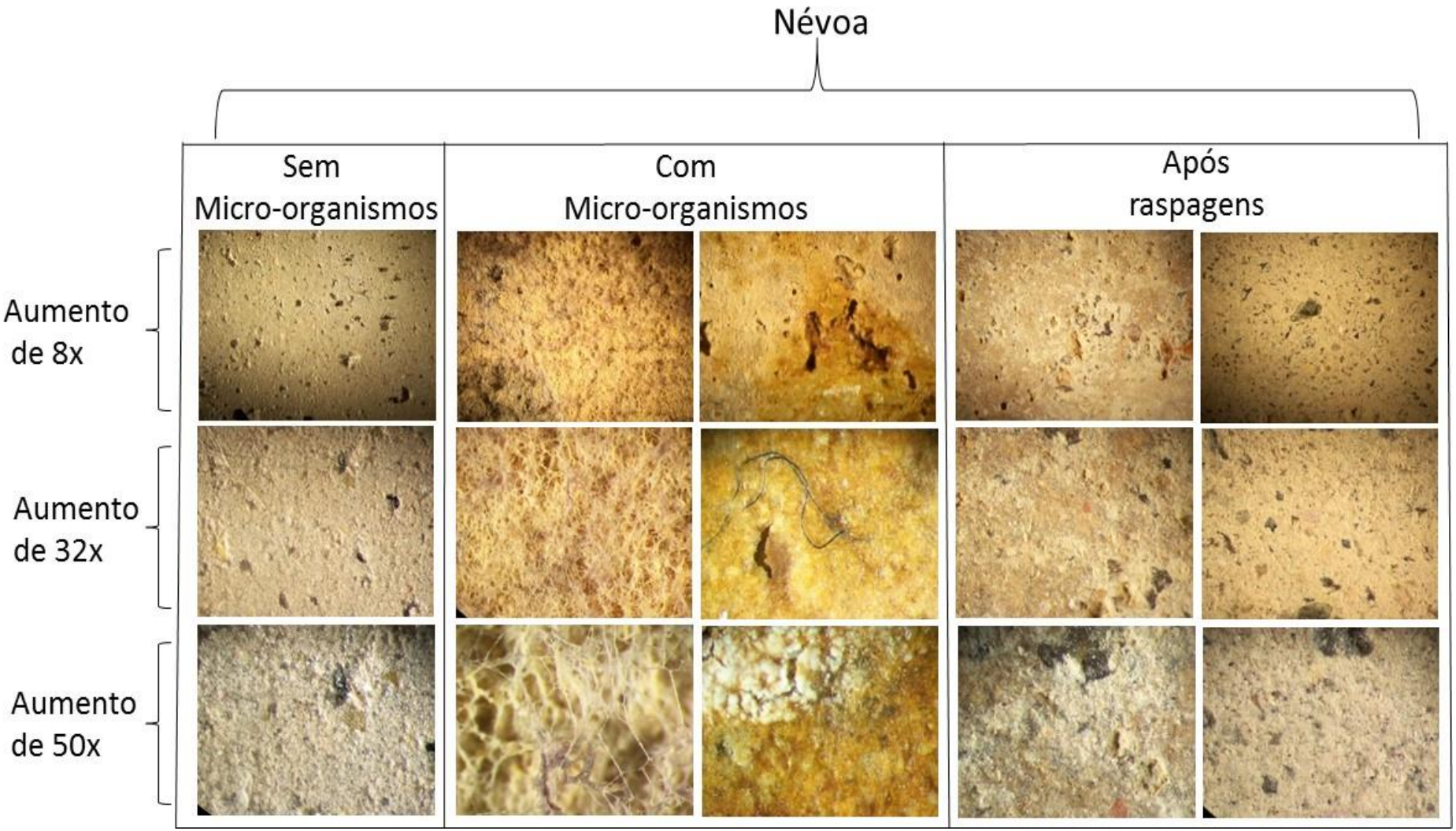


Figura 5.28. Imagens dos CPs sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a remoção do biofilme, sob a ação de névoa (condições 1 e 5), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes.

A Figura 5.29 apresenta a comparação das condições 2 e 6, e a 6 após a raspagem (CPs/tinta + névoa, 2-sem micro-organismo/6-com micro-organismos), neste caso nota-se grande diferença de pigmentação dos CPs. Com relação ao esbranquiçado apresentado sem a atuação de micro-organismo, provavelmente são resíduos não observados quando foi realizada sua confecção. Houve também a presença de fios (fibras) que podem ser provenientes do próprio pincel que foi utilizado para a elaboração dos CPs. A olho nu não foi possível observar o quão irregular são os CPs mesmo revestidos.

Após a raspagem, pode ser observado ranhuras e buracos no revestimento, provavelmente pela atuação dos micro-organismos. O revestimento com rupturas pode criar ambientes favoráveis ao depósito de micro-organismos ou mesmo substâncias que ajudariam em seu desenvolvimento, como maior acumulo de impurezas, substâncias orgânicas e inorgânicas, e principalmente água. Pode-se observar após a raspagem que os CPs/tinta apresentaram uma leve alteração de cor, provavelmente de produtos formados no metabolismo dos micro-organismos.

A comparação entre as condições 3 e 7, e a raspagem dos CPs na condição 7 são apresentadas na figura 5.30 (Cps sem revestimento + névoa ácida, 3-sem micro-organismo/7-com micro-organismos). Aparentemente a névoa ácida contribuiu para a aparição de mais irregularidades sobre a superfície (condição 1 com menos imperfeições que a condição 3), facilitando assim a aderência substâncias/micro-organismos. Em seguida foi observado o desenvolvimento heterogêneo sob os CPs, sendo pigmentos verdes adsorvidos sobre a superfície, indicando a presença de micro-organismos fotossintetizantes. No segundo CP da condição 7 foram encontradas pigmentações diferentes sobre toda a superfície. Após a raspagem foi observado uma alteração brusca da pigmentação do CP quando comparado sem a atuação dos micro-organismos, isso também indica que os micro-organismos estavam bem aderidos a superfície dos CPs.

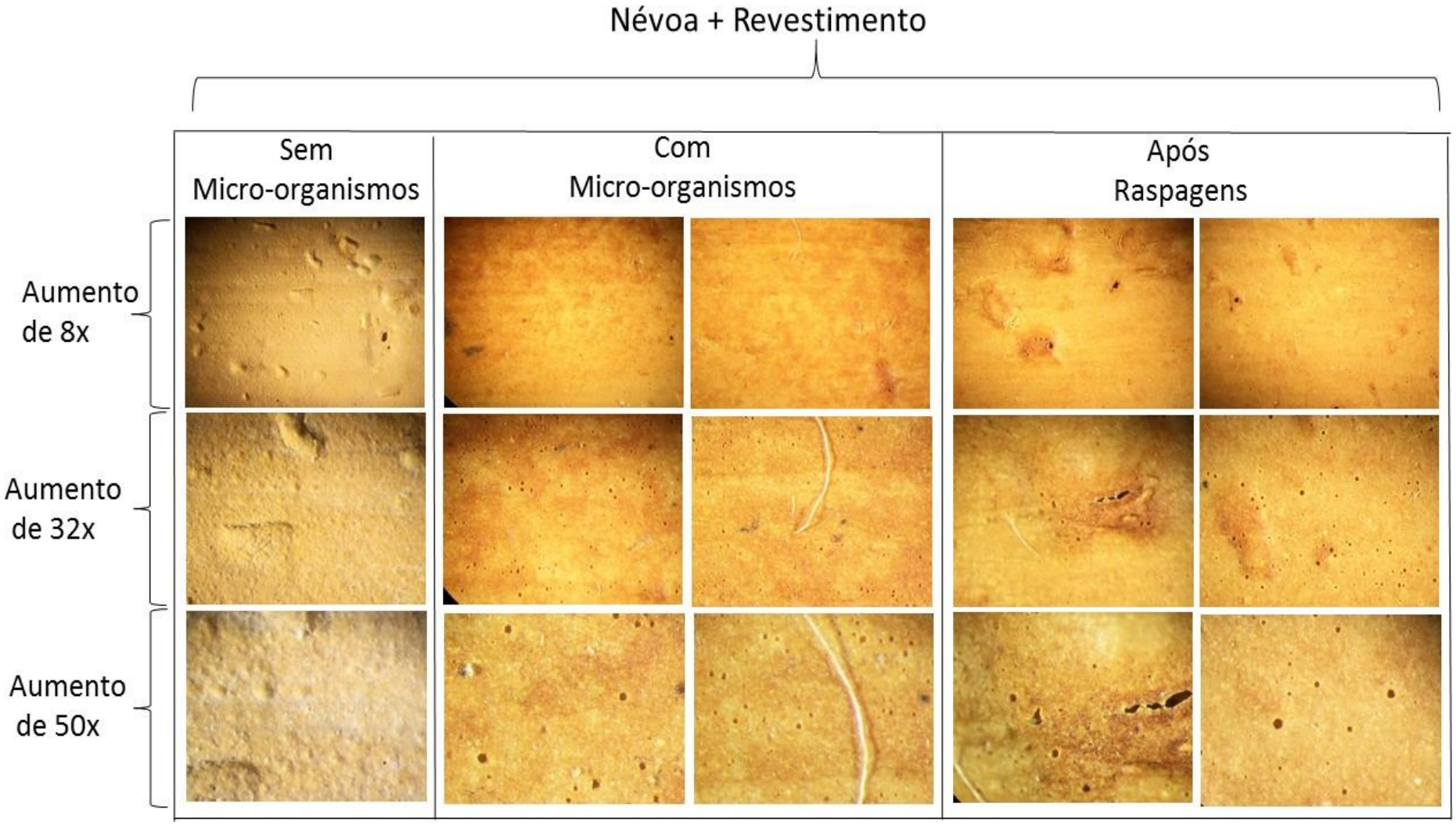


Figura 5.29. Imagens dos CPs/tinta sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a raspagem do biofilme, sob a névoa (condições 2 e 6), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes.

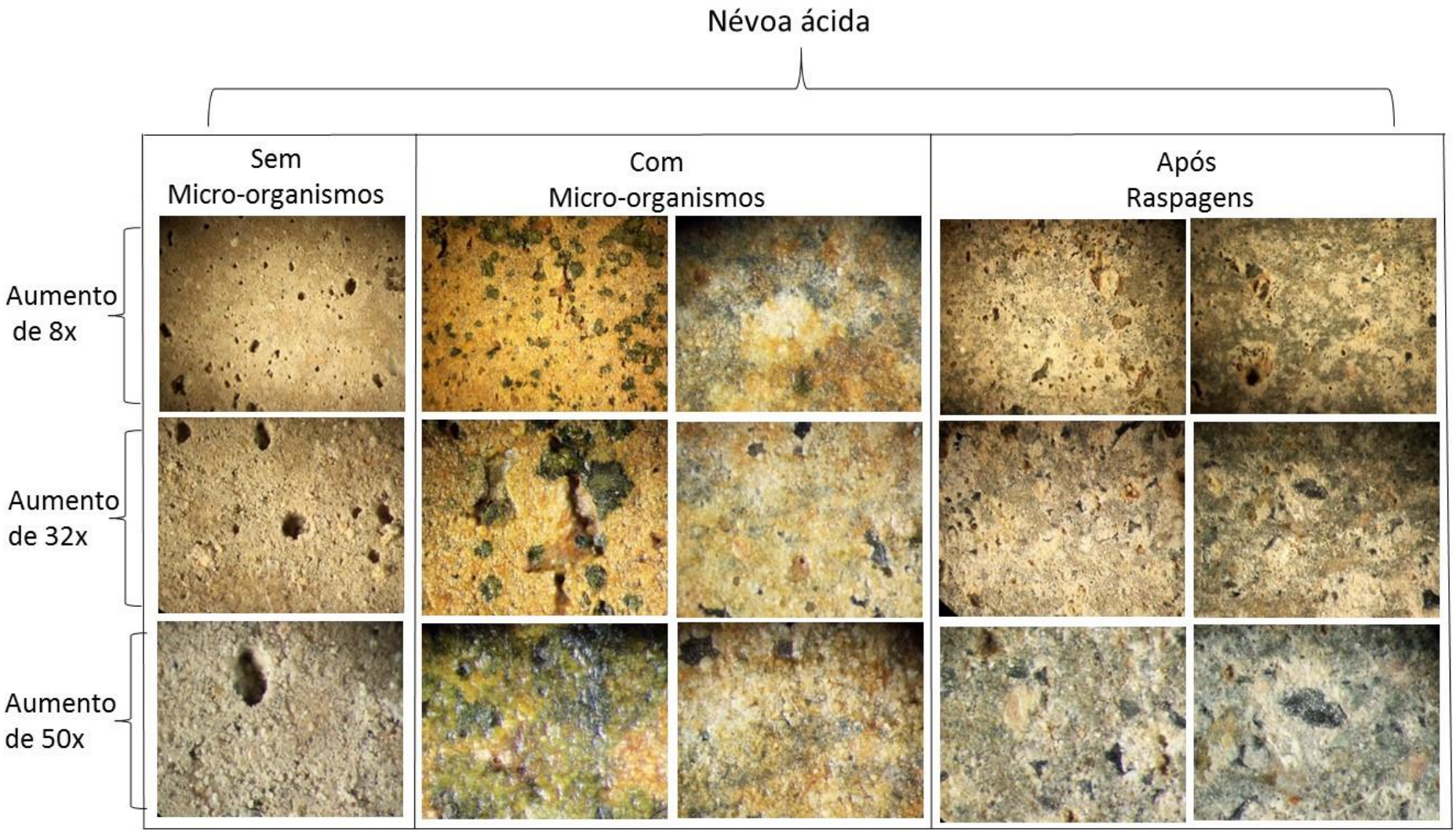


Figura 5.30. Imagens dos CPs sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a remoção do biofilme, sob névoa ácida (condições 3 e 7), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes.

Na figura 5.31 são apresentados os corpos nas condições 4, 8 e a 8 após a raspagem dos CPs (CPs/tinta + névoa ácida, 4-sem micro-organismo/8-com micro-organismos). Na condição 4, o CP aparece sem modificação visual, porém foi notável a presença buracos que facilitariam o desenvolvimento de micro-organismos. Adicionalmente foi observada uma pigmentação com cor de ferrugem, proveniente de ferrobactérias, e também o desenvolvimento de prováveis hifas brancas, porém não com tanta intensidade como encontrada na condição 5. Devido à dificuldade de realização de raspagem em CPs/tintas foi possível observar hifas sobre a superfície e uma leve diferença na intensidade da cor nos CPs/tintas.

Em resumo, os CPs sem revestimento, quando comparados aos com revestimento, tiveram um maior desenvolvimento dos micro-organismos, com formação de biofilmes heterogêneos, abrangendo toda a área superficial exposta, principalmente devido à dificuldade de adesão a superfície (biosusceptibilidade para os micro-organismos). Quando comparadas as condições 5 e 7, fica notória uma maior aderência à superfície quando sofre influência da névoa ácida (condição 7), essa diferença foi devido principalmente a retenção de umidade na superfície e pelos componente da névoa ácida que auxiliam para um melhor desenvolvimento dos algumas populações microbianas. A condição que apresentou o pior desenvolvimento foi a condição 6, menos agressiva aos CPs. Mesmo com condições menos favoráveis, ocorreu biodeterioração uma vez que somado ao alto crescimento de micro-organismos foi observada a diferenciação da cor original após remoção do biofilme.

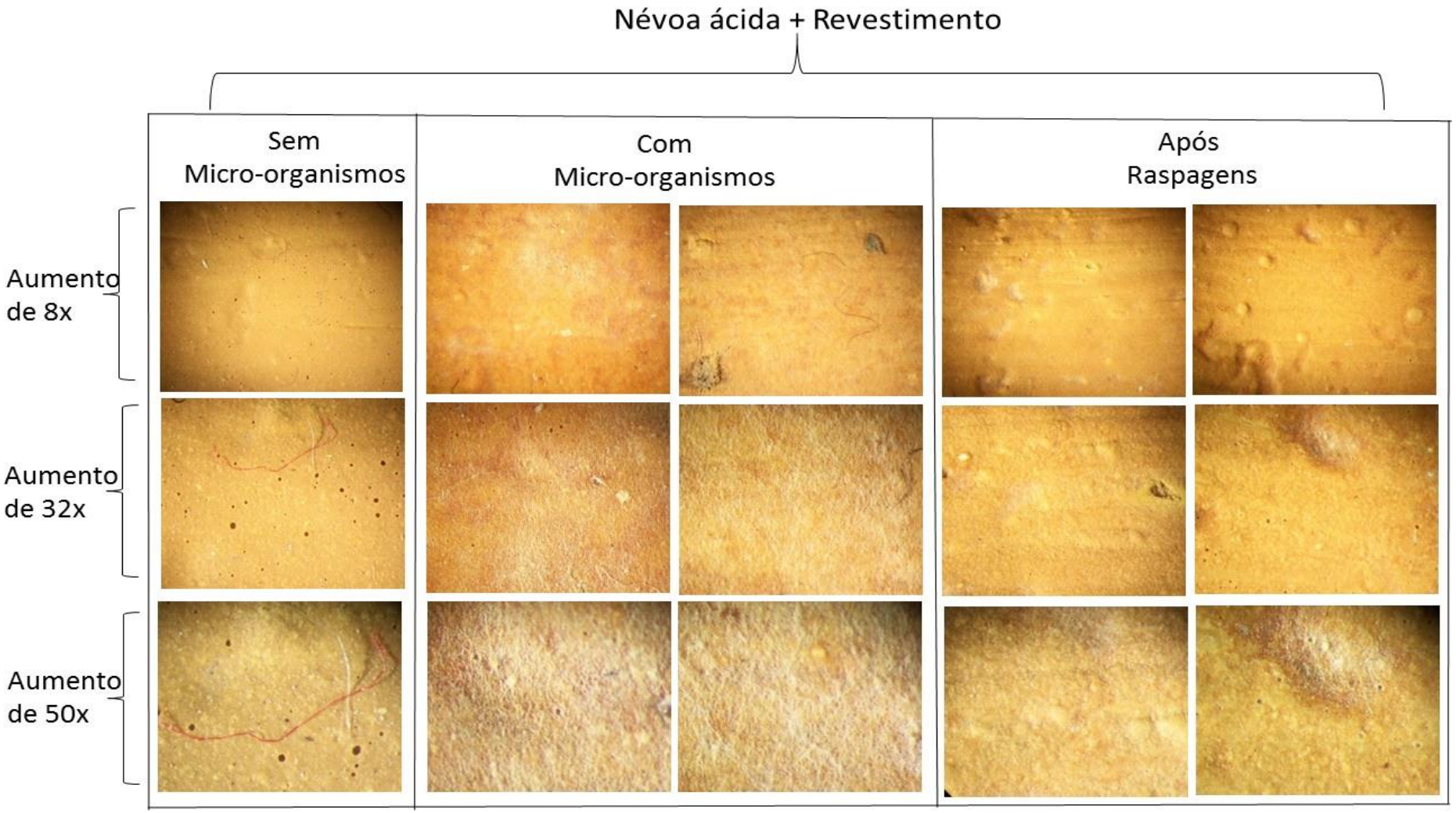


Figura 5.31. Imagens dos CPs/tinta sem a atuação de micro-organismos, com o desenvolvimento dos micro-organismos e após a raspagem do biofilme, sob névoa ácida (condições 4 e 8), com o aumento de 8, 32 e 50 vezes.

c) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises de MEV foram utilizados CPs cilíndricos (seção 4.4.1 e 4.4.3.2) aos quais seguiram a mesma análises das 8 condições, a figura 5.32 apresenta as condições 1, 2, 3 e 4, as quais não sofrem a atuação de micro-organismos. Comparando essas condições, os resultados são bem similares, ou seja, corpos de prova sem revestimentos, sob a ação de névoa salina e névoa ácida, apresentam heterogeneidade, e CPs com revestimento se apresentam mais homogêneos.

As condições 1 e 3 apresentam aumento visual dos CPs sem revestimento, ou seja, os CPs apresentam superfície mais heterogêneas, por consequência mais susceptível a aderência e depósitos de materiais, o que facilita para a adesão dos micro-organismos, entretanto não foi possível encontrar grande diferenciação entre essas condições, parecendo que em 100 dias de experimento não terem diferenças estruturais tão significativas.

A figura 5.33 apresenta os CPs sob influência do desenvolvimento de micro-organismos, condições 5,6,7 e 8. Quando não se tinha revestimento sobre as superfícies dos CPs foram observadas a formação de biofilmes, entretanto com aspectos diferenciados, sendo a condição 5 com um biofilme mais volumoso, porém menos aderido ao comparar a condição 7. Na condição 5 foi observada a produção de exopolímeros na superfície do CP bem como a formação de biofilmes, com provável desenvolvimento em seu interior.

Na condição 7, apresentou-se também grande desenvolvimento de micro-organismos, incluindo grande aderência e produção de exopolímeros, inclusive nesta condição os CPs tiveram maior aderência, tanto visualmente, como experimentalmente quando foi realizada a raspagem para a quantificação. Adicionalmente, foi possível observar grande produção de hifas que associadas a cor esverdeada presente nas imagens do microscópio ótico sugere presença de liquens.

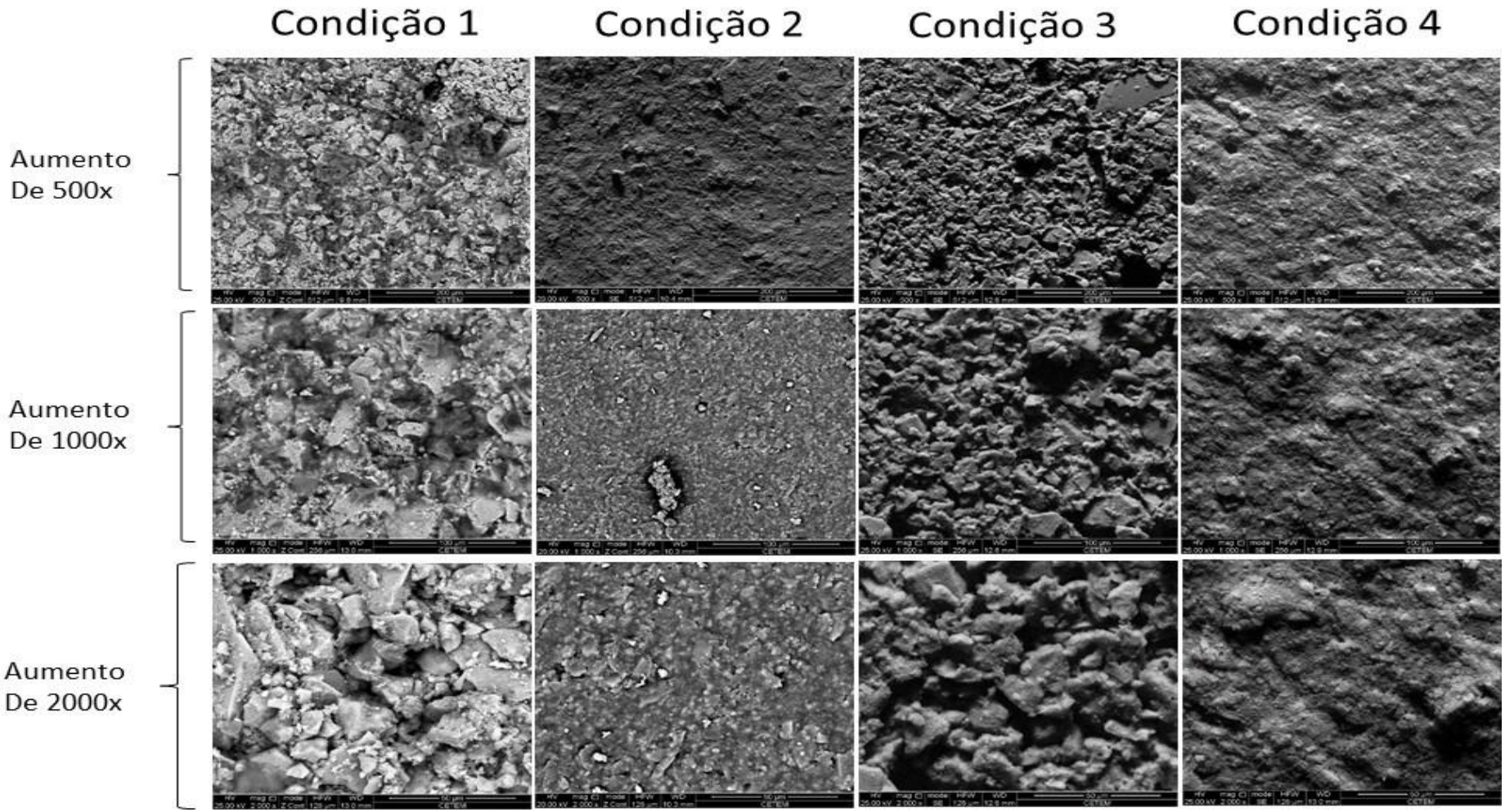


Figura 5.32. Imagens de MEV dos CPs na Condição 1 (sem revestimento + névoa), condição 2 (com revestimento + névoa), condição 3 (sem revestimento + névoa ácida) e condição 4 (com revestimento + névoa ácida), todos sem atuação de micro-organismos.

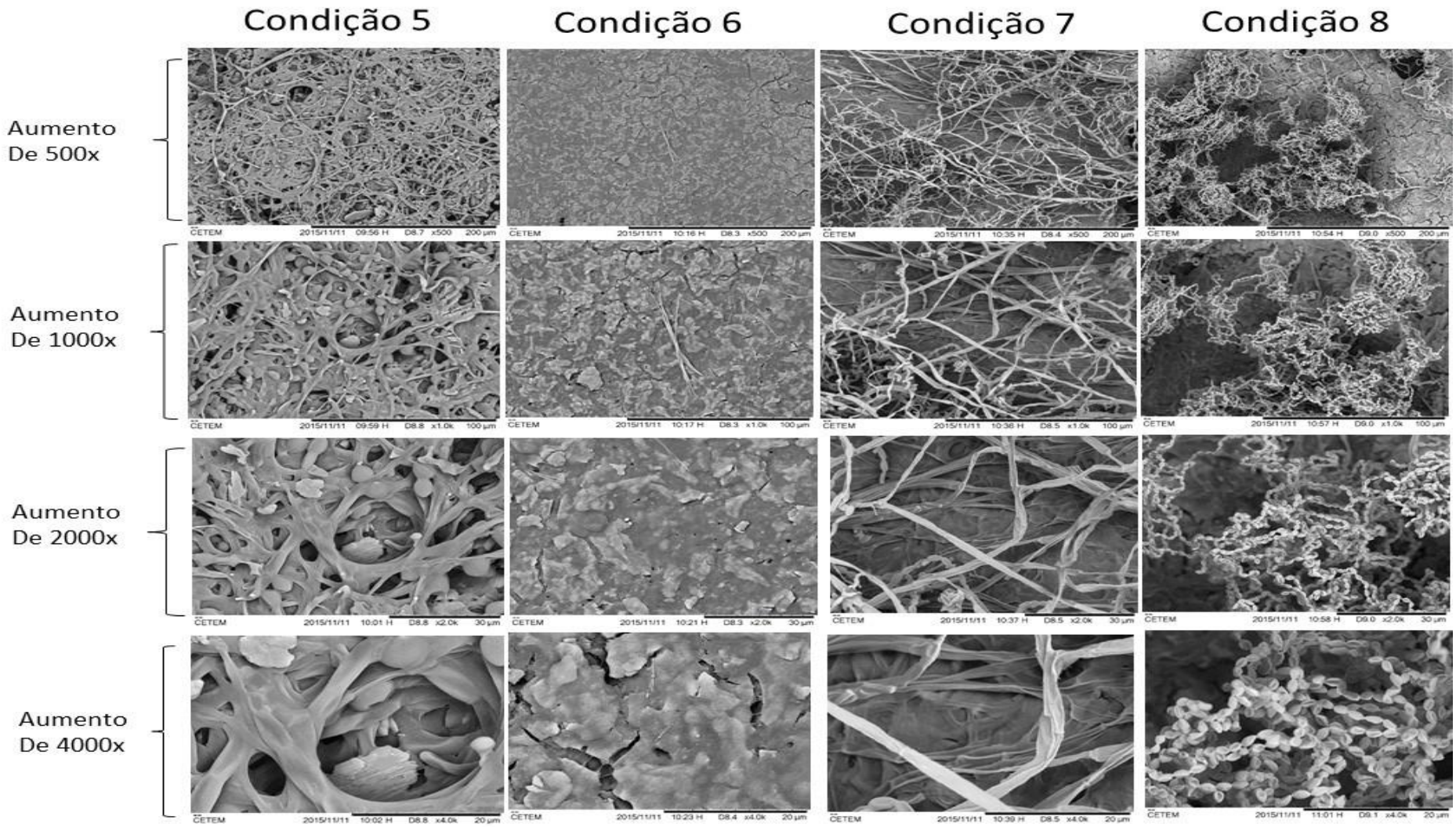


Figura 5.33. Imagens de MEV dos CPs na condição 5 (sem revestimento + névoa), condição 6 (com revestimento + névoa), condição 7 (sem revestimento + névoa ácida) e condição 8 (com revestimento + névoa ácida), todos com atuação de micro-organismos.

Para os Cps/tintas sob ação de névoa, condição 6, não foi possível encontrar micro-organismos quando realizada a técnica de MEV, mas foi observada inúmeras ranhuras sobre o revestimento, o que possivelmente foi causado por micro-organismos, enquanto para a condição 8 foi possível observar desenvolvimento dos micro-organismos, principalmente fungos, com formação de biofilme, porém não tão intenso quando comparados aos CPs sem revestimento. Também foram observadas inúmeras rachaduras no revestimento, bem como em baixa aderência.

Coutinho *et al*. (2013) observaram por MEV uma densa colonização de micro-organismos sobre a superfície do azulejo, mas especialmente em fissuras, que sugere que eles causam descamação, provavelmente com resultado de mudança de volume, penetração na matriz e lançamento de metabólitos, tais como ácidos orgânicos e inorgânicos, como ocorrem em argamassas.

Pitzurra *et al*. (2003) realizaram testes com corpos de provas expostos por um ano na região de Fontivegge e Cortonese (Peruggia), onde não foram encontradas significantes variações na composição mineralógica atribuídas pela interação com poluentes atmosféricas. Em contraste, as análises microbianas indicaram níveis altos de contaminação, principalmente pela participação de fungos, onde foram significantes após 5 meses de exposição, com valores maiores de 2 UFC/cm^2, os valores cresceram progressivamente e chegaram a atingir números maiores de 150 UFC/cm^2. Comparando os dois sítios de pesquisa, os níveis totais de micro-organismos são similares, entretanto a diversidade das comunidades foi diferente. Foi observado uma ação seletiva de concentração de poluentes do ar sobre a proliferação de diferentes espécies de fungos e foi confirmada a presença de enxofre fixado na célula fúngica que pode ser interpretado assumindo uma relação entre proliferação de fungo e ar poluído. Considerando o metabolismo da produção de ácidos e a habilidade de muitos fungos para liberar sulfato no ambiente, depois da oxidação de sulfetos. Essas observações combinam o efeito da colonização e os poluentes atmosféricos que promovem o intemperismo das superfícies. Ainda os autores afirmam que os micro-organismos promovem maior deterioração comparados aos poluentes atmosféricos.

Em suma, no presente trabalho não foi possível observar a interação entre os poluentes e a atuação diretamente na deterioração, entretanto foi confirmada a influência da névoa ácida no desenvolvimento dos micro-organismos, apresentando um biofilme bastante aderido e de forma intensa, levando a danos não somente estéticos e sim estruturais.

6. CONCLUSÕES

Para o presente trabalho as conclusões ocorrem em duas partes, o monitoramento dos patrimônios e os ensaios de biodeterioração de argamassa.

Monitoramento dos patrimônios:

- Dentre os meios de cultivo avaliados, os meios Agar Nutriente (com nistatina), Caldo vermelho de fenol glicosado (em condições de aerobiose e anaerobiose), meio fluido ao tioglicolato, Agar citrato férrico (com nistatina), Agar Sabouraud (com amoxicilina), caldo difco foram os mais apropriados para enumeração de bactérias heterotróficas totais, produtoras de ácido (ambas em condições de aerobiose e anaerobiose), e ferrobactérias, fungos filamentosos e micro-organismos fotossintetizantes, respectivamente, nos biofilmes presentes nos patrimônios históricos analisados.
- Ao longo do período analisado (01/03/2014 a 10/03/2014), o perfil qualitativo das populações microbianas nas superfícies externas dos patrimônios - Museu Nacional (MN) e o Museu de Arte Contemporânea (MAC) foi semelhante, embora maiores crescimento e diversidade tenham sido observados nos biofilmes do MN.
- Nos biofilmes do MN, as bactérias aeróbias heterotróficas cultiváveis foram predominantes, enquanto que no MAC houve maior desenvolvimento de fungos filamentosos.
- A diversidade microbiana foi semelhante entre os pontos de coleta de material para cada museu, indicando as comunidades bacterianas totais (cultiváveis e não cultiváveis) independente do material, sobretudo no MN, foram similares em ambos os museus, ao longo do tempo. Em contrapartida no MAC foi identificada maior similaridade da comunidade eucariota.
- As variações de umidade e temperatura relativas ao clima do Rio de Janeiro (tropical úmido), não causaram perturbação expressiva ao perfil das populações microbianas.
- Nas superfícies externas do MN a comunidade bacteriana compreendeu em predominância alphaproteobactérias, acidobactérias, cianobactérias e actnobactérias. Enquanto na comunidade de eucarioto foram encontradas os super grupos Cloroplastida e Opisthokonta, também identificados nos biofilmes do MAC.

Ensaios de biodeterioração em corpos de prova de argamassa:

- O emprego de tinta com fungicida e bactericida em corpos de provas de argamassa (CPs) tiveram efeito positivo para diminuir a diversidade e a enumeração dos micro-organismos.
- Os CPs sem tinta, expostos a névoa ácida apresentaram maior enumeração, maior diversidade de populações microbianas e biofilmes mais aderidos a superfície. Entretanto a exposição dos CPs a névoa resultou em biofilmes mais volumosos e de fácil remoção mecânica (raspagem).
- Houve redução da população fúngica em 3 ordens de grandeza, quando comparados os CPs não revestidos e revestidos quando expostos à névoa, no entanto não foi detectada variação de densidade populacional sob influência da névoa ácida.
- A presença do revestimento inibiu o desenvolvimento de cianobactérias e actinobactérias, porém foi possível ver o desenvolvimento de gamaproteobactérias sobre os CPs com tintas, embora seja afirmado pelo fornecedor a eficiência do biocida de 99,9% contra micro-organismos do mesmo grupo.
- Os grupos de bactérias que se apresentaram predominantes foram das Proteobacterias (Alphaproteobacteria e Gamaproteobacteria) e do grupo eucarioto foi Opistthokonta, Nucletmycea.
- As análises de MEV dos CPs permitiram visualizar a formação de biofilmes, com exceção onde os CPs estavam com revestimento sob ação de névoa. A microscopia óptica dos CPs permitiu avaliar o efeito provocado pela formação dos biofilmes nas superfícies, principalmente a presença de diferentes pigmentações.
- Com a presença da tinta nos CPs foi dificultada a formação do biofilme, observado principalmente pela MEV. Onde havia a presença de névoa ácida teve mais umidade na superfície auxiliando no desenvolvimento e consequentemente na formação de biofilmes, inclusive mais aderidos.

7. SUGESTÕES

- Acompanhar o nível de poluentes atmosféricos, tais como SOx, NOx, material particulado, entre outros, que afetam diretamente o desenvolvimento dos micro-organismos, bem como o processo corrosivo que ocorre nas superfícies dos materiais.

- Realizar ensaios considerando outros fatores climáticos de grande relevância como velocidade do vento, incidência de luz e índice ultravioleta.

- Avaliar condições microambientais, por exemplo caracterizar a chuva do local onde serão avaliadas próximas pesquisas.

- Avaliar outros patrimônios históricos.

- Fazer o acompanhamento do perfil microbiano em menores tempos.

- Avaliar outros revestimentos que minimizem a deterioração por influência química ou microbiológica.

- Buscar análises para avaliar o tempo de desgaste dos materiais.

- Avaliar o tempo de reaplicação de tintas.

- Avaliar o uso de tintas com novas tecnologias como nanopartículas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, J.M.V. Patologia em paredes de alvenaria: causas e soluções. In: Seminário sobre Paredes de Alvenaria, P.B. LOURENÇO et al. (eds.), 2007.

ALLEN, E.; IANO, J. Fundamentos de engenharia de edificações Materiais e métodos. 5ª ed. 2013.

ALLSOPP, D.; SEAL, K.; GAYLARDE, C.; BENTO, F. M.; SHIRAKAWA, M.; SAAD, D. S. Introdução a biodeterioração. Editora UFRGS. 2016.

APHA, AWWA, WEF – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WTER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. ed. Baltimore: APHA, AWWA, WEF, 2012.

ARAÚJO, L. C. A. Avaliação da corrosão induzida microbiológicamente em aço carbono AISI 1020 revestido com tinta pigmentada com óxido de nióbio. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

ASCASCO, C.; WIERZCHOS, J.; SDOUZA-EGYPSY, V.; DE LOS RÍOS, A.; DELGADO RODRIGUES, J. In situ evaluation of the biodeterioring action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of Jeronimos Monastery (Lisbon). Int Biodegrad Biodeterior. v. 49, n.1, p. 1-12, 2002.

ATKINS, P. W.; JONES, L. Princípios de Química. Questionando a vida moderna e o meio ambiente. Editora Bookman, 5ª edição, 2011.

ATLAS, R.E..M.; BARTHA, R. Microbial ecology: fundamenmentals and apllication. 4th ed. Benjamin Cummings, 1998, 694 p.

BARRIONUEVO, M. R. E. Biodeterioração produzida por biofilmes de fungos e cianobactérias nas ruínas jesuíticas das missões e avaliação do seu controle. Dissertação. Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

BEECH, I. B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms-current understanding and state-of-the art methods of study. Int Biodeterior Biodegrad. v. 53, n. 3, p. 177-183, 2004.

BESSA, L.S.; BOEL JUNIOR, M.; SOUZA, V.B.; ROSSAFA, T. F. Avaliação da qualidade sanitária de sementes de milho (Zea mays L.) relacionada à diferentes tamanhos e posição na espiga. Fitopatol Bras. v. 30(Suplemento): S80, 2005.

BERNARDI, E.; BOWDEN, D. J.; BRIMBLECOMBE, P.; KENNEALLY, H.; MORSELLI, L. The effect of uric acid on outdoor cooper and bronze. Sci Total Environ. v. 407, n. 7, p. 2383-2389, 2009.

BERNARDI, E.; CHIAVARI, C.; LENZA, B.; MARTINI, C.; MORSELLI, L.; OSPITALI, F.; ROBBIOLA. The atmospheric corrosion of quaternary bonzes: the leaching action of acid rain. Corrosion Sci. v. 51, n. 1, p. 159-170, 2009.

BRAGA, M. conservação e restauro pedra – pintura mural e pintura sobre tela autora. Editora Rio, 2003.

BRITO, N.M.; SILVA, E.E.; NASCIMENTO, L.C.; ARAÚJO, E.; NEVES, C.M.L.; ARAÚJO, E.N.; SOUTO, F.M. Avaliação de fungos em sementes de inhame oriundas do estado da Bahia. Fitopatol Bras. v. 30(Suplemento), S83, 2005.

BUCKOVÁ, M; PUSKAROVA A.; SCLOCCHI M.C.; BICCHIERI, M.; COLAIZZI, P.; PINZARI, F.; PANGALLO, D. Co-occurrence of bacteria and fungi and spatial partitioning during photographic materials biodeterioration. Polymer Degrad Stab. v. 108. N. 1, p. 1-11, 2014.

BURKI, F.; SCHALCHIAN-TABRIZI, K.; MINGE, M. SKAJAEVELAND, A.; NNIKOLAEV, S. I.; JAKOBSEN, K. S.; PAWLOWSKI, J. Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS One*. v. 2, n. 8, p. 790, 2007.

BURKOVSKI, A (Ed.) Corynebacterium: Genomics and molecular biology. 1st. ed. London: Caister Academic Press, 2008, 348p.

BUTLER, J.M. Advances topics in forensic DNA typing: Methodology. Amsterdam: Elsevier, 2011, 614p.

CAMPOS, P.H.O.V. Estudo de caracterização de pátinas em cobre e bronze com técnicas de PIXE e EDX-RF. 2010. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CANEVA, G.; NUGARI, M.P.; SALVADORI, O. Biology in the conservation of works of art . Roma: ICCROM, 1991.

CANEVA, G.; BARTOLI, F.; CESCHIN, S.; SALVADORI, O.; FUTAGAMI, Y.; SALVATI, L. Exploring ecological relatonships in the biodeterioration patterns of Angkor temples (Cambodia) along a forest canopy gradient. J Cultural herit. v. 16, n. 5, p. 728–735, 2015.

CAPODICASA, S.; FEDI, S.; PORCELLI, A.M.; ZANNONI, D. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th Century painting. Int Biodeterior Biodegrad. v. 64, n. p. 727-733, 2010.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J.; FIERER, N.; KNIGHT R. Global patterns of 16s rrna diversity at a depth of millions of sequences per sample. p. 4516–4522, 2010.

CARDELL, C.; RIVAS, T.; MOSQUERA, M.J.; BIRGINIE, J.M.; MOROPOULOU, A.; PRIETO, B.; SILVA, B.; VAN GRIEKEN, R. Patterns of damage in igneous and sedimentary rocks under conditions simulating sea-saltweathering. Earth Surface Proc Landforms. v. 28, n. 1, p. 1–14, 2003.

CARDOSO, S.P. Avaliação Experimental e Teórica de Potenciais Inibidores de Corrosão para Aço em Meio Ácido. Tese. Doutorado COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

CAVALCANTI, IRACEMA F. A. [*et al.*] organizadores. Clima e Tempo no Brasil. Oficina de Textos, São Paulo, 2009.

CHARACKLIS W.G.; MCFETERS G.A.; MARSHALL K. C. Physiological ecology of biofilm systems. In: Characklis WG, Marshall KC (eds) Biofilms. Wiley, New York, pp 341–393, 1990.

CHAUÍ, M. Convite à filosofia. 13ª ed. São Paulo: Ática. 2005, 216p.

CHEN, C.I.; MUELLER, R.; GRIEBE, T. Kinetics analyses of microbial sulphate reduction by Desulfovibrio desulfuricans in a anaerobic upflows porous media biofilm reactor. Biotechnol Bioeng. v. 43, n. 4, p. 267-274, 1994.

CHIAVARI, C.; BERNARDI, E.; MARTINI, C.; PASSARINI, F.; OSPITALI, F.; ROBBIOLA, L. The atmospheric corrosion of quaternary bronzes: the action of stagnant rain water. Corr Sci. v. 52, n. 9, p. 3002-3010, 2010.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. Ann Rev Microbiol. v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R. James G Biofilms, the customised microniches. J Bacteriol 176:2137–2142, (1994).

COUTINHO, M. L.; MILLER, A.Z.; GUTIERREZ-PATRICIO, S.; HERNADEZ-MARINE, M.; GOMEZ-BOLEA, A.; ROGERIO-CANDELERA, M.A; PHILIPS, A. J. L.; JURADO, V.; SAIZ-JIMENEZ, C.; MACEDO, M. F. Microbial communities on deteriorated artistic tiles from Pena National Palace (Sintra, Portugal). Int Biodeterior Biodegrad. v. 84, p. 322-332, 2013.

COUTINHO M.L.; MILLER A.Z.; MACEDO M.F. Biological colonization and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview. J Cultural Heritage, v. 16, p. 759 - 777, 2015.

CRISPIM, C.A.; GAYLARDE, C.C.; GAYLARDE, P.M. Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria. Int Biodeterior Biodegrad. v. 54, n. 2-3, 121-124, 2004.

CRISPIM, C.A.; GAYLARDE, P.M.; GAYLARDE, C.C. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. CurrentMicrobiology, v. 46, n. 2, p. 79–82, 2003.

CUNHA, C. R. Alois Riegl e "O culto moderno dos monumentos". Revista Centro de Preservação Cultural, São Paulo, v.1, n.2, p.6-16, maio/out. 2006.

CUTLER, N. A.; OLIVER, A. E.; VILES, H. A.; AHMAD, S.; WHITELEY, A. S. The characterisation of eukaryotic microbial communities on sandstone buildings in Belfast, UK, using TRFLP and 454 pyrosequencing. Int Biodeterior Biodegrad. v.82, p. 124-133, 2013.

CUZMAN, O. A.; FARALONI, C.; PINNA, D.; RIMINESI, C.; SACCHI, B.; TIANO. P.; TORZILLO, G. Evaluationof treatments efficiency against lichens growing on monumental stones by electrical conductivity. Int Biodeterior Biodegrad. v. 84. p. 314-321, 2013.

DAKAL, T.C.; CAMEOTRA, S.S. Geomicrobiollogyof cultural monuments and at works: Mechanism of biodeterioration, bioconversion strategies and applied molecular approaches. In: MASON, A.C.

(Ed.). Biorremediation, Biotechnology, Engineering, and Environment Management. New York: Nova Science Publishers, 2011, 499p.

DAKAL, T.C.; CAMEOTRA, S.S. Microbially induced deterioration of architectural heritages: Routes and mechanisms involve. Environ Sci Eur. v. 24, n. 36, p. 1-13, 2012.

DANTAS, R.M.M.C. Casa Inca ou pavilhão da Amazônia? A participação do Museu Nacional na exposição universal internacional de 1889 em Paris. Tese. Doutorado em História das Ciências e das Técnicas e Epistemologia. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J. M. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Frontiers in Microbiology. V. 6, n. 392, p. 1-10, 2015.

DE FRANÇA F.P.; DIAS D.S.B.; DE MELO, I.R. Effect of introduction of CO2 on the formation of biofilms/biocorrosion on AISI 1018 carbon steel surfaces exposed in a dynamic system. ln: CORROSION 2009, 2009., Atlanta. Anais… Atlanta: NACE, 2009, p. 1-9.

DE LA ROSA-GARCÍA, S.C.; ORTEGA-MORALES, O.; GAYLARDE, C.C.; BELTRÁN-GARCÍA, M.; QUINTANA-OWEN, P.; REYES-ESTEBANEZ, M. Influence of fungi in the weathering of limestone of Mayan anmonuments. Revista Mexicana de Micología. v. 33, p. 43-51, 2011.

DIAS, D.S.B. Avaliação de parâmetros na corrosão microbiologicamente induzida do aço carbono AISI 1018. Monografia. Graduação em Engenharia Química, Universidade federal do Rio de Janeiro, 2009.

DONÁDIO, A.; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS FABRICANTES DE TINTAS (ABRAFITI). Manual básico sobre tintas. 1ª ed. São Paulo: ABRAFITI, 2011, 15p.

EDWARDS, K.J.; HU, B.; HAMERS, R.J.; BANFIELD, J.F. A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. FEMS Microbiol Ecol. v. 34, n. 3, p. 197-206, 2001.

EMERY PHARMASERVICES. Disponível em <http:// https://www.scienceexchange.com/labs/emery-pharma-services>. Acesso em 05 maio 2016.

ESPINOSA MARZAL, R.M.; FRANKE, L.; DECKELMANN, G. Model for the mechanical stress due to the salt crystallization in porous materials. Constr Build Mater. v. 22, p. 1350-1367, 2008.

FAGUNDES NETO, J.C.P.; GULLO, M.A.; GOMIDE, T.L.F. Engenharia diagnóstica em edificações. 2ª ed., 2015, 424p.

FANG, H.H.P., XU, L.C.; CHAN, K.Y. Effects of toxic metals and chemicals on biofilms and biocorrosion. Wat Res: Oxford, v. 36, n. 19, p. 4709-4716, 2002.

FAZENDA, J. M. R. Tintas: ciência e tecnologia. 4ª ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2009, 1145p.

FONSECA, A.J.; PINA F.; MACEDO, M.F.; LEAL, N.; ROMANOWSKA-DESKINS, A.; LAIZ, L.; GÓMEZ-BOLEA, A.; SAIZ-JIMENEZ, C. Anatase as an alternative application for preventing

biodeterioration of mortars: Evaluation and comparison with other biocides. Int Biodeter Biodegrad. v. 64, n. 5; p. 388-396, 2010.
FRANÇA, F.P.; DIAS, D.S.B.; MELO, I.R.; LUTTERBACH, M.T.S. Effect of introduction of CO2 on the formation of biofilm/biocorrosion on AISI 1018 carbon steel surfaces exposed in a dynamic system. ln: CORROSION 2009 CONFERENCE & EXPO, Atlanta, 2009. Anais..., 2009.

FRASCÁ, M.H.B.O.; YAMAMOTO, J.K. Accelerated weathering of granite building stone by sulfur dioxide exposure. In: KWIATKOWSKI, D.; LÖFVENDAHL, R. Proceedings of the 10th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 1. ICOMOS, Estocolmo, 68–74, 2004.

FRIEDEMANN, M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol.* v. 116, n. 1, p. 1-10, 2007.

FUNDARPE – FUNDAÇÃO DE PATRIMÔNIO ARTÍSTICO E HISTÓRICO DE PERNAMBUCO. Disponível em <http://cultura.pe.gov.br>.

FUNKE, G.; HUTSON, R.A.; BERNARD, K.A.; PFYFFER, G.E.; WAUTERS, G.; COLLINS, M.D. Isolation of Arthobacter spp. from clinical specimens and description of Arthobacter cumminsii sp. nov. and Arthobacter woluwensis sp. nov. J Clin Microbiol. v. 34, n. 10, p. 2356-2363, 1996.

GAURI, L. Decay and preservation of stone in modern environments. Env Geol Wat Sci. v. 15, n. 1, p. 45-54, 1992

GAYLARDE, C.; MORTON, G. Biodeterioration of mineral materials. In: BRITTON, G. (Ed.). Encyclopedia Environmental Microbiology, v. 6. New York: John Wiley& Sons, p. 516–528, 2002.

GAYLARDE, C.C; GAYLARDE, P.M. A rapid method for the detection of algae and cyanobacteria on the external surfaces of buildings. Paper n° 37. In GAYLARDE, C.C.; BARBOSA, T.C.; GABILAN, H.N. Proceedings of Third Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium, The Phycological Society, UK., 1998.

GAYLARDE, P.M., GAYLARDE, C.C. Colonization sequence of phototrophs on painted walls in Latin America. Int Biodeter Biodegrad. v. 44, p. 168, 1999.

GAYLARDE, P.; ENGLERT, G.; ORTEGA-MORALES, O.; GAYLARDE, C. Lichen-like colonies of pure Trentepohlia on limestone monuments. Int Biodeter Biodegrad. v. 58, n. 3-4, p. 119-123, 2006.

GAYLARDE, P.M.; GAYLARDE, C.C.; GUIAMET, P.S.; GOMEZ DE SARAVIA, S.G.; VIDELA, H.A. Biodeterioration of Mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. Biofouling. v. 17,n. 1, p. 41–45, 2001.

GAYLARDE C.C.; GAYLARDE, P. M. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. Int Biodeterior Biodegrad. v. 55, n. 2, p. 131-139, 2005.

GAYLARDE, C.C.; MORTON, L.H.G.; LOH, K.; SHIRAKAWA, M.A. Biodeterioration of external architectural paint films e a review. Int Biodeterior Biodegrad. v. 65, n. 8, p. 1189-1198, 2011.

GAZZANO, C.; FAVERO-LONGO S.E.; IACOMUSSI, P.; PIERVITTORI, R. Biocidal effect of lichen secondary metabolites against rock-dwelling microcolonial fungi, cyanobacteria and green algae. Int Biodeter Biodegrad. v. 84, p. 300–306, 2013.

GENHARTDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KIEG, N. R. Methods for general and molecular bacteriology. 1st ed. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 791p.

GENNARO, M.; CALCATERRA, D.; CAPPELLETTI, P.; LANGELLA, A.; MORRA, V. Building Stone and related weathering in the architecture of the ancient city of Naples. J Cultural Heritage. v. 1, n. 4, p. 399-414, 2000.

GENTIL, V. Corrosão. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011, 353Pp.

GHIRARDELLO, N.; FARIA, G.G.M.; SPISSO, B.; SHOPIA, P.E.M.; IGNATIOS, R.P.V.; HADECKI, H.S. Patrimônio Histórico: Como e por que preservar. 1ª ed. Bauru: Canal 6 / Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008. v. 7000. 34.

GHOBADI, M.H.; BABAZADEH, R. An investigation on the effect of accelerated weathering on strength and durability of Tertiary sandstones (Qazvin province, Iran). Environ Earth Sci. v. 73, n. 8, p. 4237–4250, 2015.

GIL, H.; CALDERÓN, J. A.; BUITRAGO, C. P.; ECHAVARRÍA, A.; ECHEVARRÍA, F. Indoor atmospheric corrosion of electronic materials in tropical-mountain environments. Corr Sci. v. 52, n. 2, p. 327-337, 2010.

GONZÁLEZ, R. F.; DE BUERGO, M. A.; MARTÍN, F.M.; DE AZCONA, M. C. L. Stone decay in 18th Century monuments due to iron corrosion. The Royal Palace, Madrid (Spain). Build Environ. v. 39, n. 3, p. 357-364, 2004.

GORBUSHINA, A.A. Fungal activities in subaerial rock-inhibiting microbial communities. In: GAAD, G.M. Fungi and Biochemical cycles. Cambridge: Cambridge University Press, 2004, 288p.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. The Genus Serratia," Prokaryotes. Scientific Research. v. 6, 2006, p. 219-244, 2006.

GROSSI, C.; ESBERT, R.; SUÁREZ DEL RIO, R.; MONTOTO, M.; LAYRENZI-TABASSO, M. Sulphate crystallization in monumental porous carbonate stone. Stud Conserv. v. 42, n. 2, p.115-125, 1997.

GUIAMET P.; BORREGO, S.; LAVIN, P.; PERDOMO, P.; I SARAVIA, S. G. Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentine and at the National Archive of the Republic of Cuba. Colloid Surf B: Biointerfaces. v. 85, n. 2, p. 229–234, 2011.

GUIAMET, P.; CRESPO, M.; LAVIN, P.; PONCE, B. GAYLARDE, C.; SARAVIA, S.G. Biodeterioration of funeral sculptures in La Recoleta Cemetery, Buenos Aires, Argentina: Pre- and post-intervention studies. Colloid Surf B: Biointerfaces. v. 101, p. 337– 342, 2013.

HELENE, P.R.L. Corrosão em armaduras para concreto armado. São Paulo: Pini: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1986.

HERNÁNDEZ, R.P.B.; PÁSZTI, Z.; DE MELO, H.G.; AOKI, I.V. Chemical characterization and anticorrosion properties of corrosion products formed on pure copper in synthetic rainwater of Rio de Janeiro and São Paulo. Corr Sci. v. 52, n. 3, p. 826-837, 2010.

HERRERA, L.K.; ARROYAVE, C.; GUIAMET, P.; DE SARAIVA, S.G.; VIDELA, H. Biodeterioration of peridotite and other constructional materials in a building of the Colombian cultural heritage. Int Biodeter Biodegrad. v. 54, n. 2-3, p. 135-141, 2004.

HERRERA, L.K.; VIDELA, H.A. Surface analysis and materials characterization for the study of biodeterioration and weathering effects oncultural property. Int Biodeter Biodegrad. v. 63, p. 813-822, 2009.

HERRERA, L. K.; VIDELA, H. The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials. Int Biodeter Biodegrad. v. 54, n. 2-3, p. 125-134, 2004.

HERRERA, L.K.; ARROYAVE, C.; VIDELA, H.A. Atmospheric and biological deterioration of two churches from the cultural heritage of the city of Medellín, Colombia. In: SAIN-JIMENEZ, C. (Ed.). Molecular biology and cultural heritage. Lisse: A.A. Balkema Publishes, 2003, p.271-276.

HEYRMAN, J.; VERBEEREN, J.; SCHUMANN, P.; SWINGS, J; DE VOS, P. Six novel Arthrobacter species isolated from deteriorated mural paintings. Int J Syst Evol Microbiol. v. 55, n. 4, p. 1457-1464, 2005.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTIA. Disponível em: http://www.ibge.gov.br>.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em <http://www.inmet.gov.br>.

ISFG - INTERNACIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS. Disponível em: <http://www.ispg.org>.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Method 9223. Corrosion of metals and alloys – corrosivity of atmospheres – classification, 1992, 13p.

JAMBO, H. C. M.; FÓFANO, S. Corrosão - fundamentos, monitoração e controle. 1ª ed. (revisada). Rio de Janeiro: Ciência Moderna, 2009, 342p.

JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; SIMPSON, J.A. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of Pestalotiopsis species. Molec Phylogenetic Evol. v. 27, n. 3, p. 372–383, 2003.

JONES, J. G., W. DAVISON, AND S. GARDENER. Iron reduction by bacteria: range of organisms involved and metals reduced. FEMS Microbiol Lett. v. 21, n. 1, p. 133-136, 1984.

JURADO V.; MILLER A.Z.; CUEZVA S.; FERNANDEZ-CORTES A.; BENAVENTE D.; ROGERIO-CANDELERA M.A.; REYES J.; CAÑAVERAS J.C.; SANCHEZ-MORAL S.; SAIZ-JIMENEZ, C. Recolonization of mortars by endolithic organisms on the walls of San Roque church in Campeche (Mexico): A case of tertiary bioreceptivity. Construct Build Mat. v 53, p. 348–359, 2014.

KOESTLER, R.J.; VEDRAL, J. Biodeterioration of cultural property: A bibliography. Int Biodegrad Biodeterior. v. 28, n. 1-4, p. 229-340, 1991.

KORKANÇ, M. Deterioration of different stones used in historical buildings within Nigde province, Cappadocia. Construct Build Mat. v. 48, p. 789–803, 2013.

KÜHL, B.M. História e Ética na Conservação e na Restauração de Monumentos Históricos Revista Centro de Preservação Cultural, São Paulo, v.1, n.1, p. 16-40, 2006.

KUMAR, R.; KUMAR, A.V. Biodeterioration of stone in tropical environments: An overview. Los Angeles: Getty Conservation Institute, 1999, 96p.

LIAMLEAM, W.; ANNACHHATRE, A.P. Electron donors for biological sulfate reduction. Biotechnol Adv. v. 25, n. 5, p. 452-463, 2007.

LOPES, C.V.G.; CARVALHO, F.J.P.C.; KRIEGER, N. Deterioração: ataque de microorganismos a monumentos históricos. Ciência Hoje. dez 2003, p. 34-39.

LOPEZ-ARCE, P.; GARCIA-GUINEA. J. Weathering traces in ancient bricks from historic buildings. Build Environ. v. 40, n. 4, p. 929-941, 2005.

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

MA Y.; HU A. B.; CHANG-PING Y. B.; YAN Q. A; XIZHU YAN A; WANG Y. A; FEI DENG A; HEJIAN XIONG C. Response of microbial communities to bioturbation by artificially introducing macrobenthos to mudflat sediments for in situ bioremediation in a typical semi-enclosed bay, southeast China. Mar Pollut Bull. v. 94, n. 1-2, p. 114–122, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12ª ed. Porto Alegre: Rio de Janeiro, 2010, 1128p.

MANSUR, K.L.; CARVALHO, I.S.; DELPHIM, C.F.M.; BARROSO, E.V. O gnaisse facoidal: a mais carioca das rochas. Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ, v. 31, n. 2, p. 9-22, 2008.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Environmental Microbiology. San Diego: Academic Press, 2000, 786p.

MAPELLI, F.; MORASCO, R.; BALLOI, A.; ROLLI, E.; CAPPITELLI, F.; DAFFINCHIO, D.; BORIN, S. Mineral-microbe, interactions: biotechnological potential of bioweathering. J Biotechnol. v. 157, n. 4, p. 473-481, 2012.

MATOS, G. I. Avaliação da comunidade microbiana cultivável e atividade biodegradadora na biorremediação de solos contaminados com diesel B5 e biodiesel (B100). Tese. Doutorado em Tecnologia de Processos químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

MELLO, V. M.; SUAREZ, P. A. Z. As formulações de Tintas Expressivas Através da História. Revista Virtual de Química. v.4, n 1, 2012.

MILLER, A.Z.; SANMARTÍN, P.; PEREIRA-PARDO, L.; DIONÍSIO, A.; SAIZ-JIMENEZ, C.; MACEDO, M.F.; PRIETO B. Bioreceptivity of building stones: A review. Science of the Total Environment. v. 426, p. 1–12, 2012.

MIRANDA, E.; BETHENCOURT, M.; BOTANA, F. J.; CANO, M. J.; FERDEAU, M. L.; OLLIVIER, B. Biocorrosion of carbon stell alloys by hydrogenotrophic sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio capillatus isolated from a Mexico oil field separator. Corr Sci. v. 48, n. 9, p. 2417-2431, 2006.

MOREIRA, A.F.B. Currículo, diferença cultura e diálogo. Educação e Sociedade, Campinas: CEDES, v. 23, n. 79, p. 15-38, 2003.

MORENO, J. D.; BONILLA, M.; ADAM, J. M.; BORRACHERO, M. V.; SORIANO, L. Determining corrosion levels in the reinforcement rebars of buildings in coastal areas. A case study in the Mediterranean coastline. *Construct Build Mat*. v. 100, p. 11-21, 2015.

MULVIN, L.; LEWIS, J. O. Architectural detailing, weathering and stone decay. *Build Environ*. v. 29, n. 1, p. 113-138, 1994.

NAGIUB, A.; MANSFELD, F. Evaluation of microbiologically influenced corrosion inhibition using electrochemical noise analysis. Corr Sci. v. 43, n. 11, p. 2000-2009, 2001.

NASA- NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMNISTRATION. Fundamentals of corrosion and corrosion control. Disponível em: <http:// http://corrosion.ksc.nasa.gov/corr_fundamentals.htm>. Acesso em 22 jun 2013.

NEALSON, K. H.. Microbial oxidation and reduction of manganese an iron. In: WESTBROEK, P.; DE JONG, E.W. (Ed.) Biomineralization and biological metal Acumulation. Dordrecht: Kluwe academic Publishers, 1983, p. 459–479.

NEVILLE, A. M. Propriedades do concreto. 5ª edição, 2015.

NUHOGLU, Y.; OGUZ, E.; USLU, H.; OZBEK, A.; IPEKOGLU, B.; OCAK, I.; HASENEKOGLU, I. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. Sci Total Environ. v. 364, n. 1-3, p. 272– 283, 2006.

O'TOOLE, E.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

OLIVEIRA, M.F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação. Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

OLIVEIRA, M.M. Tecnologia da conservação e da restauração - materiais e estruturas um roteiro de estudos. 2011

ORNEK, D., WOOD, T.K., HU, C.H.; MANSFELD, F. Corrosion control using regenerative biofilms (CCURB) on brass in different media. Corr Sci. v. 44, p. 2291-2302, 2002.

PANGALLO, D.; CHOVANOVA, K.; SIMONOVICOVA, A.; FARINE, P. Investigation of microbie community isolated from indoor atworks and their environment: identifications, biodegradative abilities and DNA typing. Canadian Journal of Microbiology. v. 55, p. 277-287, 2009.

PAPIDA, S.; MURPHY, W.; MAY, E. Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations. Int Biodeter Biodegrad. v. 46, p. 305-317, 2000.

PEPE, O.; SANNINO, L.; PALOMBA, S.; ANASTASIO, M.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F.; MOSCHETTI, G. Heterotrophic microorganisms in deteriored medieval wall paintings in southern Italian churches. Microbiol Res. v. 165, n. 1, p. 21-32, 2010.

PERCIVAL, S.L.; MALIC, S.; CRUZ, H.; WILLIAMS, D.W. Introduction to Biofilms. Biofilms and Veterinary Medicine, chapter 2, Springer Series on Biofilms, Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, p. 41-68, 2011.

PFLEEGOR, A. G; SEIFRIED, C. S.; SOEBBING, B. P. The moral obligation to preserve heritage through sport and and recreation facilities. Sport Manag Rev. v. 16, n. 3, p. 378-387, 2013.

PIÑAR, G.; GARCIA-VALLES, M.; GIMENO-TORRENTE, D.; FERNADEZ-TURIEL, J.L.; ETTENAUER, J.; STERFLINGER, K. Microscopic, chemical, and molecular-biological investigation of thedecayed medieval stained window glasses of two Catalonian churches. Int Biodeterior Biodegrad. v. 84, p. 388-400, 2013.

PINHEIRO, A.C.; OLIVEIRA, B. P.; VERÍSSIMO, C.; BRANDÃO. J.C.; ROSADO. L.; JURADO, V.; MACEDO, M.F. Identification of a fungal community on gilded wood carved heritage. J Cult Heritage. v. 14, n. 1, p. 76–81, 2013.

PITRE, M.C.; CORREIA, P.M.; MANKOWSKI, P.J.; KLASSEN, J.; DAY, M. L.; LOVELL, N.C.; CURRAH, R. Biofilm growth in human skeletal material from ancient Mesopotamia. J Archaeol Sci. v. 40, n. 1, p. 24-29, 2013.

PITZURRA, L.; MORIONI, B.; NOCENTINI, A.; SBARAGLIA, G.; POLI, G.; BISTONI, F. Microbial growth and air pollution in carbonate rock weathering. Int Biodegrad. v. 52, n. 2, p. 63-68, 2003.

POLIKRETI, K.; ARGYROPOULOS, V.; CHARALAMBOUS, D.; VOSSOU, A.; PERDIKATSIS, V.; APOSTOLAKI, C. Tracing correlations of corrosion products and microclimate data on outdoor bronze monuments by principal component analysis. Corr Sci. v. 51, n. 10, p. 2416-2442, 2009.

RESENDE, M.A.; REZENDE, G. de C.; VIANA, E.V.; BECKER, T.W.; WARSCHEID, T. Acid production by fungi isolated from historic monuments in the Brazilian state of Minas Gerais. In: GAYLARDE, C.C., SÁ, E.L.S. de; GAYLARDE, P.M. (Eds.). Biodegradation & Biodeterioration in Latin America. Porto Alegre: Mircen/UNEP/UNESCO/ICRO-FEPAGRO/UFRGS, 1996, p. 65–67.

RIVAS, T.; PRIETO, B.; SILVA, B.; BIRGINIE, J.M. Weathering of granitic rocks by chlorides: effect of the nature of the solution on weathering morphology. Earth Surf Proc Landforms. v. 28, n. 4, p. 425–436, 2003.

ROGEL, M.A.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; KUYKENDALL, L.D.; BALKWILL, D.L.; MARTÍnEZ-ROMERO, E. Nitrogen fixing nodules with Ensifer adhaerens harboring Rhizobium tropici symbiotic plasmids. Appl Environ Microbiol. v. 67, n. 7, p. 3264–3268, 2001.

ROSADO, T.; GIL, M.; MIRÃO, J.; CANDEIAS, A.; CALDEIRA, A.T. Oxalaate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms – A comprehensive study. Int Biodeterior Biodegrad. v. 85, n. 1, p. 1-7, 2013.

ROSADO T.; CANDEIRAS A.; CALDEIRA, A. T.; MIRÃO J.; GIL, M. Evaluation of mural paintings biodeteriorations by oxalate formation. Science and Technology for the Conservation of Cultural heritage. v. 1 , p. 147 - 151, 2013

ROSA-GARCÍA, D.L.S.C.; ORTEGA-MORALES, O.; GAYLARDE, C.C.; BELTRÁN-GARCÍA, M.; QUINTANA-OWEN, P.; REYES-ESTEBANEZ, M. Influence of fungi in the weathering of limestone of Mayan monuments. Revista mexicana de Micología, v. 33, p. 43-51, 2011.

SADDIQUE, R.; CHAHAL, N.K. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. Construc Build Mat. v. 25, n. 10, p. 3791-3801, 2011.

SALVATO, M.; BALDAN, E.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; BORIN M. Degradation of 2,6-Diisopropylnaphtalene (DIPN) with macrophytes inoculated with bacteria. In Has waste Magnagement. P. 35, 2008.

SANCHÉS-MORAL, S.; LUQUE, L.; CUEZVA, S.; SOLER, V.; BENAVENTE, D.; LAIZ, L.; GONZÁLES, J. M.; SAIZ-JIMENEZ. Deterioration of building materials in Roman catacombs: the influence of visitors. Sci Total Environ. v. 349, n. 1-3, p. 260-276, 2005.

SAND, W.; JOZSA, P-G.; MANSCH, R. Weathering, Microbiol. In: BRITTON, G. (Ed.). Environmental Microbiology, vol. 6, New York: John Wiley& Sons, pp. 3364–3375, 2002.

SARRÓ, M.I.; GARCÍA, A.M.; RIVALTA, V.M,; MORENO, D.A.; ARROYO, I. Biodeterioration of the lions fountain at the Alhambra palace, Granada (Spain). Build Environ. v. 41, n. 12, p. 1811-1820, 2006.

SCHMIDT, C.S.; ALAVI, M.; CARDINALE, M.; MÜLLER, H.; BERG, G. Stenotrophomonas rhizophila DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. Biol Fertil Soils. v. 48, p. 947–960, 2012.

SCHÜTTE, U.; ABDO, Z.; BENT, S.; SHYU, C.; WILLIAMS, C.; PIERSON, J.; FORNEY, L. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Appl Microbiol Biotechnol. v. 80, p. 365-380, 2008.

SCOTT-CLARK, C.; KUMAR, A.; MOHAPATRA, P.; RAJANKAR, P.; NYCZ, Z.; HAMBARTSUMYAN, A.; ASTANINA, L.; RODA, S.; LIND, C.; MENRATH, W.; PENG, H. Examination of lead concentrations in new decorative enamel paints in four countries with diferente histories of activity in lead paint regulation. *Env Res.* v. 132, n. 7, p. 232-243, 2014.

SCOT-CLARK, C.; RAMPAL, K. G.; THUPPIL, V.; RODA, S. M.; SUCCOP, P.; MENRATH, W.; CHEN, C. K.; ADEBAMOWO, E. O.; AGBEDE, O. A.; SHIDHAR, M. K. C.; ADEBAMOWO, C. A.; ZAKARIA, Y.; EL-SAFTY, A.; SHINDE, R. M.; YU, J. Lead levels in new enamel household paints from Asia, Africa and South America. *Environ Res*. v. 107, n. 7, p. 930-936, 2009.

SHIRAKAWA, M.A.; GAYLARDE, C.C.; SAHÃO, H.D.; LIMA, J.R.B. Inhibition of Cladosporium growth on gypsum panels treated. Int Biodeterior Biodegrad. v. 85, p. 57-61, 2013.

SHIRAKAWA, M.A.; GAYLARDE, C.C.; GAYLARDE, P.M.; JOHN, V.; GAMBALE, W. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. FEMS Microbiol Ecol. v. 39, n. 2, p. 165-173, 2002.

SHIRAKAWA, M.A.; JOHN, V.M.; CINCOTTO, M.A. Biodeterioração de ambiente construído. In: MELO, I.S.; AZEEDO, J.L (Ed.). Microbiologia Ambiental. 2ª ed. Jaguariúna: EMBRAPA. Cáp. 21, p. 478-499, 2008.

SHIRAKAWA, M.A.; JOHN, V.M.; SILVA, M.E.S.; GAYLARDE, C.C. Biodeterioration of painted mortar surfaces in tropical urban and coastal situation: comparison of four paint formulations. Int Biodeter Biodegrad. v. 65, p. 669-674, 2011.

SILANES, L.; ETAYO, M.E.; PÁZ-BERMUDEZ, G. Pronectria pilosa (Hypocreaceaea) sp. nov. and other lichenicolous fungi found on Collemataceae in the Iberian Peninsula. The Bryologist. v. 112, n. 1, p. 101-108, 2009.

SOARES, H. Monumentos do Rio de Janeiro rememoram a história da cidade. Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro.18/02/2015. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/web/guest/exibeconteudo?id=5206637>. Acesso: 12 jul 2016.

SRIVASTAVA, R. B. Interfacial phenomena in biocorrosion. Pure Appl Chem. v. 70, n. 3, p. 627-632, 1998.

STAROSVETSKY, D.; ARMON, R.; YAHALOM, J.; STAROSVETSKY, J. Pitting corrosion of carbon steel caused by iron bacteria. Int Biodeterior Biodegrad. v. 47, n. 2, p. 79-87, 2001.

STEINBAUER, M. J.; GOHLKE, A.; MAHLER, C.; SCHMIEDINGER, A.; BEIERKUHNLEIN, C. Quantification of wall surface heterogeneity and its influence on species diversity at medieval castles – implications for the environmentally friendly preservation of cultural heritage. Journal of Cultural Heritage. v. 14. p. 219–228, 2013.

STERFLINGER K.; ETTENAUER, J.; PIÑAR, G. Bio-susceptibility of materials and thermal insulation systems used for historical buildings. Energ Procedia. v. 40, p. 499-506, 2013.

STEIGER, M.; CHAROLA, A.E. Weathering and deterioration. In: SIEGESMUND, S.; SNETHLAGE, R. (Ed.). Stone in Architecture, 4th Ed. Chapter 4. Berlin: Springer Verlag, 2011, p. 227-316.

SUIHKO, L.M.; ALAKOMI, L.H.; GORBUSHINA, A.A.; FORTUNE, I.; MARQUARDT, J.; SAARELA, M. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. Syst Appl Microbiol. v. 30, n. 6, p. 494-508, 2007.

TAVIN, K. M. If you see something, say something: visual events at the visual culture gathering. Visual Arts Res. v. 32, n. 2, p. 2-6, 2004.

TELEGDI, J.; SHABAN, A.; KÁLMÁN, E. EQCM study of copper and iron corrosion inhibition in presence of organic inhibitors and biocides. Electrochem Acta. v. 45, n. 22-23, p. 3639-3647, 2000.

THONG, C. C.; TEO, D. C. L.; NG, C. K. Application of polyvinyl alcohol (PVA) in cement-based composite materials: a review of its engineering properties and microstructure behavior. *Construct Build Mat*. v. 107, n. 15, p. 172-180, 2016.

TOMAZ, P. C. A preservação do patrimônio cultural e sua trajetória no Brasil. Revista de História e Estudos Culturais. v. 7, n. 2, p. 1-12, 2010.

TORRES, E. S. Cinética de parâmetros microbiológicas na formação de biofilmes. Dissertação. Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

TORTORA, G. J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. Microbiologia. 12ª edição. Editora ARTMED, 2016.

URZI, C.; LEO, F. de; HOW, S. de; STERFLINGER, K. Recent advances in the molecular biology and ecophysiology of meristematic stone in habiting fungi. In: CIFERRI, O.; TIANO, P.; MASTROMEI, G. (Eds.). Of Microbes and Art: The role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage. New York: KluwerAcademic/Plenum Publisher, 2000, p. 3–21.

VAN LOORDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W.; SEHNDER, A.J.B. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiol Rev. v. 54, n. 1, p. 75-87, 1990.

VASCONCELOS, U. Tratamento microbiológico sequencial de solo proveniente de unidade de dessorção térmica. Tese. Doutorado em Tecnologia de Processos químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

VIDELA, H.A.; GUIAMET, P.S.; DE SARAIVA, S.G. Biodeterioration of Mayan archeological sites in Península, Mexico. Int Biodeterior Biodegrad. v. 46, n. 4, p. 335-341, 2000.

VIDELA, H.A.; GUIAMET, P.S.; GOMEZ DE SARAVIA, S.G. Mechanisms of microbial biodeterioration of limestone in Mayan buildings. Corrosion/2001, paper no. 01250, Houston: NACE International, 2001.

VIDELA, H.A. Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de materiais. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2003, 160p.

VIDELA, H.A. Prevention and control of biocorrosion. Int Biodeterior Biodegrad. v. 49, n. 4, p. 259-270, 2002.

VIERA, M.R.; GUIAMET, P.S.; DE MELE, M.F.L.; VIDELA, H.A. Use of dissolved ozone for controlling planktonic and sessile bacteria in industrial cooling systemas. Int Biodeterior Biodegrad. v. 44, n. 4, p. 201-207, 1999.

VIVAR, I.; BORREGO, S; ELLIS, G.; MORENO, D.A.; GRACÍA, A.M. Fungal biodeterioration of color cinematographic films of the cultural heritage of Cuba. Int Biodeterior Biodegrad. v. 84, p. 372-380, 2013.

WARSCHEID, T.H.; BRAAMS, J. Biodeterioration of stone: a review. Int Biodeterior Biodegrad. v. 46, n. 4, p. 343-368, 2000.

WIKTOR, V.; DE LEO, F.; URZÌ, C.; GUYONNET, R.; GROSSEAU, P.H.; GARCÍA-DIAZ, E. Accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of cementitious matrix. Int Biodeterior Biodeghrad. 63, n. 8, p. 1061-1065.

WU, J-Z. Research status of molecular Biology in Flax. J Northeast Agric Univ. v. 23, n. 1, p. 89-96, 2016.

ZANATTA, E.M. Conservação e restauração: a coleção de chapéus do Museu Imperial. Petrópolis: Museu Imperial, 2010. Disponível em: <http://www.culturaniteroi.com.br/macniteroi>. Acesso 05 jul 2016.

ANEXO A. Meios de cultura e soluções

- Solução redutora: Tioglicolato de Sódio (0,124 g/L); Ácido ascórbico (0,10 g/L); Resazurina (4,0 mL/L de solução 0,025g/L), pH 7,8 (DIAS, 2009).

- Aeróbias cultiváveis totais: caldo nutriente: peptona de carne (5,0 g/L); extrato de carne (3,0 g/L); sacarose (20,0 g/L), pH = 7,0 (DIAS, 2009).

- Aeróbias produtoras de ácido: caldo vermelho de fenol glicosado: peptona de caseína (5,0 g/L); peptona de carne (5,0 g/L), vermelho de fenol (0,018 g/L); glicose (5 g/L), pH =7,4 (DIAS, 2009).

- Ferrobactérias: Agar citrato férrico amoniacal: (NH4)2SO4 (0,50 g/L); NaNO3 (0,50 g/L); K2HPO4 (0,50 g/L); CaCl2 .2 H2O (0,134 g/L); MgSO4.7 H2O (0,50 g/L); Citrato Férrico Amoniacal (10,00 g/L), pH 6,6 (GENHARDT *et al*.,1994).

- Anaeróbios cultiváveis totais: meio fluido ao tio glicolato: glicose (5,0 g/L); peptona (4,0 g/L); extrato de levedura (1,0 g/L), resazurina (4,0 mL/L de solução 0,025g/L), pH = 7,6 (Silva, 2011).

- Anaeróbios produtores de ácido: caldo vermelho de fenol glicosado: peptona de caseína (5,0 g/L); peptona de carne (5,0 g/L), vermelho de fenol (0,018 g/L); glicose (5 g/L), pH =7,4 (DIAS, 2009).

- BRS: caldo Postgate E modificado: KH2PO4 (5,0 g/L); NH4Cl (1,0 g/L); Na2SO4 (1,0 g/L); CaCl2.2H2O (0,67 g/L); MgCl2.6H2O (1,68 g/L); extrato de levedura (7,0 g/L); lactato de sódio (1,0 g/L); ácido ascórbico (0,1 g/L); Agar (1,9 g/L); FeSO4.7H2O (0,5 g/L); resazurina (0,025% 4,0 mL), pH= 7,6 (SARRÓ *et al*.,2006).

- Algas: Meio modificado de Knop's-MKM KNO3 (1,25 g/L); KH2PO4 (1,25 g/L); MgSO4.7H2O (2,5 g/L); Fe2(SO4)3 (0,003 g/L); Citrato de sódio (0,3 g/L); e CaCl2.2H2O (0,0036 g/L); e 1 mL/L de solução de micronutrientes, pH 7,0 (GENHARDT *et al.*,1994).

- Solução de micronutrientes: H3BO3 (2,86 g/L); MnCl2.4H2O (1,81 g/L); ZnSO4.7H2O (0,222 g/L); Na2MoO4.2H2O (0,39 g/L); CuSO4.5H2O (0,079 g/L); e CoCl2.6H2O (0,045 g/L) (GAYLARDE *et al*., 2006).

- Cianobactérias: Meio modificado de Knop's-MKM (CRISPIM, *et al*., 2004).

- Algas e Cianobactérias: Meio Difco: NaNO3 (1,0 g/L); K2HPO4 (0,25 g/L); MgSO4.7H2O (0,51 g/L); NH4Cl (0,05 g/L); CaCl2 (0,058 g/L), Cloreto Férrico (0,008 g/L), pH 7,0 (GENHARDT *et al.*,1994).

- Actinobactérias: Agar Jausen; Glicose (2,0 g/L); Caseína (0,2 g/L); K2HPO4 (0,5 g/L); MgSO4.7H2O (0,2 g/L) Cloreto Férrico (0,02 g/L), pH 7,0 (OLIVEIRA, 2003).

- Actinobactérias: Agar 72C; Glicose (10,0 g/L); NH4Cl (1,0 g/L); K2HPO4 (5,65 g/L); KH2PO4 (2,38 g/L); MnCl2.4H2O (0,008 g/L); MgSO4.7H2O (1,0 g/L); FeSO4.7H2O (1,0 g/L), ZnSO4.7H2O (0,006 g/L); CuSO4.5H2O (0,002 g/L), pH 7,0 (OLIVEIRA, 2003).

- Actinobactérias: Agar Amido Caseína; Amido (10 g/L); KNO3 (2,0 g/L); KH2PO4 (2,0 g/L); MgSO4.7H2O (0,05 g/L); FeSO4.7H2O (0,01 g/L). pH 7,2.

- Fungos: Agar Sabouraud; Peptona (15 g/L); Dextrose (60,00 g/L), pH 5,6 (GENHARDT *et al.*,1994).

- Fungos: Agar extrato de malte: Extrato de Malte (30,00 g/L); Peptona (3,0 g/L), pH 5,6 (GENHARDT *et al.*, 1994).

- Fungos: Agar Czapeck: NaNO3 (1,0 g/L); Sacarose (30,0 g/L); K2HPO4 (1,0 g/L); MgSO4.7H2O (0,5 g/L); KCl (0,5 g/L); FeSO4.7H2O (0,01 g/L), pH 7,2 (GENHARDT *et al.*, 1994).

- Fungos: CYA: Extrato de levedura (1,0 g/L); NaNO3 (1,0 g/L); Sacarose (30,0 g/L); K2HPO4 (1,0 g/L); MgSO4.7H2O (0,5 g/L); KCl (0,5 g/L); FeSO4.7H2O (0,01 g/L), pH 6,7 (GENHARDT *et al.*,1994).

- Fungos: Agar Batata-Dextrose: Amido de batata (4,0 g/L); Dextrose (20,00 g/L), pH 5,6 (GENHARDT *et al*.,1994).

ANEXO B. Trabalhos publicados

DIAS, D. S. B.; SÉVULO, E. F. C.; LUTTERBACH, M. T. S. Biodeterioração do Jardim da princesa localizado no Museu nacional do Rio de Janeiro. IX Congreso latino-americano de corrosion – Latincorr, Medellín- Colombia, 28 a 31 de outubro de 2014.

DIAS, D. S. B.; VASCONCELOS, U.; LUTTERBACH M. T. S; CRAVO-LAUREAU, C.; SÉVULO, E. F. C. Sessile aerobic microbiota from the wall of the national museum, brazil: characterization and quantification. Canadian Journal of pure & applied sciences. V. 10, n. 3, p. 3941-3949, 2016.

DIAS, D.S.B.; CRAVO-LAUREAU, C.; DURAN, R.; CARBON, A.; LUTTERBACH, M. T. S.; SERVULO, E. F. C. Evaluation of coating and acid rain on the mortar corrosion by microbial consortia recovered from National Museum of Rio de Janeiro. Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium - Labs9, Rio de Janeiro- Brasil, 02 a 04 de outubro de 2016.

DIAS, D.S.B.; CRAVO-LAUREAU, C.; DURAN, R.; CARBON, A.; LUTTERBACH, M. T. S.; SERVULO, E. F. C. *Two Case Study of Biodeterioration of Museums in Rio de Janeiro.* Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium - Labs9, Rio de Janeiro- Brasil, 02 a 04 de outubro de 2016.