



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EMANUELLA MARIA DA CONCEIÇÃO**

**Biodeterioração microbiana de painéis de azulejos dos séculos XVI E XIX  
nas cidades de Recife e Olinda (Pernambuco, Brasil).**

Recife

2019

**EMANUELLA MARIA DA CONCEIÇÃO**

**Biodeterioração microbiana de painéis de azulejos dos séculos XVI E XIX  
nas cidades de Recife e Olinda (Pernambuco, Brasil)**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em 2019.

Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Co-orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Norma Buarque de Gusmão.

Recife

2019

Maria da Conceição, Emanuella .

Biodeterioração microbiana de painéis de azulejos dos séculos XVI e XIX nas cidades de Recife e Olinda (Pernambuco, Brasil) / Emanuella Maria da Conceição. - Recife, 2019.

133 : il., tab.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Buarque de Gusmão

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2019.

10.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Microbiologia. 2. Biotederioração microbiana. 3. Monumentos Históricos.

4. Painéis de Azulejos. I. , Prof.<sup>a</sup> Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

(Orientação). II. , Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Buarque de Gusmão. (Coorientação). IV.

Título.

570 CDD (22.ed.)

**EMANUELLA MARIA DA CONCEIÇÃO**

**Biodeterioração microbiana de painéis de azulejos dos séculos XVI E XIX  
nas cidades de Recife e Olinda (Pernambuco, Brasil).**

Aprovada em: 30/08/2019

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em 2019.

Comissão Examinadora

---

Dr<sup>a</sup> Teresinha Gonçalves da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Henry Socrates Lavallo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup> Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife  
2019

*“Dedico todo meu trabalho a minha família : minha mãe Maria da Conceição Neto, que é minha luz de todos os dias, aos meus irmãos José Brenno Gama da Silva, a quem cuidarei e amarei eternamente, e a Brenda Maria Gama da Silva, a quem eu dedico minha eterna saudade e imenso amor, ao meu padrasto José Carlos Gama da Silva, pelo apoio e incentivo ao longo desses anos e ao meu amado Nelson Lopes Amazonas Pires a quem eu escolhi para dividir uma vida”.*

## AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto produzir resultados, ajustar metodologias, analisar e discutir cada ponto para construir a tese, foi sem dúvida escrever os agradecimentos. Sim afirmo que este foi sem sombra de dúvidas um grande desafio também. Porque para mim, assim como para tantas outras pessoas, externalizar sentimentos através de palavras não é tarefa fácil, afinal de contas você pensa uma coisa, fala outra totalmente diferente e quem ouve pode entender outra coisa mais diferente ainda. Vou tentar esse desafio....

As professoras, Marcia Vanussa meu muito obrigado por sua imensa empatia por minha pessoa e ao meu trabalho. A professora Teresinha com toda sua classe, voz mansa e paciência aceitou a orientação, meu muito obrigada de coração. Professora Norma, muito obrigada por abrir as portas do seu laboratório, pelos conhecimentos científicos passados, porem principalmente obrigada pela garrafinha de água benta, as orações e as excelentes palavras de conselho espiritual. E ao professor Marcos, muito obrigada por esses nove anos de parceria e principalmente por aquela bolsa de iniciação científica e pela felicidade compartilhada ao saber da minha aprovação no Mestrado. Ao Prof Henry, muito obrigada por aceitar o convite e espero que seja apenas o início de uma sólida e longa parceria de trabalhos.

Aos meus amigos do Lamai, ao Erick que sua participação foi estatisticamente significante meu obrigada, a Persio ou melhor ao negão, que se faz de durão mas é uma das pessoas mais carinhosas e meigas que já conheci, obrigada por quebra os pedregulhos velhos e principalmente por aquele conversa na minha volta ao Lamai. A Tales por toda preocupação e atenção comigo você é um menino de ouro que Deus te abençoe sempre. A Guguio por ter me recebi na sua casa com um delicioso cuscuz enquanto discutíamos resultados da pesquisa. A Wellma por toda sua energia, alegria e risadas por causa da sua demência. Ao amigo Hugo por todos os momentos únicos vividos desde a Rural até hoje, principalmente obriga pelos parcelamentos de 10 ou 20 reais ajudaram muito. A Sarah a musa mais arengueira e humana, amiga obrigada por se fazer verdadeiramente presente em minha vida, nunca vou esquecer daquele o doce bolo que tirou o amargor das minhas lágrimas. A minha dedicada ex-estagiária com muito orgulho agora mestranda Vitória, obrigada por ter passado fome comigo para terminar os experimentos e entre tantos outros momentos que sem a sua participação não teria alcançado os objetivos do trabalho. Obrigada também a Ninivi a Nick e a Luana pela disposição em ajudar no que fosse preciso. É claro aos vizinhos de cima seu Luiz, Fafa, Marcela e Alana por quebra não galhos e sim troncos inteiros.

Aos amigos de outros laboratórios, como Emerson, que um muito obrigada é pouco por sua ajuda nessa reta final foi imprescindível. A Marcela, que sei que posso contar eternamente e não canso de dizer a todos o quanto você é maravilhosa e Lay que conheci a pouco tempo mas já me apaixonei por sua energia e disposição. As meninas do laboratório de genética Sivoneide e Barbára. Ao prestativo Iranildo do laboratório de bioprocessos. A equipe do laboratório de Ficologia da Rural coordenado pelo prof. Watson.

As minhas amigas imãs Nathaly, com THY, Betinha, Erika, Aleriane, Xanda, Tássia e Andressa vocês são mais que especial, obrigada por cuidar tão bem de mim !!! Nossa amizade vai além de redes sociais virtuais. Claro que também a Dangely, ou melhor a chuchuzona, que se tornou uma excelente e sua linda e amada filha Clarinha que tenho como uma sobrinha.

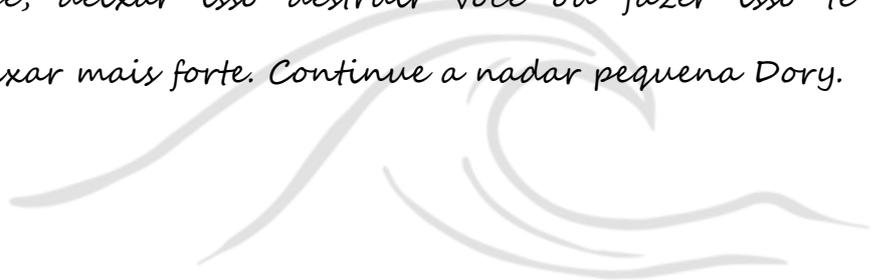
Aos amigos da Escola Silva Jardim, muitos não puderam está aqui nesse momento, mas sei que estão em oração e na torcida , aos meus alunos em especial Luiza, Raquel, Bia Leticia, a todos os professores em especial, Karina, Fernanda, Rosangela Suely e Ricarda e coordenação Inácia, Keyla, Antônio, Bruno e Eugênia!!

Obrigada A MINHA FAMILIA, eita! Que essa parte é difícil, representados aqui por Conceição, minha Mainha, que é a luz e energia de todos os meus dias, mãe amo a senhora que Deus nos permita viver tantos outros dias para que eu possa cuidar e ser cuidada pela senhora. A Brenno, que o tenho muito mais que um irmão, um amigo e um filho eu te amo muito. Ao meu padrasto José Carlos, por todos seus exemplos de determinação, coragem, força, compromisso, meu muito obrigada pelo apoio e incentivo. Ao meu amado Nelson, um companheiro maravilhoso e extremamente paciente que Deus colocou na minha vida. Estamos nos permitindo viver uma história de Amor real muito além da fantasia de um conto de fadas, amo você menino do Rio. A minha pequena Dory, sei que está orgulhosa da sua imã mais velha e está sorrindo pra mim nesse exto momento, e tirando foto é claro!! Graças a você eu estou aprendendo todos os dias que Saiba você que sua história de vida a maior lição de vida que alguém pode vou te reencontrar Nunca saberemos o quão forte somos até que ser forte seja a única escolha. Quando algo ruim acontece você têm três escolhas: deixar isso definir você, deixar isso destruir você ou fazer isso te deixar mais forte. Continue a nadar pequena Dory que um dia novamente irei de encontrar

Que Deus abençoe a todos nos, porque ele é DEUS.

*“O sorriso azul dos azulejos constitui certamente um dos meios decorativos mais belos que existe”. Santos Simões.*

*Nunca saberemos o quão forte somos até que ser forte seja a única escolha. Quando algo ruim acontece você têm três escolhas: deixar isso definir você, deixar isso destruir você ou fazer isso te deixar mais forte. Continue a nadar pequena Dory.*



## RESUMO

Segundo Simões o Brasil, é considerado uma das regiões mais representativas de edificações com fachadas internas e externas de painéis de azulejos no mundo. Constituem um patrimônio cultural valioso para a população, mas são obras de arte que estão em constante exposição aos fatores ambientais principalmente os de origem biológica que podem levar a biodeterioração. Os micro-organismos são um dos principais agentes envolvidos no processo de biodeterioração do patrimônio cultural. Nesse sentido objetivo dessa pesquisa foi investigar a presença de comunidades microbianas nas superfícies de painéis de azulejos do século XVI e XIX integrados a monumentos históricos nas cidades Recife e Olinda, até o momento este é o primeiro trabalho científico no país que explorou a diversidade microbiana (fungos, bactérias, cianobactérias e microalgas) em peças de azulejos portugueses no Brasil. Foram realizadas duas coletas em períodos distintos, a primeira foi na fachada externa de azulejos do século XIX da Academia Pernambucana de Letras (APL) em dezembro de 2015. A segunda procedeu na fachada interna de azulejos do século XVI do Convento de São Francisco em Janeiro de 2019. Para obtenção das amostras foram feitas raspagens superficiais nos painéis. Em seguida foram feitas suspensões dos materiais coletados (0,1g em 5mL de água destilada). Para o isolamento microbiano foi adotado a técnica de Spread Plate, utilizando os seguintes meios de cultura; BDA, MEA, PGRBA, MH, R2 e TSA, e não foi visto na literatura outro trabalho de biodeterioração microbiana que tenha recorrido a uma variedade de meios de cultura como este apresentado. A identificação da população microbiana foi por taxonômica clássica, extração de DNA e análise proteômica. Fragmentos dos dois painéis de azulejos (século XVII e XIX) foram analisados, por Fluorescência de raios X, para conhecer a composição mineralógica das amostras e por em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e corados com calcoflur. Não houve diferença significativa entre os meios de cultura utilizados, mas sugerimos a utilização de meios de cultura específicos, dois para fungos (MEA e PGRBA) e dois para bactérias (TSA e R2), sendo um rico e o outro pobre em nutrientes. A diversidade microbiana isolada na APL foi 175 cepas bacterianas e 188 de fungos. Enquanto o número de isolados do Convento de São Francisco o foi de, 49 fungos, 51 bactérias, 5 táxons (gênero e espécie) de cianobactéria e 4 táxons (gênero e espécie) de microalgas. O gênero *Aspergillus* foi que apresentou maior diversidade nos dois monumentos. Dos fungos isolados as espécies *Syncephalastrum racemosu*, *Lichtheimia hyalospora*, *Phenerochaete chrysosporiu* e *Aspergillus allahabadii* até o momento são os primeiros relatos dessas cepas em azulejos vitrificados portugueses. A partir da composição mineralógica dos azulejos foi possível confirmar diferenças cronológicas, confirmando que os azulejos do Convento de S. Francisco são os mais antigos. Os pontos dos painéis externos ou internos mais deteriorados foram os que maior apresentaram unidades formadores de colônia e nº de isolados, o que pode ser verificado através das imagens do MEV e da coloração com calcofluor a presença de estruturas microbianas entre o vitrificado e o corpo cerâmico. Diante do exposto foi possível verificar que os painéis estudados requerem medidas de conservação para conter possíveis danos causados pela biodeterioração microbiana.

Palavras chaves: Biodeterioração; micro-organismos; azulejos.

## ABSTRACT

According to Simões, Brazil is considered one of the most representative regions of buildings with internal and external facades of tile panels in the world. They are a valuable cultural heritage for the population, but they are works of art that are constantly exposed to environmental factors, especially those of biological origin that can lead to biodeterioration. Microorganisms are one of the main agents involved in the process of biodeterioration of cultural heritage. The objective of this research was to investigate the presence of microbial communities on the 16th and 19th century tile panel surfaces integrated with historical monuments in the cities Recife and Olinda, so far this is the first scientific work in the country that explored microbial diversity (fungi, bacteria, cyanobacteria and microalgae) in Portuguese tiles in Brazil. Two collections were performed at different times, the first was on the nineteenth-century external tiled façade of the Pernambuco Academy of Letters (APL) in December 2015. The second was on the seventeenth-century inner tiled façade of the São Francisco Convent in January. 2019. To obtain the samples, surface scrapes were made on the panels. Then, the collected materials were suspended (0.1g in 5mL of distilled water). For microbial isolation, the Spread Plate technique was adopted using the following culture media; BDA, MEA, PGRBA, MH, R2 and TSA, and no other microbial biodeterioration work using a variety of culture media such as this one has been seen in the literature. The identification of the microbial population was by classical taxonomy, DNA extraction and proteomic analysis. And fragments of the tiles were analyzed by scanning electron microscope (SEM) and stained with calcoflur. There was no significant difference between the culture media used, but we suggest the use of specific culture media, two for fungi (MEA and PGRBA) and two for bacteria (TSA and R2), one rich and the other poor in nutrients. The isolated microbial diversity in the APL was 175 bacterial strains and 188 fungal strains. While the number of isolates from the Convent of São Francisco was 49 fungal, 51 bacteria, 5 cyanobacterial taxa (genus and species) and 4 microalgae taxa (genus and species). The genus *Aspergillus* presented the highest diversity in both monuments. Of the isolated fungi *Syncephalastrum racemosu*, *Lichtheimia hyalospora*, *Phenerochaete chrysosporiu* and *Aspergillus allahabadii* so far are the first reports of these strains in Portuguese glazed tiles. The points of the most deteriorated external or internal panels showed the highest colony forming units and number of isolates, which can be verified by SEM images and calcoflur staining the presence of microbial structures between the vitrified and the ceramic body. . Given the above it was possible to verify that the studied panels require conservation measures to contain possible data caused by microbial biodeterioration.

Key-words: Biodeterioration; microorganisms; tiles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão bibliográfica

- Figura 1.** Emblema figurativo do Patrimônio Cultural Brasileiro. 5
- Figura 2.** Faces do azulejo. (A) face vitrificada (B) face chamada de chacota (C) vitrificado liso e (D) vitrificado em relevo. 8
- Figura 3.** Casarão Rodrigues de Mendes século XIX (A), Sede da Academia Pernambucana de Letras século XXI (B e C) e detalhe do painel azulejar (E). 12
- Figura 4.** Planta do convento de São Francisco de Olinda com os blocos da igreja (Vermelho), claustro (Azul), portaria nova (Verde) e da Ordem Terceira (amarelo) (elaboração própria). Versão digital a partir de planta de abril de 1974. Sem escala 13
- Figura 5.** Vila de Olinda (Pernambuco) após o incêndio de 1631, desenho de Frans Post no livro de Gaspar Baerleus (A), em detalhe o Convento Franciscano de Olinda (B), Vista da fachada da frente do Convento (C), painel de azulejos portugueses séc. XVI situados no corredor (D), Capela Capítulo e Escadaria (E e F), respectivamente 14
- Figura 6.** Diferentes formatos de azulejos. (A) Quadrado e (B) Poligonal 16
- Figura 7.** Distribuição das causas da deterioração do acervo azulejos 20
- Figura 8.** Azulejos da APL danificados por patologias como: craquelê, perda de vidrado e contaminação. 21
- Figura 9.** Obras de arte danificadas por ação microbiana. (A) Livro de atas dos rodoviários do acervo da RFFSA (Rede Ferroviária Federal) e (B) Detalhe do azulejo deteriorado da fachada da APL (Academia Pernambucana de Letras). 23

### CAPITULO 1

- Figura 1.** Desenho arquitetônico da Academia Pernambucana de Letras (APL). 38
- Figura 2.** Mapeamento dos pontos de coleta nas fachadas de azulejos da Academia Pernambucana de Letras, Recife-PE/Brasil. 39
- Figura 3.** Azulejo da APL deteriorado detalhe para a mancha preta na parede. 46

<b>Figura 4.</b> Identificação dos fungos isolados nos azulejos da Academia Pernambucana de Letras (APL).	48
<b>Figura 5.</b> Detalhe da mancha verde entre o vitrificado e o corpo cerâmico do ponto 3: A- densa massa microbiana e B- superfície livre de contaminação, observa-se os vacúolos formados durante o cozimento da cerâmica.	51
<b>Figura 6.</b> Imagem obtida da amostra do ponto 1: A-Emaranhado de filamentos e B- imagem ampliada dos filamentos, a seta indica possíveis conidióforos sem esporos.	52
<b>Figura 7.</b> Observam-se as estruturas bacterianas. Em (A) seta indica os arranjos na forma de bastonetes e seta (B) na forma de cocos.	53
<b>Figura 8.</b> Gráfico da composição mineralógica dos azulejos do século XIX da Academia Pernambucana de Letras. Distribuição dos elementos químicos encontrados no biscoito.	54
<b>Figura 9.</b> Gráfico da composição mineralógica dos azulejos do século XIX da Academia Pernambucana de Letras. Distribuição dos elementos químicos encontrados no vitrificado detalhe para o pigmento azul.	54
<b>Figura 10.</b> Gráfico da composição mineralógica dos azulejos do século XIX da Academia Pernambucana de Letras. Distribuição dos elementos químicos encontrados no vitrificado detalhe para coloração branca.	55

## CAPÍTULO 2

<b>Figura 1.</b> Planta do térreo e localização das edificações (A) e vista panorâmica área do Conjunto Franciscano (B).	79
<b>Figura 2.</b> Planta do pavimento térreo vista da Ordem primeira/Convento de São Francisco e Ordem Terceira, com destaque em vermelho para os locais de coleta.	80
<b>Figura 3.</b> Dimensões dos painéis de azulejos do Convento São Francisco de Olinda.	81
<b>Figura 4.</b> Vista do painel direito da Capela Capitulo (A) e detalhe dos azulejos (B). Vista geral da Capela Santa Ana (C) e painel direito da porta (D). Painel do Corredor de acesso a Sacristia (E) e destaque para os azulejos deteriorados (F). Vista da Escadaria e painel (G) abaixo da janela (H). Trabalhos de coleta das amostras (I, J e L).	81
<b>Figura 5.</b> Fluxograma de identificação das actinobactérias.	85
<b>Figura 6.</b> Fluxograma de identificação das provas bioquímicas.	86
<b>Figura 7.</b> Macroscopia e microscopia das colônias dos fungos e fragmento do azulejo. <i>Lichtheimia hyalospora</i> (A e B); <i>Syncephalastrum sp</i> (C e D); <i>Rhizopus stolonife</i> (E e F); <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (G e H); <i>Curvularia sp</i> (I e J); <i>Aspergillus niger</i> (L e M); <i>Pnicillium sp.</i> (N e O) e	99

detalhe do azulejo com manchas na chacota (P e Q).

**Figura 8.** Distribuição dos isolados fungicos nos locais de coleta. 100

**Figura 9.** Resultados das bactérias identificadas pelo MALDI Biotyper. 102

**Figura 10.** Cianobactérias e microalgas presentes nas amostras de azulejos do Convento São Francisco de Olinda. *Chroococidiopsis muralis* (A e B), *Chlorogloeopsis fritschii* (C) e *Chlorogloeopsis* sp. (D), *Leptolyngbya* sp. (E e F) ( *Nostoc* sp. (G e H), *Scytonema hofmanni* (I) e *Scytonema* sp (J), *Tapinothrix* sp. (L e M) e *Coccomyxa* sp. (N e O). 114

**Figura 11.** Imagem MEV da crosta aderida ao fragmento de azulejo do século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Revelando uma estrutura longa filamentosa provavelmente microbiana. 117

**Figura 12.** Imagens por Calcoflur White de estruturas filamentosas de fungos fixados a superfície dos azulejos o século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. 118

**Figura 13.** Imagem por lupa binocular do detalhe de um fragmento do azulejo século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Observa-se a camada de sal (seta azul) e pontos de crostas esverdeadas (seta vermelha) depositados na superfície do azulejo. 119

**Figura 14.** Gráfico da composição mineralógica dos azulejos do século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Comparação da composição de cálcio dos biscoitos dos azulejos do século XVI com o do século XIX. . 120

**Figura 15.** Gráfico da composição mineralógica dos azulejos do século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Composição dos pigmentos presentes na cama vitrificada. 121

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1.</b> Relação das principais patologias que podem ocorrer nos painéis de azulejos.	<b>19</b>
---	-----------

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de isolados bacterianos relacionando o ponto de coleta e o meio de cultivo	<b>43</b>
---	-----------

<b>Tabela 2.</b> Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos isolados de fungos relacionando o ponto de coleta e o meio de cultivo	<b>43</b>
--	-----------

<b>Tabela 3.</b> Relação das bactérias identificadas por testes bioquímicos.	<b>47</b>
--	-----------

<b>Figura 4.</b> Identificação dos fungos isolados nos azulejos da Academia Pernambucana de Letras (APL).	<b>48</b>
---	-----------

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e de isolados bacterianos relacionados ao ponto de coleta e meio de cultivo.	<b>96</b>
--	-----------

<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos organismos autotróficos aos locais de coleta.	<b>96</b>
---	-----------

<b>Tabela 3.</b> Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e de isolados fúngicos relacionados ao ponto de coleta e meio de cultivo.	<b>97</b>
---	-----------

<b>Tabela 4.</b> Caracterização fenotípica através de provas diferenciais de bacilos Gram-positivos.	<b>104</b>
--	------------

<b>Tabela 5.</b> Caracterização fenotípica através de provas diferenciais de cocos Gram-positivos.	<b>106</b>
--	------------

<b>Tabela 6.</b> Distribuição das bactérias no Convento de São Francisco de Olinda.	<b>107</b>
---	------------

<b>Tabela 7.</b> Micro-organismos fototróficos identificados por métodos de cultura nos painéis azulejos do Convento de São Francisco de Olinda.	<b>113</b>
--	------------

### APÊNDICE

<b>Tabela 1.</b> Análise dos dados estatisticamente pelo teste <i>T</i> da Academia Pernambucana de Letras.	<b>128</b>
---	------------

<b>Tabela 2.</b> Análise dos dados estatisticamente pelo teste <i>T</i> do Convento Franciscano de Olinda.	<b>133</b>
--	------------

## **LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS**

**IPHAN**- Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional

**APL**- Academia Pernambucana de Letras

**RFSA**- Rede Ferroviária Federal

**UNESCO** - Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura

## Sumário

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2.REVISÃO BIBLIGRÁFICA</b> .....	20
2.1.PATRIMONIO CULTURAL .....	20
<b>2.1.2.Deterioração do patrimônio cultural- bens imóveis e integrados</b> .....	22
2.2.A ARTE DOS AZULEJOS .....	24
<b>2.2.2.O acervo azulejar Pernambucano</b> .....	25
2.2.2.1.Academia Pernambucana de Letras (APL).....	27
2.2.2.2.Convento São Francisco de Olinda.....	28
2.3.AZULEJARIA .....	31
<b>2.3.1.Produção dos azulejos</b> .....	32
2.3.1.1.Corpo do azulejo.....	32
2.3.1.2.Revestimento vitrificado.....	33
<b>2.3.2.Patologias dos vitrificados</b> .....	34
2.4.A MICROBIOLOGIA NA CIÊNCIA DA CONSERVAÇÃO.....	37
<b>2.5.BIOFILMES EM MONUMENTOS HISTÓRICOS</b> .....	40
2.6.O COMBATE A BIODETERIORAÇÃO.....	42
<b>3.JUSTIFICATIVA</b> .....	44
<b>4.OBJETIVO</b> .....	44
<b>4.1.OBJETIVO GERAL</b> .....	44
<b>4.1.2.Objetivos Específicos</b> .....	44
<b>5.REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>ARTIGO 1</b> .....	52
Resumo.....	52
<b>Introdução</b> .....	53
<b>1.Materiais e dados</b> .....	54
1.1 LOCAL DE ESTUDO.....	54
1.2 COLETA DE AMOSTRAS.....	55
1.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	56

2.4. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS.....	56
2.5. IDENTIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS BACTÉRIAS.....	56
2.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	57
2.7. CORANTE FLUORESCENTE CALCOFLUOR WHITE M2R.....	57
2.8. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS.....	57
<b>3.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
3.1. AS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS E OS MEIOS DE CULTURA.....	57
3.2. DIVERSIDADE MICROBIANA NOS AZULEJOS DA ACADÊMICA PERNAMBUCANA DE LETRAS.....	61
3.3. ANÁLISES DAS ESTRUTURAS ADERIDAS AO VITRIFICADO.....	66
3.4. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS.....	69
<b>4.CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>5.AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>71</b>
<b>6.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
ARTIGO 2.....	76
Resumo.....	76
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>2.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
2.1 LOCAL DE ESTUDO.....	79
<b>2.1.2 Coleta das amostras.....</b>	<b>80</b>
2.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS COLETADAS.....	83
<b>2.2.1. Fungos e bactérias.....</b>	<b>83</b>
<b>2.2.2. Microalgas e cianobactérias.....</b>	<b>83</b>
2.3. CONTAGEM, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLOGICA DA COMUNIDADE MICROBIANA.....	84
<b>2.3.1. Fungos.....</b>	<b>84</b>
2.3.1.1. Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e isolamento.....	84

2.3.1.2. Identificação morfológica.....	84
2.3.2. Bactérias.....	84
2.3.2.1. Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e isolamento.....	84
2.3.2.2. Identificação morfológica e proteômica.....	85
2.3.2.3. Testes de identificação morfológica das bactérias.....	87
2.3.2.4. Identificação proteômica por MALD-TOF MS.....	92
2.3.3. Microalgas e cianobactérias.....	92
2.3.3.1. Identificação morfológica.....	92
2.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E LUPA BINOCULAR .....	93
2.5. CORANTE FLUORESCENTE CALCOFLUR WHITE M2R. ....	93
2.6. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS .....	93
<b>3. RESULTADOS E DISCURSÃO</b> .....	94
3.1 AS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS E OS MEIOS E OS PONTOS DE COLETA .....	94
3.2. DIVERSIDADE MICROBIANA NOS AZULEJOS DO CONVENTO DE SÃO FRANCISCO .....	98
<b>3.2.1. Identificação dos fungos filamentosos</b> .....	98
<b>3.2.2. Identificação das bactérias</b> .....	102
<b>3.2.3. Identificação das cianobactérias e microalgas</b> .....	111
3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E LUPA BINOCULAR .....	115
3.5. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS.....	120
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	122
<b>5 AGRADECIMENTOS</b> .....	122
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	123
<b>APÊNDICE</b> .....	127

## 1 INTRODUÇÃO

O patrimônio cultural brasileiro possui inúmeros exemplares de importância mundial desde bens imóveis e integrados, móveis e imateriais. Os painéis de azulejos brasileiros são bens arquitetônicos integrados as paredes de alguns monumentos históricos, tais como conventos, igrejas, casarões, jardins, parques e outros, fazem parte do patrimônio do país. Mas, esse acervo vem se perdendo em consequência da deterioração natural e da ação do homem (Machado, 2009; Lima et. al., 2012).

A deterioração causa modificações indesejadas oriundas de ações antropogênicas e/ou pela influência das condições ambientais, ambos causam processos de degradação. As alterações provocadas pelos organismos vivos, principalmente pelos micro-organismos, são chamadas de biodeterioração. As ações provocadas pela atividade metabólica dos micro-organismos podem causar alterações na composição físico-química dos azulejos e consequentemente efeitos estéticos indesejáveis ou a pecar da peça (Sanjad 2002; Caldeira et. al., 2015).

A colonização microbiana dos painéis de azulejos está relacionada aos processos de biorreceptividade entre o substrato e os micro-organismos, além das interações entre a comunidade microbiana, presente no biofilme, que por sua vez sofrem influencia direta dos fatores ambientais. Essa relação ecológica entre o material e os organismos colonizadores estabelece condições para ancoragem, desenvolvimento e multiplicação dos micro-organismos (Guillitte, 1995).

O importante papel dos organismos é bem estabelecido na biodeterioração de materiais de construção do patrimônio cultural. É importante investigar os processos metabólicos que os micro-organismos realizam na degradação, apesar da sua importância cultural poucos estudos têm sido realizados com foco na identificação da colonização de microbiana em painéis azulejos, em comparação com os estudos de monumentos feitos de pedra (Coutinho et. al., 2015).

Pernambuco é dos estados que possui um acervo azulejar reconhecido nacionalmente e internacionalmente. É possível encontrar na região azulejos dos séculos XVI, XVII, XVIII e XIX oriundos principalmente de Portugal, mas também de outros locais como, França, Holanda e Espanha (Sylvia e Cruz, 2002).

Neste contexto, o presente projeto investigou as comunidades de micro-organismos em painéis de azulejos dos séculos XVI e XIX, integrados a monumentos históricos Pernambucanos. O acervo azulejar do século XVI faz parte da arquitetura interna do Convento São Francisco em Olinda. Enquanto o acervo, do século XIX está integrado a fachada externa da Academia Pernambucana de Letras, Recife. Sendo assim, a partir dos resultados apresentados espera-se contribuir para futuras atividades de preservação aos acervos azulejares.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PATRIMONIO CULTURAL BRASILEIRO

O patrimônio representa um conjunto de bens materiais e imateriais que compendiam a herança da humanidade. Reconhecidos de acordo com sua ancestralidade, importância histórica e cultura de uma região (país, localidade ou comunidade) adquirem um valor único (Quintas, 2013; Siviero, 2015). Assim, de acordo com sua particularidade e significativa forma de expressão cultural, é classificada como patrimônio cultural, determinando-se sua salvaguarda, para garantir a continuidade e preservação. Com a intenção de assegurar, para as gerações futuras conhecer seu passado, suas tradições, sua história, os costumes, a cultura, a identidade de seu povo (Braga, 2003; Suchodolski, 2016).

A Constituição Federal de 1988, em seu Artigo 216, ampliou o conceito de patrimônio estabelecido pelo Decreto-lei nº 25, de 30 de novembro de 1937, substituindo a denominação Patrimônio Histórico e Artístico, por Patrimônio Cultural Brasileiro. Essa alteração incorporou o conceito de referência cultural e a definição dos bens passíveis de reconhecimento, sobretudo os de caráter imaterial (IPHAN, 2014).

Os dois caminhos principais para a preservação são via a educação, ou seja, todas as atividades governamentais e não governamentais que visam à conscientização das comunidades, direcionando-as ao conhecimento de si mesmo e de seus valores como um todo e pelo tombamento – ação do Estado que é regida pelo Decreto Lei 25/37, que normatiza a ação de proteção.

O órgão nacional federal encarregado de promover a proteção patrimonial é o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), há também os órgãos estaduais: Secretaria de Estado da Cultura, através do Conselho do Patrimônio Histórico, Artístico e Natural. Municipais: Secretarias da Cultura e Conselhos de Defesa do Patrimônio Cultural. Polícia Federal: DELEMAPH's – Delegacias de repressão aos crimes ambientais e contra o patrimônio histórico, DMAPH – Divisão de repressão aos crimes ambientais e contra o patrimônio histórico (Fernandes, 2015). Os danos e ameaças ao Patrimônio Cultural serão punidos, na forma da Lei, como também do próprio art. 225 3º, da Constituição Federal (Junior, 2013).

Os tesouros do patrimônio cultural brasileiro após o decreto de 1937 entendem-se como: bens imóveis e integrados (casarões, igrejas, casas, praças e outros), conjuntos históricos (urbanos e sítios de valor histórico, paisagístico, artísticos, arqueológico, paleontológico, ecológico e científico), bens móveis (pinturas, esculturas, livros, fotografias, artesanato, dentre outros). Nos bens imateriais considera-se a literatura, a música, a linguagem, manifestações populares, cultos, tradições, criações científicas e tecnológicas (IPHAN, 2014; Almeida, 2014) enquanto o patrimônio mundial é aquele reconhecido pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) como tendo importância mundial para a preservação dos patrimônios históricos e naturais de diversos países (Moura, 2016).

Para atender a diversidade patrimonial e seus novos conceitos o IPHAN criou os inventários de conhecimento que se tornaram um instrumento fundamental para o reconhecimento do nosso patrimônio (Almeida, 2014). No caso do patrimônio azulejar, objeto da presente pesquisa, sendo incorporados ao patrimônio de bens imóveis e integrados.

O IPHAN através de edital público criou o emblema representativo do Patrimônio Cultural Brasileiro que deverá ser usado em todos os bens considerados patrimônio nacional, criando, assim uma identidade visual única (Rodrigues, 2017), ver figura 1.

**Figura 1.** Emblema configurativo do Patrimônio Cultural Brasileiro.



Fonte: Rodrigues, 2017.

Embora a legislação brasileira sobre a preservação do patrimônio cultural seja bastante extensa, ainda não é possível afirmar que ele está protegido (Almeida, 2014).

Inúmeros são os patrimônios culturais que se encontram ameaçados ou em risco de desaparecimento por motivos relacionados a conflitos políticos; questões étnicas e religiosas;

tráfico ilícito e negligência; contaminação pelo turismo massivo e mal organizado; expansão dos centros urbanos e falta de recursos financeiros para protegê-los e questões de intempéries, tais problemas, contribuem para a deterioração do Patrimônio Cultural Brasileiro (Zanirato, 2010; Correia, 2016).

Outro problema de nossa cultura encontra-se no fato de que sabemos pouco da sua rica variedade. O primeiro passo para conhecê-la está em preservar e recuperar os nossos bens materiais e imateriais (Weffort et al., 2001). A identidade cultural de cada bem é constituída em base do legado recebido de geração a geração (Quintas, 2013).

Nesse sentido é indiscutível a necessidade de políticas públicas efetivas ao combate as ameaças ao patrimônio cultural brasileiro, desde aplicação das penalidades estabelecidas nas leis existentes passando pela a elaboração de novas regras, maior incentivo financeiro às instituições responsáveis pela gestão do patrimônio e apoio ao desenvolvimento e aplicação de pesquisas multidisciplinares na área.

### **2.1.2 Deterioração do patrimônio cultural - bens imóveis e integrados**

O patrimônio cultural, em especial os monumentos históricos (bens imóveis) são constituídos por diversos tipos de matérias-primas tais como; madeira, barro, tijolos, pedras naturais e artificiais. Vários monumentos históricos apresentam peças permanentes também chamados de bens integrados, encontrados em seus ambientes internos ou externos. São considerados bens integrados como; fontes, chafarizes, arco-cruzeiros, talhas de forros, pinturas no teto, painéis de azulejos e dentre outros (IPHAN, 2014).

Os bens imóveis assim como os bens integrados são construções em contato com o meio ambiente e sua durabilidade, vai depender das condições de conservação e das interações com os agentes de deterioração. Os agentes de deterioração incluem parâmetros ambientais como o uso da construção, radiação, temperatura, água, umidade, poluição antropogênica e os seres vivos (Shirakawa *et. al.*, 2008; Lutterbach *et al.*, 2013).

Tradicionalmente a deterioração dos monumentos históricos era atribuída apenas aos agentes físicos e químicos. Com o avanço das pesquisas foi visto que a deterioração de um bem construído (imóvel e/ou integrado) é consequência da ação em conjunta dos agentes físicos, químicos e biológico. Embora os estudos voltados para área da biodeterioração por

micro-organismos sejam relativamente novos, há relatos da ação microbiana no ambiente construído chamada de "leprosias" vermelhas e verdes presentes nas paredes das casas foram descrito na bíblia, por exemplo, Leviticus Cap. 14, v. 36 (Sterflinger *et al.*, 2013). A degradação biológica ou também chamada de biodeterioração é estritamente associada a processos químicos e físicos. Os processos bioquímicos e biofísicos de degradação incluem a ação direta e indireta de organismos que modificam as propriedades, estabilidade dos materiais e causam efeitos estéticos indesejáveis aos monumentos históricos e obras de arte (Resende *et al.*, 2008; Dakal e Cemeotra, 2012).

São inúmeras as contribuições biológicas no arruinamento das construções antigas. Arbustos crescem nas paredes e nos beirais, trepadeiras estendem-se nos telhados e dependuram-se nas **cimalhas**<sup>1</sup>, formando enormes cortinas verdes, vegetações de médio porte como embaubeira, são encontradas nas coberturas de casarões. As raízes dessas vegetações penetram pelas paredes provocando rachaduras e até desabamento de partes da estrutura do imóvel (Lima, 2012).

Independente da matéria-prima que estrutura o monumento (madeira, barro, tijolos, pedras naturais e artificiais) assim como o tipo de material que compõe os seus revestimentos, estes podem ser colonizados por plantas avasculares, superiores, insetos, líquens e biofilmes microbianos (Fazio *et al.*, 2015; Isola *et al.*, 2016). Segundo Werneck (2010), 100% das edificações brasileiras de relevância histórica, principalmente igrejas e casarões, estão ameaçados por cupins, traças, brocas e micro-organismos. Se não forem tomadas medidas urgentes de acordo com o autor citado, o Brasil perderá, no máximo em 50 anos, os acervos dos séculos XVII, XVIII e XIX, que guardam a memória e atraem turismo.

A biodeterioração microbiana é considerada como um dos agentes mais importantes na deterioração dos monumentos culturais devido à corrosão ácida, degradação enzimática e ataque mecânico aos materiais (Sterflinger *et al.*, 2018; Steiger *et al.* 2011; Ettenauer *et al.*, 2010). Para tanto alguns parâmetros específicos dos materiais como, composição, porosidade e permeabilidade, e as condições ambientais do conjunto arquitetônico ao qual estão expostos, são os fatores que determinarão a taxa de ataque de biodeterioração por micro-organismos (Bonieck, *et al.*, 2017). Entre os micro-organismos que participam da degradação estão às bactérias quimilitróficas e quimiorganotróficas, actinobactérias, cianobactérias, algas, fungos filamentosos e leveduras (Gaylarde *et al.*, 2016).

**1CIMALHAS:** moldura saliente que remata a parte superior da fachada de um edifício, ocultando o telhado e impedindo que as águas escorram pela parede.

## 2.2 A ARTE DOS AZULEJOS

A palavra azulejo, confundida com termo “ladrilho”, do qual, em muitos textos antigos e contemporâneos é sinônimo, embora seja uma palavra portuguesa e castelhana, é originada do árabe *azuleych*, que significa pequena pedra cintilante; é tipo de cerâmica considerado uma peça de rara beleza, cheios de detalhes e influências artísticas. Revestindo as paredes de áreas externas e internas dos mais diferentes ambientes, tais como, residências, museus, igrejas, conventos, palácios, cemitérios, pontos comerciais, jardins e dentre outros (Barata, 1995; IPHAN, 2008).

A variedade de cores, lustros e iconografia desses elementos cerâmicos torna seu uso associado a uma intenção estética, o que explica o valor artístico e histórico das pequenas pedras cintilantes. Assim, a sua aplicação em revestimentos vai muito além das propriedades práticas, como resistência mecânica, impermeabilidade, durabilidade e limpeza (Alcântara, 1980; Filho, 2010; Lima et al., 2012).

Os azulejos apresentam pouca espessura e basicamente duas faces, uma chamada de biscoito ou chacota. A outra face é a vidrada ou vitrificada, resultado da cozedura de um revestimento geralmente denominado esmalte, que se torna impermeável e brilhante. Esta face pode ser lisa ou com relevo (figura 2).

**Figura 2.** Faces do azulejo. (A) face vitrificada (B) face chamada de chacota (C) vitrificado liso e (D) vitrificado em relevo.



Fonte: Autora , 2016

Os azulejos surgiram no antigo Egito por volta de 3000 A.C depois se espalhou para o Oriente e em seguida para Europa. No final do século VI esse material foi introduzido na Europa, com a chegada dos árabes na Península Ibérica, os azulejos difundiram-se para Espanha, Portugal, Holanda e mais tarde no Brasil (El Nouhy , 2013).

Esta arte chegou ao Brasil em grande escala em 1620, principalmente no nordeste, no período em que fora colônia portuguesa o que proporcionou dentre outros aspectos uma importação extraordinária de azulejos (Costa Junior, 1980 ; Dugnani, 2000). Além do cunho decorativo de embelezar o imóvel, o azulejo tinha ainda a função utilitária de proteger contra a umidade característica do clima tropical de nosso país. A umidade agravada pela salinidade existente nas cidades litorâneas ou situada às margens de rios. Tanto assim que aquelas que mais receberam fachadas azulejares foi as que apresentavam uma ou mesmo as duas características geográficas: Belém - PA; São Luís - MA; Recife e Olinda - PE; Rio de Janeiro - RJ e Porto Alegre - RS. Nestas encontram-se os maiores e mais significativos acervos de azulejos históricos do Brasil (Cavalcante, 2002).

Dentre os quais os mais belos são os tricolores em amarelos, azul e branco – característicos do século XVII- com ornamentação geométrica, os temas dos desenhos no vitrificado apresentavam motivos florais estilizados, cenas de caça, do cotidiano, cenas mitológicas e bíblicas. Existem também no Brasil azulejos de origem espanhola, holandesa, alemã e francesa (Machado, 2009).

### **2.1.2 O acervo azulejar Pernambucano**

Segundo Santos Simões 1965, um dos mais importantes especialistas em azulejaria no mundo, Pernambuco foi, talvez, a primeira região brasileira no sentido mais profundo da palavra: aquela onde pela primeira vez se pelejou por uma independência, sendo assim, considerado que é neste estado que o azulejo se “nacionaliza brasileiro”. O patrimônio azulejar Pernambucano é dotado de extrema riqueza, possui peças de origem portuguesa, holandesa, francesa e inglesa, distribuídos na Região Metropolitana, Zona da Mata e Agreste. Nas cidades de Recife e Olinda é possível encontrar fachas de azulejos de todas as nacionalidades citadas anteriormente (Cavalcante, 2002; Sylvia e Cruz, 2002).

Os azulejos eram considerados peças artesanais simples, com o tempo passaram por várias transformações principalmente entre os séculos XIX e XX. Popularizou-se quando calharam a ser utilizado no revestimento das fachadas de outras edificações, além de igrejas, conventos e ambientes nobres (Cavalcante, 2002). Porém houve um período, na cidade do Recife, que foi proibido seu uso em fachadas, chegando até serem considerados nacionalmente uma arte menor, o que levou quase a extinção de sua produção. Atualmente são consideradas peças artísticas de grande valor histórico-cultural (Júnior, 1979).

Mas apesar de sua relevância, muitos dos patrimônios azulejares brasileiros encontram-se deteriorados. Em consequência da falta de manutenção das peças, exposição aos intemperes ambientais, abandonado do poder público e/ou dos proprietários. Mesmo existindo Leis, em nível federal, estadual e municipal. Como por exemplo, a Constituição Federal, no seu artigo 216, inciso primeiro: “o poder público, com a colaboração da comunidade, promoverá e protegerá o patrimônio cultural brasileiro, por meio de inventários, registros, vigilância, tombamento e desapropriação, e de outras formas de acautelamento e preservação” (Romani, 2011; Sylvia, 2006).

Em muitos casos não há o cumprimento da Lei, além do que falta uma política nacional efetiva que consigam driblar os entraves, que começa com ausência de um orçamento adequado para os organismos responsáveis pela preservação poderem atuar. Infelizmente Pernambuco é um dos locais em os acervos de azulejaria estão relegados ao abandono, quando não, depredados e saqueados, o que coloca em vias de extinção (Alcântara, 2001; Romani, 2011).

De acordo com o artigo terceiro da Carta Internacional sobre a Conservação e o Restauro de Monumentos e Sítios, “A conservação e o restauro dos monumentos têm como objetivo salvaguardar tanto a obra de arte como as respectivas evidências históricas.” (Carta de Veneza, 1964). Portanto, seguindo os preceitos da Carta de Veneza, todos aqueles que estão encarregados de sua proteção – organizações públicas e/ou privadas - têm a responsabilidade de transmitir para as gerações futuras essa nobre herança (Reys *et. al.*, 2008).

As cidades de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes são os locais com a maior quantidade de edificações com azulejos de grande valor histórico-cultural no Estado. São encontrados principalmente na arquitetura religiosa e civil, como os observados; Em Recife (na Capela Dourada, no Convento Franciscano, Igreja da Ordem Terceira do Carmo, Paróquia

Anglicana do Bom Samaritano, Academia Pernambucana de Letras e outros) Olinda (Convento São Francisco, Igreja Nossa Senhora das Neves Seminário de Olinda, Igreja Nossa Senhora do Amparo e etc) Jaboatão dos Guararapes (Igreja Nossa Senhora dos Prazeres e Igreja Nossa Senhora da Piedade, Parque Histórico Nacional dos Guararapes dentre outros) (Romani, 2011; Sylvia, 2001 e 2006).

#### 2.1.2.1 Academia Pernambucana de Letras (APL)

Fundada em 26 de janeiro de 1901, no Recife, por Joaquim Maria Carneiro Vilela e outros escritores pernambucanos da época, a academia passou a ocupar o prédio em 1966, após este ser desapropriado pelo governo do estado e cedido para a APL. É uma instituição civil, de utilidade pública, entre seus membros, destacaram-se Ariano Suassuna, João Cabral de Melo Neto e Gilberto Freyre. Sendo à terceira academia de letras fundada no Brasil, a primeira foi a do Ceará, criada em 1894, três anos antes da Academia Brasileira de Letras (1897). É um monumento tombado desde 1968, pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional- IPHAN (Quintas, 2013; Suchodolski, 2016).

A APL localizada no bairro das Graças, possui em seu entono várias espécies arbóreas (palmeiras imperiais, macaíbas, pau-brasil, goiabeira, juá, jasmim e outras), próximo ao Rio Capibaribe e possui um intenso fluxo diário de veículos. O solar ou também chamado de vivenda foi construído em 1870, pelo comerciante português João José Rodrigues Mendes, que ao receber o título nobiliárquico ficou conhecido como Barão Rodrigues Mendes (ver figura 3).

O prédio possui painéis de azulejos portugueses de autoria desconhecida datados do século XIX, que revestem as fachadas oeste, sul e leste, numa extensão de 143 m<sup>2</sup>. As portas e janelas são em arco ver pleno. O piso, em mosaico inglês de retângulos coloridos, exhibe originais desenhos da segunda metade do século 19, apresenta também lustres franceses e demais ornamentos. Segundo o pesquisador Alberto José de Souza é “o casarão do Barão Rodrigues Mendes (Figura 3), trata-se de um testemunho da arquitetura clássica imperial, o mais perfeito exemplar de resistência que o classicismo do império legou ao país, uma joia da arquitetura classicista doméstica mundial” (Passos, 2015).

**Figura 3.** Casarão Rodrigues de Mendes século XIX (A), Sede da Academia Pernambucana de Letras século XXI (B e C) e detalhe do painel azulejar (E).



Fonte: Google imagens (A, B e C), Autora (E), 2018.

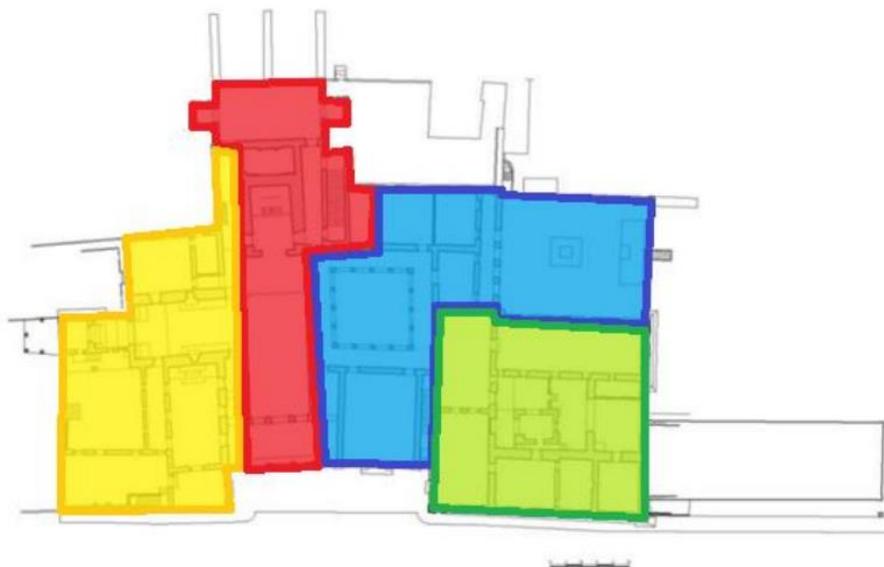
#### 2.1.2.2 Convento São Francisco de Olinda

O convento de São Francisco é parte de um conjunto arquitetônico católico de excepcional importância. Com uma área total construída de 6.294 m<sup>2</sup>, o Convento de São Francisco de Olinda está distribuído em três blocos (Figura 4). A primeira é a Igreja de Nossa Senhora das Neves, Capela de São Roque, em vermelho, a segunda seria a área conventual que pode ser subdividida entre aquela que envolve o claustro, sacristia e varanda, destacado em azul e a nova portaria, em verde. Por fim, o espaço da Ordem Terceira, em amarelo (Costa, 2017; Iphan, 2010).

A construção inicial desse conjunto religioso deu-se com a chegada da ordem franciscana no Brasil, datada de 1540, com projeto de autoria do frei Francisco dos Santos, chegando a se constituir o exemplar franciscano mais antigo do país. O terreno doado constituía uma colina com relevo acidentado em direção ao litoral – situação que demandou aterros e construção de muros de arrimo para aplainar a área de implantação do conjunto. (Iphan, 2010).

A igreja e convento foram tomados pelos holandeses no ano de 1630, e, no ano seguinte, o conjunto foi destruído no incêndio, ficando abandonado por muito tempo. Em 1654 o local foi reocupado e reconstruído de forma com o convento da cidade vizinha de Igarassu (Figura 5 a,b e c).

**Figura 4.** Planta do convento de São Francisco de Olinda com os blocos da igreja (Vermelho), claustro (Azul), portaria nova (Verde) e da Ordem Terceira (amarelo) (elaboração própria). Versão digital a partir de planta de abril de 1974. Sem escala



Fonte: Costa, 2017.

Apos um período de ampliações e reformas, o templo franciscano inicia uma fase de abandono e decadência, especialmente registrada em fins do século XIX, associada à determinação do Império Brasileiro de proibir a admissão de noviços e conventos. No entanto, no início do século XX, a ordem franciscana retorna ao Brasil, dando sequência às interações de melhoria e ampliação no monumento. Em 1945, são executadas obras na cobertura do torreão, onde se localiza a biblioteca e, posteriormente, entre os anos de 1952 e 1956 uma nova intervenção é realizada (JOnline, 2018).

O claustro e a sacristia são famosos pela série de painéis de azulejos portugueses do século XVIII, com cenas diversas. Na igreja, na sacristia e na capela chama a atenção o rico trabalho de talha em madeira do teto, com caixotões contendo pinturas do século XVIII que relatam a vida de São Francisco de Assis. No corredor que liga o claustro a sacristia (Figura 5d), os azulejos retratam cenas profanas compostas por fidalgos, pescadores, rebanhos, caçadores, casais, crianças, navios, entre outras. (Cavalcanti, 2006).

Os painéis de azulejos mais antigos de todo o conjunto são os que se localizam na Capela do Capítulo e Escadaria (Figura 5e,f). São provavelmente do período da construção do Convento. Estes podem ser descritos como azulejos do tipo massaroca de repetição (Simões, 1965, p. 77) nas cores azul e amarelo, sobre fundo branco com 99 desenhos do tipo tapeçaria.

**Figura 5.** Vila de Olinda (Pernambuco) após o incêndio de 1631, desenho de Frans Post no livro de Gaspar Baerleus (A), em detalhe o Convento Franciscano de Olinda (B), Vista da fachada da frente do Convento (C), painel de azulejos portugueses séc. XVI situados no corredor (D), Capela Capítulo e Escadaria (E e F), respectivamente.



Fonte: ZanchetI; Loretto; Moreira; Tinoco, 2011; Google imagens; Autora.

Capela do Capítulo é bastante exaltada, por ter sido o único ambiente que sobreviveu intacto ao incêndio ocorrido em 1631, já referido, causado pelos invasores holandeses. Hoje, esses azulejos encontram-se bem desgastados, apresentando em grande parte perda do vitrificado e rachaduras, (Silva & Muniz, 2018). O mosteiro tem ainda uma biblioteca com um precioso acervo de obras raras, e nele foi instalada a primeira biblioteca pública de Pernambuco.

Diante do exposto, constata-se que o conjunto franciscano, além da bela composição arquitetônica, dispõe de um rico acervo de bens móveis integrados, que agregam valor artístico e histórico ao monumento. Atualmente, o convento tem abrigado o curso de Teologia do Instituto Franciscano de Teologia de Olinda (IFTO) e foi incluído no rol dos monumentos do Centro Histórico de Olinda, tombado pela UNESCO como Patrimônio da Humanidade (Iphan, 2010).

### 2.3 AZULEJOLOGIA

A azulejologia termo utilizado por Santos Simões aborda o estudo da azulejaria, embora constitua ramo independente da cerâmica, está ligado a ela por terem sido inicialmente produzidos pela mesma matéria prima, e a partir do século XIX tornou-se peça de fabricação a parte da cerâmica (Alcântara, 1980).

As formas de produção dos azulejos apresentam três tipos: artesanal-produção conhecida desde os primórdios até os séculos XVI, manufatureira- utilizada no século XVII e industrial de tipo moderna, que inicio no século XVIII popularizando-se no século XIX (Alcântara, 1980; Simões, 1965).

Os azulejos artesanais e manufatureiros são considerados de qualidade inferior, nos quais não havia na época cuidados na fabricação das peças cerâmicas, desde escolha da argila, a temperatura de cozimento baixa, acabamento final e dentre outros aspectos, gerando peças cerâmicas mais porosas. Contudo as inovações tecnológicas advindas com a Revolução Industrial transformaram o processo de fabricação dos azulejos. Os azulejos fabricados nessa época têm como característica a melhoria da argila utilizada (base cerâmica de cor branca) é aparentemente menos porosa e mais resistente do que a de azulejos antigos (Sanjad, 2002).

Acredita-se que os azulejos antigos do século XVI e século XVII são mais vulneráveis a biodeterioração microbiana em virtude da baixa qualidade de produção, enquanto as peças cerâmicas produzidas após a evolução tecnológica são mais resistentes a patologias (Sanjad, 2002; Oliveira, 2001).

### 2.3.1 Produção dos azulejos

O azulejo denominado um produto especial da arte do barro cozido, no formato de placa de forma regular (quadrada, retangular ou poligonal) apresentada na figura 6, com espessura e tamanho variáveis, destinado ao revestimento de paredes. É constituído por duas faces: uma externa, vitrificada e decorativa; a outra, em barro, constitui a chacota (face interna do azulejo, que fica em contato com a superfície sobre a qual é assentado), também chamado de biscoito ou tardoz. Porém quando o azulejo passa a ser um bem integrado arquitetônico, ele adquire outros três integrantes, o suporte onde vai ser inserido, a argamassa e o rejunte que serão utilizados no seu assentamento, formando dessa maneira um corpo único constituído por diferentes materiais (Sandaj, 2002; Machado, 2003).

A sua produção envolve várias etapas, começando com a preparação da pasta cerâmica, secagem, queima de corpo cerâmico, vidrado e segunda queima do esmalte (Andrade, 1995).

**Figura 6.** Diferentes formatos de azulejos. (A) Quadrado e (B) Poligonal



Fonte: Cavalcante, 2001.

Fonte: Elias, 2014.

#### 2.3.1.1 Corpo do azulejo

Inicialmente o azulejo é constituído por argila que apresente entre 45 a 50 % de umidade. Para ser utilizada na cerâmica deve se acompanhada de outros materiais antiplásticos e fundentes, denominados de pasta cerâmica. A pasta cerâmica em geral têm 70% de substâncias plásticas e 30% de antiplásticas, os elementos mais frequentes independente do tipo da argila são oxigênio, silício, ferro, magnésio, potássio e sódio, destacando-se a sílica ( $\text{SiO}_2$ ) e a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (Andrade, 1995; Sandaj, 2001). Durante o preparo a pasta é bem amassada para evitar bolhas de ar, cuja presença provoca fraturas na hora da queima. Depois de bem amassado, é recortada num tamanho maior do que o desejado,

para que depois da retração prevista, o tamanho do azulejo seja o esperado. A secagem deve ser lenta, num local que não sofra variação térmica, livre do sol e correntes de ar. A argila deve estar totalmente seca para a cozedura (700° a 1400° C), pois a existência de umidade no seu interior provocará quebras durante o processo, depois de ir ao forno a argila passa ser chamada de biscoito ou chacota (Machado, 2003).

#### 2.3.1.2 Revestimento vidrado

Após a preparação da chacota, tem início o vitrificado. Trata-se de substância morfa, que cobre o corpo cerâmico sob a forma de camadas vítrias e tem um ponto de fusão mais baixo que o corpo do azulejo, é obtido a uma temperatura de 900°. Além de fazer parte integrante da decoração da peça, torna a superfície cerâmica mais impermeável e dura, protegendo-a contra as sujidades orgânicas e inorgânicas. É constituído por compostos de metais, tais como: sódio, potássio, cálcio e chumbo, com pequenas quantidades de óxidos de estanho, magnésio, zinco e bário (Machado, 2003). Se não houver uma boa adesão entre o vidrado e a chacota, umidade e os sais podem provocar microclimas favoráveis à adesão de micro-organismos e outros organismos.

Existem vários processos de preparação do vidrado, mas apenas os vidrados **crus e fritas**, se destacam ao longo do tempo. Nos vidrados crus, os componentes são moídos normalmente em moinhos de bolas, e depois misturados com água. Esta mistura é aplicada sobre a chacota ou sobre o **vidrado de base**. Nos vidrados fritas, os componentes sofrem fusão conjunta, normalmente dentro de um cadinho refratário, o qual deve conter os componentes crus já misturados e moídos. Depois da fusão, é necessário retirar a frita do cadinho antes do resfriamento. As fritas têm a vantagem de serem menos tóxicas devido às interações ocorridas entre os óxidos metálicos e os componentes de silício (Machado, 2003).

Em geral os vidrados se apresentam claros e translúcidos, podendo também atingir a cor amarelada devido ao ácido bórico. Os vidrados opacos são obtidos através da adição de óxido de estanho, ou pela adição de óxido de zircônio e de titânio. A coloração dos vidrados pode ser obtida com óxidos de metais de transição, como por exemplo, com o óxido de cobalto produz a coloração azul; óxido de cromo coloração verde opaco, o óxido de cobre a coloração pode variar desde o verde luminoso ao vermelho, o óxido de ferro pode originar um âmbito de cores, entre amarelo a castanho avermelhado. As misturas de vários compostos de óxidos de metal podem dar origem a diversas cores. Após a aplicação do vidrado tem início a

transferência do desenho para o azulejo. Depois de pintados são levados novamente ao forno para a total fixação do vidrado e da pintura (Machado, 2003).

Independente da técnica aplicada na fabricação dos azulejos, estes podem sofrer danos por patologias que levam a deterioração das peças, como em outros materiais de construção as características do substrato como: composição, porosidade, rugosidade e mineralogia da superfície são fatores importantes para determinar o grau de deterioração (Coutinho *et al.*, 2015).

### **2.3.2 Patologias dos azulejos**

Os painéis de azulejos, assim como outras peças arquitetônicas estão expostos às influências ambientais que podem levar ao desenvolvimento de várias patologias que ocasionam deterioração de tais peças. A deterioração pode ocorrer tão lentamente que se torna pouco perceptível ao longo do tempo ou dependendo das condições podem ocasionar a perda não só do bem integrado como do monumento em si (Silva *et al.*, 2013).

Em painéis externos a degradação se deve principalmente à ação do sol, chuva, os efeitos dos raios ultravioletas, as mudanças climáticas com variações bruscas de temperatura, e precipitações de chuvas, correntes de ar, a grande acumulação de umidade no solo e no ar enquanto dentro dos edifícios, umidade, infiltrações e o vapor ascendente através do sistema poroso do corpo cerâmico (Lima, 2012; Silva *et al.*, 2013). Muitas vezes, as patologias que se verificam nos revestimentos com azulejos são diretamente provocadas pelo mau estado de conservação da edificação onde estão integrados (Silva *et al.*, 2002; Aguiar, 2006).

Os principais danos verificados nos painéis azulejares é derivado basicamente de situações como, os defeitos de origem ou adquiridos durante a produção, como por exemplo, diferenças no coeficiente de retração do vidrado e do biscoito assim como a distribuição não homogênea do esmalte produz zonas com camadas de vidrado muito finas. Se não houver uma boa adesão entre o vidrado e o biscoito, torna-se muito frágil (Machado, 2009). Outros danos observados são: assentamento deficiente; exposição aos fatores abióticos como a umidade e sais; e aos biológicos e antrópicos. Dependendo do tipo do fator gerador do dano, estes podem acometer os azulejos em alteração cromática, concreção, desagregação, eflorescência, elementos espúrios, esfoliação, craquelê, lacunas, manchas superficiais; perda do vidrado, trinca, contaminação são apresentadas na tabela 1 (Freitas, 2015).

**Tabela 1.** Relação das principais patologias que podem ocorrer nos painéis de azulejos.

<b>Alteração cromática</b>	<b>Reação química dos elementos constitutivos do azulejo ou dos vernizes de proteção.</b>
<b>Desagregação</b>	Reação física de esfacelamento e dissolução do corpo cerâmico e vidrado em decorrência de ações físico-químicas deletérias. Muito comum ao rodapé.
<b>Eflorescência</b>	Depósitos geralmente brancos e porosos, sobre o corpo cerâmico do azulejo.
<b>Elementos espúrios</b>	Agressão à estética do similar e aos materiais do corpo cerâmico, com o emprego de material grosseiro na tentativa de reparo das peças.
<b>Esfoliação</b>	Desagregação com desprendimento de lâminas. (descamação) do vidrado e biscoito.
<b>Craquelê</b>	Microfissuras da superfície esmaltada, geralmente com formato circular, ou espiral, ou em forma de teia de aranha.
<b>Lacuna</b>	Área de perda total de um ou mais peças de azulejos.
<b>Manchas superficiais</b>	Sujidades superficiais sem comprometimento do corpo cerâmico.
<b>Perda</b>	Ausência de uma das partes do azulejo.
<b>Perda do vidrado</b>	Destacamento de parte ou totalidade do esmalte do azulejo, sem afetar o corpo cerâmico.
<b>Trinca</b>	Fissura no corpo cerâmico do azulejo.
<b>Contaminação</b>	Processo deletério de alterações físico-químicas no vidrado e biscoito pela proliferação de material biológico e químico.

Fonte: Freitas, 2015.

As paredes das construções antigas, que servem de suporte para os azulejos, sofrem “stress” interno por receberem água por ascensão através de hidroscoopia capilar, dissolvendo sulfatos e sais solúveis ativando os ciclos iônicos (cristalização de sais). Estes são lavados pela água através da porosidade, circulando no interior da parede e com a evaporação da água, provocando o desenvolvimento dos cristais que criam tensões internas. Como resultado dessas reações, a perda da camada vítrea possibilita a infiltração de água pluviais, provocando dilatações das partículas componentes e, conseqüentemente, o aumento e aceleração dos danos (Esteves *et al.*,2016).

Além disso, o processo físico-químico desenvolvido pela presença dos vapores de água e as reações iônicas dos sais provocam uma espécie de troca osmótica por capilaridade dos azulejos craquelados, destacando o vidro e criando microclimas favoráveis a contaminação biológica. A deterioração por contaminação é um processo que ocasiona também modificações físico-químicas no biscoito e vidro pela proliferação de estruturas biológicas, principalmente microbianas que se alimentam de sujeiras orgânicas e silicatos do corpo cerâmico, provocando danos nos azulejos, podendo chegar a ser o principal causador de patologias dentre os organismos vivos, ver as figuras 7 e 8 (Esteves *et. al.*; Braga, 2003; Lima, 2012).

**Figura 7.** Distribuição das causas da deterioração do acervo azulejar



Fonte: Lima, 2012.

**Figura 8.** Azulejos da APL danificados por patologias como: craquelê, perda de vidrado e contaminação.



**Legenda:** Seta (A) Craquelê (B) Perda de vidrado e (C) contaminação

Fonte: Autora, 2016.

As manifestações da ação microbiológica correm principalmente entre o vitrificado e a parte cerâmica (biscoito). O caminho de acesso dos micro-organismos a esta região de interface entre as duas camadas é o craquelê existente no vitrificado, que atravessa a seção transversal do mesmo (Sanjad *et al.*, 2009). Estes, juntamente com as juntas de qualquer painel, representam pontos de entrada de contaminação e a entrada para a deterioração de cada azulejo a partir do esmalte para o corpo da cerâmica e até mesmo a argamassa (Coutinho, 2015).

A biodeterioração no patrimônio azulejar por micro-organismos preocupa os técnicos de conservação e restauro que buscam ajuda científica para solucionar os problemas de preservação dos azulejos, visto que a contaminação microbiana ao substrato cerâmico é resultado de processos complexos que necessitam do conhecimento de outras áreas como da microbiologia (Caldeira *et al.*, 2015).

## 2.4 A MICROBIOLOGIA NA CIÊNCIA DA CONSERVAÇÃO

A responsabilidade de preservar o patrimônio cultural tem dado lugar à busca incessante de mecanismos mais eficientes para conservar o patrimônio, com um enfoque multidisciplinar e interdisciplinar, envolvendo profissionais ligados às áreas da engenharia dos materiais, arquitetura, química, física, biologia, história, arqueologia, restauro e dentre outras (Callol, 2013).

As pesquisas científicas relativas às questões das áreas da conservação e restauração visam apresentar respostas a problemas levantados pelos profissionais da área de conservação e preservação do patrimônio histórico artístico e cultural (Caldeira *et al.*, 2015). Apresentando respostas técnico-científicas, sobre a composição dos materiais constitutivos, a tecnologia de manufatura, o período histórico, o estado de conservação, bem como, o estudo da biodeterioração do artefato, contribuindo para uma melhor abordagem a obra de arte (Zanatta e Granato, 2016).

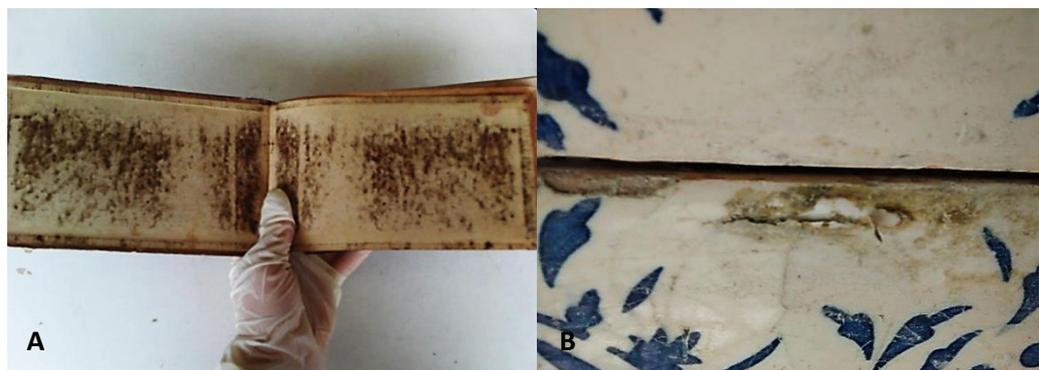
Os principais biodegradadores do patrimônio histórico são os micro-organismos, logo para combater esses organismos são necessários os conhecimentos da microbiologia, ramo da Biologia que estuda os seres microscópicos, como fungos e bactérias. As primeiras investigações sobre microbiologia aplicadas a ciência da conservação se iniciaram no século XX (Callol, 2013).

A biodeterioração ou microbiodeterioração causam diversos danos aos materiais, os quais estão sujeitos à decomposição por ação de enzimas específicas e/ou ácidos orgânicos, ou outros metabolitos produzidos pelas comunidades microbianas (Urzi *et al.*, 2007). A ocorrência de micro-organismos colonizadores de obras de arte pode causar diversas patologias (Figura 7), incluindo desde danos estéticos e/ou danos estruturais, devido a alterações físicas e químicas dos seus constituintes, e podendo também até ocasionar doenças graves aos manipuladores (Capodicasa *et al.*, 2010; Pepe *et al.*, 2011).

Os conhecimentos da microbiologia aplicados à ciência da conservação possibilitam uma investigação mais apurada do processo de biodeterioração, a partir do isolamento de micro-organismos presentes nas obras degradadas, por metodologias convencionais de isolamento em meios de cultura, complementadas com técnicas independentes de cultura. Embora a metodologia de isolamento caracterize apenas 5% da comunidade microbiana presente na obra, é importante o isolamento das cepas para realizar estudos de simulação laboratorial e até mesmo a possibilidade do descobrimento de novas espécies de micro-organismos (Rosado *et al.*, 2014).

Além do isolamento microbiano é utilizado ferramentas da Biologia Molecular, como a investigação através de DNA metagenômico (DNA total dos micro-organismos presentes), possibilitam a diferenciação de micro-organismos dentro das comunidades microbianas complexas e permite avaliar a dinâmica das comunidades (Pepe *et al.*, 2011, 2009; Rosado *et al.*, 2013)

**Figura 9.** Obras de arte danificadas por ação microbiana. (A) Livro de ata dos rodoviários do acervo da RFFSA (Rede Ferroviária Federal) e (B) Detalhe do azulejo deteriorado da fachada da APL (Academia Pernambucana de Letras).



Fonte: Autora, 2017.

As pesquisas na área da microdeterioração do patrimônio cultural tem se aperfeiçoado cada vez mais, atualmente recorrerem-se também a metodologias através de equipamentos sofisticados como, espectrometria de fluorescência de raios X dispersa de energias (composição elementar do suporte), calorimetria/espectrometria de emissão no visível (parâmetros de cor) e espectrometria de infravermelho (informação molecular) ou a análise de microfragmentos removidos de diferentes zonas biodegradadas, utilizando microespectrometria Raman (u-Raman), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e dentre outras equipamentos (Caldeira *et. al.*, 2015).

A utilização dessas novas metodologias contribuem para a detecção do crescimento microbiano em peças do patrimônio histórico, em estágios iniciais possibilitando o emprego de tratamentos de remediação não invasivos, ou até mesmo não requerendo intervenções de restauração (Lutterbach *et al.* 2013).

É de grande importância a aplicação das ferramentas biotecnológicas para a preservação e restauração do patrimônio cultural, mas ainda algumas ferramentas não são suficientemente utilizadas neste contexto, devido a uma separação que naturalmente existe entre arte e ciência. Contudo percebe-se o crescimento de pesquisas científicas com isolamento e caracterização molecular microbiana, principalmente de fungos associados a processos de biodegradação principalmente na Europa em especial Portugal (Rakotonirainy *et al.* 2010).

No Brasil, são poucos os trabalhos voltados para o conhecimento tecnológico sobre o azulejo considerado patrimônio nacional. Sabe-se de alguns casos de intervenção bem sucedidos, mas a com relação a biodeterioração microbiana, utilização de novos tratamentos e tecnologias continuam com uma carência de investigação científica (Sanjad, 2001).

Além do que a implementação de estratégias de investigação integradas para o estudo e valorização do património cultural é hoje em dia considerada uma questão crucial na perpetuação das obras para as gerações futuras assim como pode constituir igualmente um notável contributo para o desenvolvimento sócio econômico das regiões (Caldeira *et. al.*, 2015).

O estudo material de obras de arte e bens patrimoniais recorrendo a técnicas de análise *in-situ* ou através da análise laboratorial encontra-se hoje em dia estabelecido em metodologias que, de um modo geral, estão bem definidas e, apesar das pequenas diferenças observadas nas abordagens analíticas, é normalmente possível obter a informação dos materiais constituintes e dos produtos de degradação resultantes de processos físicos e químicos. No entanto, no que respeita aos processos de biodegradação, o conhecimento ainda está no início, não apenas no estudo dos biomecanismos, mas também na extensão dos seus efeitos e no desenvolvimento de novas metodologias preventivas e de tratamento (ROJAS *et al.*,2009)

## 2.5 BIOFILMES EM MONUMENTOS HISTÓRICOS

A biodeterioração dá-se com a formação de biofilmes no substrato afetado. Os biofilmes são complexos sistemas biológicos constituídos por diversos grupos taxonômicos e metabólicos de micro-organismos que se encontram associados à superfície ou intrínsecos, invadindo, em alguns casos, a totalidade do edifício (Morales *et al.*, 1998).

Segundo Schneider (2008), os biofilmes são comunidades de micro-organismos que podem viver aderidas a superfícies ou suspensas em solução, podendo, ou não, estar envoltas por matriz de exopolímeros, em que a posição espacial relativa dos organismos individuais é fixa durante uma geração e relativamente fixa nas gerações seguintes. O biofilme é um interessante fenómeno natural que, muitas vezes, aparece nas formas de microfilmes e/ou macrofilmes visíveis na superfície. O microfilme refere-se aos micro-organismos, já o macrofilme refere-se a organismos maiores. Sabe-se que tanto superfícies naturais quanto artificiais são suscetíveis à colonização de micro-organismos, formando uma fina camada de biofilmes microbianos. Esta consiste de grandes quantidades de metabólitos microbianos. A aderência bacteriana em superfícies é resultado de uma complexa comunicação entre as bactérias no ambiente e as características físicas, químicas e biológicas do substrato (Gu, 2005).

A deterioração microbiológica dos materiais depende da interação complexa entre o clima, os processos químicos e físicos, que por sua vez podem ser ainda mais complicados por novos elementos químicos decorrentes da combinação das características do substrato e poluição.

Entre os mecanismos típicos da biodeterioração microbiana está a produção de moléculas, tais como ácidos ou agentes complexantes, liberados pelas bactérias quimiorganotróficas e pelos fungos com o objetivo de diminuir a coesão do substrato. A ação direta de metabólitos exalados por organismos em substratos inorgânicos é a principal causa de biodeterioração química (Resende et al., 2008; 2001; Coutinho et al., 2015). A composição química dos objetos, o teor de higroscopicidade, pH, presença de impurezas sobre suporte e as características climatológicas do local favoráveis, são fatores também preponderantes para o desenvolvimento de colônias fúngicas e bacterianas (Esteves et al., 2016).

Quando os biofilmes fototróficos em cobre a superfície são estabelecidas uma sucessão de micro-organismos pode ocorrer, mormente líquens, bactérias, fungos, briófitas e finalmente plantas (Coutinho *et. al* 2015).

Os modelos de colonização consideravam as algas e cianobactérias como os organismos pioneiros na deterioração, dado que estes requerem apenas a luz solar, água e minerais para o seu desenvolvimento, assumia-se que estes abririam caminho para as bactérias heterotróficas, fungos e organismos superiores, promovendo o aparecimento de uma camada de alimento orgânico (Allsopp *et al.*, 2004). Dessa forma, a biomassa dos micro-organismos fotossintéticos pode ser utilizada por micro-organismos heterotróficos como fonte de carbono e energia (Miller *et al.*, 2011). Atualmente, porém tem vindo a ser referido que colonização inicial de monumentos pode ser realizada por bactérias e fungos organotróficos, em conjunto com organismos fotoautotróficos (Mateus *et al.*, 2013). As comunidades biológicas presentes em um substrato inorgânico são geralmente o resultado de colonizações sucessivas ao longo do tempo (Warscheid, 2004).

Algas verdes e cianobactérias são capazes de habitar solos e rochas húmidas. Estes micro-organismos fototróficos usam a luz como fonte de energia para sintetizar a matéria orgânica a parti de componentes de dióxido de minerais e carbono pela fotossíntese por isso são capazes de crescer em qualquer substrato inorgânico

O importante papel dos organismos na deterioração dos materiais de construção do Patrimônio Cultural é bem estabelecido, no entanto os métodos de controle e mitigação para estes processos de biodeterioração ainda estão longe de ser resolvidos (Coutinho *et. al* 2015).

Entre os mecanismos típicos da biodeterioração microbiana está a produção de moléculas, tais como ácidos ou agentes complexantes, como o ácido nítrico e o ácido sulfúrico, produzidos pelas bactérias quimiolitotróficas e os ácidos orgânicos, liberados pelas bactérias quimiorganotróficas e pelos fungos com o objetivo de diminuir a coesão do substrato. A ação direta de metabólicos exalados por organismos em substratos inorgânicos é a principal causa de biodeterioração química. Este fenômeno pode promover o aumento da porosidade capilar do corpo cerâmico e a formação de eflorescências, que podem enfraquecer a superfície do azulejo aumentando a susceptibilidade de outros tipos de deterioração. Outro mecanismo importante utilizado por líquens e fungos que podem levar também a destruição mecânica é através da penetração no substrato de suas estruturas filamentosas (Resende *et al.*, 2008; 2001; Coutinho *et al.*, 2015). Além disso, a biorreceptividade da superfície do material é um fator preponderante.

## 2.6. O COMBATE A BIODETERIORAÇÃO

Diferentes métodos de controle têm sido propostos no controle e combate à biodeterioração, entre estes, os métodos físicos, mecânicos e químicos. Entretanto, sua eficiência tem sido questionada. Os métodos físicos, como o uso de jato d'água, visam à ação rápida e melhoram de imediato a aparência do monumento, dando aspecto de limpeza. Entretanto, favorece a proliferação dos micro-organismos devido à umidade proporcionada ao substrato e, conseqüentemente, não interrompe os processos de biodeterioração, já que estimula o metabolismo, por exemplo, dos fungos e cianobactérias (Santos *et al.*, 2008).

No que se refere aos métodos mecânicos, tem-se o uso de espátulas para remoção dos micro-organismos aderidos ao substrato. Por sua vez, esse método não traz resultados positivos, pois fragmentos dos micro-organismos permanecem aderidos, podendo se regenerar (Mouga *et al.*, 2002)

Outro método físico usado é o emprego dos raios ultravioletas (UV), dos raios gama, do calor e do ultra-som. Para algumas situações, deve-se ter cuidado, pois o uso desordenado desses processos pode danificar a estrutura, a composição dos materiais, como celulose e tinta, contidas nas superfícies dos monumentos. Além do mais, cada micro-organismo possui uma sensibilidade e tolerância específica (Tiano, 1998).

Segundo Lopes (2003), para a intervenção nos edifícios históricos, pode ser empregado um método natural. Se a rocha a ser tratada for uma rocha carbonatada, um procedimento recente é a aplicação, nos monumentos, de bactérias capazes de fabricar carbonato de cálcio, que atua como protetor da superfície das pedras calcárias. Os métodos químicos merecem destaque e têm-se mostrado promissores, embora poucas pesquisas no Brasil tenham sido realizadas na tentativa de comprovar a sua eficácia, bem como definir o melhor biocida, tanto para o controle microbiano quanto para a preservação das características do monumento.

O desenvolvimento de novos biocidas é importante para os responsáveis pela conservação de azulejos históricos, visto que há pouquíssimas pesquisas com aplicação de biocidas em azulejos.

No entanto, a maioria dos biocidas, de uso corrente, foi desenvolvida para fins agronômicos e, portanto, não especificamente concebidos para utilização na restauração de artefatos de valor histórico, em que as normas são particularmente elevadas. Nesses casos, as interações com diferentes substratos devem ser cuidadosamente testados para evitar modificações indesejáveis (Koestler *et al.*, 1996).

No controle da biodeterioração de monumentos por fungos e bactérias, são empregadas, como foi dito, diversas substâncias químicas que podem causar danos ao suporte e ao ambiente. Seguindo as tendências recentes para o desenvolvimento "verde" de materiais sustentáveis e bio-ferramentas destinadas a enfrentar as necessidades e novos desafios no domínio da investigação aplicada ao património cultural, alguns grupos de pesquisa internacional investigam à descoberta e produção de novas moléculas bioativas e o desenvolvimento de novos biocidas mais eficazes e seguros para o utilizador e o ambiente, concebidos com metodologias biotecnológicas, passíveis de ser utilizados na prevenção de patologias e tratamento em Conservação e Restauro e/ou como aditivos de novos produtos (por exemplo. tintas e consolidantes), a utilizar no Património Cultural.

Outro ponto que deve ser levado em consideração para a análise do rendimento do biocida é a dosagem necessária para a eliminação dos agentes biológicos. Assim, quanto mais eficaz for o biocida, menor será a quantidade necessária, o que incrementa a relação custo/benefício e ainda proporciona redução dos possíveis efeitos indesejáveis desse composto (Fazenda, 1995; Saad, 2002). Diante disso, faz-se necessário que, para o emprego de um biocida, deve ser levada em conta sua eficácia contra uma ampla gama de micro-

organismos, o baixo custo, a biossegurança (baixa toxicidade) deste durante a manipulação pelo conservador e restaurador do monumento.

### **3 JUSTIFICATIVA**

A deterioração de azulejos históricos é um problema emergente no Brasil e necessita de maiores estudos técnico-científicos para aprofundar o conhecimento acerca do processo da biodeterioração dado a importância sociocultural do legado do patrimônio histórico dos acervos azulejares brasileiros. Além do que, há poucas pesquisas sobre o tratamento da biodeterioração de azulejos vitrificados brasileiros. É importante pesquisas como esta aqui proposta, visto que, o tratamento inadequado de um acervo azulejar deteriorado pode ocasionar diversos problemas desde danos irreversíveis a obra até impactos ambientais.

### **4 OBJETIVO**

#### **4.1 OBJETIVOS GERAL**

Investigar a presença de possíveis comunidades microbianas biodeterioradoras existentes em painéis de azulejos localizados nas fachadas externas e internas de monumentos históricos nas cidades de Recife e Olinda.

#### **4.1.2 Objetivos Específicos**

- Diagnosticar ambiental;
- Isolar e identificar os micro-organismos encontrados nos azulejos;
- Analisar da estrutura e composição dos azulejos;

## 5 REFERÊNCIAS

Aguiar, C. D. Azulejos em Pernambuco: Uma visão da arquitetura religiosa lusobrasileira nos séculos XVII e XVIII. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2006. TCC

Alcântara, D M.S. Azulejo, um documento de nossa cultura. In: WEFFORT, Francisco et al. Patrimônio azulejar brasileiro-aspectos históricos e de conservação. Brasília: Ministério da Cultura, p.27-76, 2001.

Alcântara, D. M. S. Azulejos Portugueses em São Luiz do Maranhão, Rio de Janeiro Editora Fontana, 104 pag, 1980.

Allsopp, D.; Seal, K. J.; Gaylard, C. C. Introduction to iodeterioration. 2nd. ed. Cambridge, USA: Cambridge University Press, 2004.

Almeida, F.F.N. Desafios e Perspectivas da Gestão do Patrimônio Cultural no Brasil, Architecton - Revista de Arquitetura e Urbanismo, Recife-PE – vol. 04, Nº 07, 2014.

Andrade, L. A. S. Barracão de barro-cerâmicas. 2ª edição, Uberaba, MG: Vitória, 1995.

BARATA, C. Azulejos no Brasil-séculos XVII, XVIII e XIX. 1995. Tese (Curso de professor catedrático de História da Arte) – Escola Nacional de Belas Artes, a Universidade do Brasil, Rio de Janeiro, 1995.

Bonieck, D.; I. de Castro Mendes, C.A.O. Paiva, U.G. de Paula Lana, A.F.B.; Santos.M.A. de Resende Stoianoff. Ecology and identification of environmental fungi and metabolic processes involved in the biodeterioration of Brazilian soapstone historical monuments. Letters in Applied Microbiology D. Rhodes, R. Hopper, Clay and Glazes for the Potter, Krause Publications, Lola, 2017.

Braga, M. ; Muhlbauer, P. S. R. E. C. F. ; Rondon, A. ; Lourenco, B. C. G. ; Caldas, W. ; Queiroga, I. R. ; Machado, Z. M. O. ; Branquinho, M. . Azulejo: Arte Milenar que Encanta a Nossa Cultura. In: Márcia Braga. (Org.). Conservação e Restauro. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Rio, p. 125-139, 2003.

Caldeira, A. T.; Rosado, T.; Silva, M.; Gonzalez, M.; Candeias, A. Microrganismos e património - Novas abordagens, Évora, v 4. p. 1-6, 2015

Callol, M. V. Biodeterioração do patrimônio histórico documental: Alternativas para sua erradicação e controle. Rio de Janeiro. Museu de Astronomia e Ciência Afins; Fundação Rui Barbosa, p.139-139, 2013.

Capodicasa, S.; Fedi, S.; Porcelli, A. M.; D, Zannoni. The microbial community dwelling on a biodeteriorated 16th century painting. International Biodeterioration & Biodegradation v 64 p. 727-733, 2010.

Carta de Veneza. Carta Internacional sobre a Conservação e o Restauro de Monumentos e Sítios. 1964

CAVALCANTE, S. T.; CRUZ, A. M. O azulejo na Arquitetura Civil de Pernambuco- Século XIX. Metalivros, pag 10, 2002.

- Correa, S. M. O Programa de Cidades Históricas: por uma política integrada de preservação do patrimônio cultural urbano. *Anais do Museu Paulista*. São Paulo. N. Sér. vol.24. n.1. p. 15-57, 2016.
- Costa Junior, O. Notas sobre motivos ornamentais e azulejos no Recife. In: *Revista do Arquivo público*. Recife, v. 33-34 n° 35-36, pp. 86-96, 1979-1980.
- Coutinho, M.L. Biological colonization on majolica glazed tiles: biodeterioration, bioreceptivity and mitigation strategies- 2015. 235f.
- Coutinho, M.L., Miller, A.Z., Gutierrez-Patricio, S., Hernandez-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. Biodegradation* 84, 322–332, 2013.
- Coutinho, M.L., Miller, A.Z., Macedo, M.F., Miller, A.Z., 2015. Biological colonization and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview. *J. Cult. Herit.* (In Press).
- Dakal, T.C. and Cameotra, S.S. Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. *Env Sci Eur* 1, 24–36. 2012.
- Dugnani, P. Azulejaria luso-colonial. In: *Revista Ângulo*, n°84, pp 14-18, Julho-Setembro de 2000.
- El Nouhy, H.A. Assessment of some locally produced Egyptian ceramic wall tiles. *HBRC J.* v 9, p. 201–209, 2013.
- Esteves, L.; Mirão, J.; Dias, L.; Caldeias, A.; Mimoso, J.M. Levantamentos in-situ da degradação de azulejos e da presença de sais. *Conservar Património*, Lisboa, v. 23 p.44-53, 2016.
- Elias, J. Breve história do azulejo no Irã. Blog Chá –de- Lima da Pérsia. Disponível em: <https://chadelimadapersia.blogspot.com.br/2014/10/breve-historia-do-azulejo-no-ira.html>. Acessado em 17.01.2018.
- Ettenauer, J.; Sterflinger, K.; Piñar G. Cultivation and molecular monitoring of halophilic microorganisms inhabiting an extreme environment presented by a salt-attacked monument. *Int J Astrobiol* 9:59–72, 2010.
- Fazio, A. T.; Andrea Cavicchiolib; Daysi, S.A; Chambergob, F. S.; Dalva L.A. Towards a better comprehension of biodeterioration in earthen architecture: Study of fungi colonisation on historic wall surfaces in Brazil. *Journal of Cultural Heritage* 76, 75–96, 2016.
- Fernandes, B. A proteção ao patrimônio histórico e cultural, Jusbrasil. 09.10.2015 Disponível em < <https://bfbarbara.jusbrasil.com.br/artigos/241245558/a-protecao-ao-patrimonio-historico-e-cultural>>
- Figueiredo, M.O. Study and characterization of cultural ceramic materials: the paradigmatic case of decorated tiles (in Portuguese). *Azulejo* 8–11, 11–20, 2003.
- Filho, O. P.S. Varandas de São Luiz- gradis e azulejos. Editora IPHAN, 180 pág. São Luiz, 2010.
- Freitas, Y. M. Azulejos portugueses dos séculos XVII e XVIII em Pernambuco: patologias e caracterização tecnológica – 2015. 196 f Dissertação.

Gaylarde, C.; Akiko Ogawa; Iwona Beech, Matthew Kowalski, Jose Antônio Baptista-Neto. Analysis of dark crusts on the church of Nossa Senhora do Carmo in Rio de Janeiro, Brazil, using chemical, microscope and metabarcoding microbial identification techniques. 2016

Guillitte, O. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies, *Sci.Total Environ.* v.167 p. 215–220, 1995.

Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). Inventário do Patrimônio Azulejar de Alagoas. Folder. Maceió, 2008.

IPHAN, Patrimônio Cultural, sem autor e ano 2014 disponível em <<http://portal.iphan.gov.br/pagina/detalhes/218>> Acessado em 28.02.2018.

IPHAN, Patrimônio Cultural, sem autor e ano 2014 disponível em <<http://portal.iphan.gov.br/mg/pagina/detalhes/1299>> Acessado em 28.02.2018.

Iphan/Programa Monumenta, Rotas do Patrimônio. Edição: 2010. Disponível em <[http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/12\\_roteiro\\_patrimonio\\_convento\\_sao\\_francisco\\_pe.pdf](http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/12_roteiro_patrimonio_convento_sao_francisco_pe.pdf)> Acessado em 20.03.2018.

Isola, D., Zucconi, L., Onofri, S., Caneva, G., de Hoog, G.S. and Selbmann, L. Extremotolerant rock inhabiting black fungi from Italian monumental sites. *Fungal Divers*

Junior, A. A. V. A preservação do patrimônio. Ciência e Diversão, blog informativo do Parque da Ciência. 24.09.2013. Disponível em <<http://parquedaciencia.blogspot.com.br/2013/09/a-preservacao-do-patrimonio.html>> Acessado em 28.02.2018.

JCOnline, Convento de São Francisco de Olinda: patrimônio do Brasil há 80 anos, 2018. Disponível em <<https://jconline.ne10.uol.com.br/canal/cidades/geral/noticia/2018/05/20/convento-de-sao-francisco-de-olinda-patrimonio-do-brasil-ha-80-anos-339804.php>> Acessado em 10.06.2018.

Júnior, O.C. Notas sobre motivos ornamentais e azulejos no Recife. *Revista do arquivo público, Recife*, 33-34: pág 86-96, 1979.

Koestler, R.J., Salvadori, O. Methods of evaluating biocides for the conservation of porous building materials. *Science and Technology for Cultural Heritage*, n. 5, p.63–68, 1996.

Lima, Z. M. C. Inventário do Patrimônio Azulejar do Maranhão. Edições AML, 504 p. São Luís, 2012.

Lutterbach, M. T. S; Oliveira, A. L. C.; Costa, A. C. A. A berlinda de aparato do imperador D. Pedro II: identificação de fungos em partes selecionadas e sua relação com biodeterioração e aerobiologia. *Conservar Patrimônio* v.17, 59-72. 2013.

Machado, Z. M. O. . Destrução do acervo azulejar brasileiro: Uma perda irreparável. In: 18º Encontro Nacional da ANPAP - Transversalidades nas artes visuais, 2009, Salvador. Artigos CPR. Salvador: EDUFBA, p. 2994-3007, 2009.

MateuS, D. M. R.; Silva, R.B.; Costa, F. M. C.; Coroado, J. P. F. Diversidade microbiológica do edifício da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e avaliação do seu controle por biocidas. *Conservar Património, Tomar*, v. 17 p. 11- 20, 2013.

Microalga e as biodeteriogens of stone cultural heritage: qualitative and quantitative research by non-contact techniques. In: Johanssen, M.N. (Ed.), *Microalgae: Biotechnology, crobiology and Energy*. Nova Science Publishers, New York, p. 345 – 358, 2011.

Miller, A.Z.; Rogerio-Candelera, M.A.; DIONÍSIO, A.; Macedo, M.F.; Saiz-Jimenez, C. Morales, O. O.; Duque, G. H. Biodeterioro de monumentos históricos Mayas. *Ciencia y Desarrollo, México*, v. 24, n.139, p. 48-53,

Moura, E. C. L. S. O fomento à salvaguarda dos acervos museais sob a gestão do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. *Revista Focos*, vol. 9, ano 1, 2016.

Oliveira, M.M., Sanjad, T.B.C., Bastos, C.J.P., 2001. Biological degradation of glazed ceramic tiles. In: Lourenço, P.B., Roca, P. (Eds.), *Historical Constructions*, Guimarães, Portugal, pp. 337–341.

Passos, J. Jorge Passos arquitetura & restauro, *Projetos- Academia Pernambucana de Letras* 2015. Disponível em < <http://jorgepassos.com.br/apl-projetos.php>> Acessado em 20.02.2018.

Pepe, O.; Palomba,S.; Sannino, L.; Blaiotta, G.; Ventrino,V.; Moschetti, G.; and Villani. Characterization in the archaeological excavation site of heterotrophic bacteria and fungi of deteriorated wall painting of Herculaneum in Italy. *Journal of Environmental Biology*. 32-241, 2011.

Quintas, F. *Academia Pernambucana de Letras: História e Patrimônio*. Editora bagaço, 100 páginas. 2013, Recife-PE.

Rakotonirainy, M. S.; Heude, E.; Lavedrine, B., ‘Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book’, *Journal of Cultural Heritage* (2010) 126-133.

Costa, R. F. A sacristia do convento de São Francisco de Olinda. Dissertação (Dissertação em em História da Arte Portuguesa) – U. Porto (Faculdade de Letras da Universidade do Porto). Porto, Portugal, 2017.

Resende, M. A. ‘Biodeterioração de documentos históricos’, in Melo, I.S. & AZEVEDO, J.L., *Microbiologia ambiental*, Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 2º Edição 2008.

Reys, A. C.; Lama, D. E. A.; Dehira, L. K. Monumentos da cidade de São Paulo: formas de alteração e conservação. *Revista CPC*, São Paulo, n. 5, p. 93-122, nov. 2007/abr. 2008.

Rodrigues, L. IPHAN lança emblema do Patrimônio Cultural Brasileiro. 16.08.2017. ABC-Agência Brasil. Disponível em< <http://agenciabrasil.abc.com.br/geral/noticia/2017-08/iphan-lanca-emblema-do-patrimonio-cultural-brasileiro>> Acessado em 27.02.2018.

Rojas, J. A., C. Cruz, J. F. Mikán, L. S. Villalba, M. C. Cepero de García, and S. Restrepo. Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63 p.169-175, 2009.

Romani, D. Azulejos um belo patrimônio sob ameaça. Revista Continente. Editora Cerpe: Recife, vol.123, pag. 22-33, Março de 2011.

Rosado, T.; Gil, M.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A. Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms- a comprehensive study. International Biodeterioration & Biodegradation vol. 63 pág.169-175, 2013.

Rosado, T.; Mirão, J.; Candeias, A.; M.; Mirão. Microbial communities analysis assessed by pyrosequencing-a new approach applied to conservation state studies of mural paintings. Anal Bioanal Chem. 2014.

Sanjad, T. A. B. C.; Costa, M. L.; Paiva, R. S.; Palácios, F. O. Ação microbiológica nos azulejos históricos das fachadas de Belém, região amazônica. Pós: Belo Horizonte, v. 4, n. 8, p. 124 - 133, 2014.

Sanjad, T. A. B. C. Patologias e conservação de azulejos: um estudo tecnológico de conservação e restauração de azulejos encontrados nas cidades de Belém e Salvador. 2002.

Santos Simões, J.M. Azulejaria Portuguesa no Brasil. 1500-1822. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1965.

Santos, A. B. Identificação biológica e aplicação de biocidas na população microbiana que forma os biofilmes de alguns monumentos históricos da Bahia / Adriano Braga dos Santos. 2011. 155 f.

Schneider, R. P. Biofilmes microbianos, In MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa-CPMA, p.125-150. 2008

Shirakawa, M. A.; John, V. M.; Cincotto, M. A. 'Biodeterioração de documentos históricos', Pág. 478-499. in Melo, I.S. & Azevedo, J.L., Microbiologia ambiental, Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 2º Edição, 647p. 2008.

Silva, T. P.; Figueiredo, Maria-Ondina; Prudêncio, M. I. Ascertaining the degradation state of ceramic tiles: A preliminary non-destructive step in view of conservation treatments. Applied Clay Science, 2013.

Silva, T.P., Figueiredo, M.O., Prudêncio, M.I. Tile pathologies: green stains in blue and white glazes from an 18th century tile panel figuring Lisbon. TECHNART2011 — Non-destructive and Microanalytical Techniques in Art and Cultural Heritage, Berlin, Germany. Book of Abstracts 172, 2011.

Silva, T.P.; Gomes, M.M.M.; Silva, A. R. São Bento Renascido conservação e restauro de azulejos do Palácio de São Bento. Lisboa: Assembleia da República- Divisão de Edições, 2002.

Siviero, F. P. Educação e patrimônio cultural: uma encruzilhada nas políticas públicas de preservação. Revista CPC, São Paulo, n.19, p.80–108, jun. 2015.

Silva, J.L.; Muniz, S.C. Leitura dos painéis figurativos historiados de azulejos dos conventos franciscanos de Olinda e do Recife dos séculos XVII e XVIII. *Revista Noctua – Arqueologia e Patrimônio* 38 <https://doi.org/10.26892/noctua.v1i3p38-64>.

Steiger, M.; Charola, A.E.; Sterflinger K. Weathering and deterioration. In: Siegesmund S, Sneath R (eds) *Stone in architecture*. Springer, Berlin, página 291–304, 2011.

Sterflinger, K.; Little B.; Pinar, G.; Pinzari, F.; Rios, A.; J.-D., Gu. Future directions and challenges in biodeterioration research on historic materials and cultural properties. *Biodeterioration & Biodegradation*, 2018.

Sterflinger, K.; Piñar, G. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills *Microbiol Biotechnol*, vol 97 páginas 9637–9646, 2013.

Suchodolski, S. G.; Gorgulho, L. F. *Preservação do patrimônio cultural brasileiro / Organizadores: Sergio Gusmão Suchodolski e Luciane Fernandes Gorgulho ; [prefácio de Luciano Coutinho]. – Rio de Janeiro : BNDES, 208 p. 2016.*

Sylvia, T. H.C. *O Azulejo na Arquitetura Religiosa de Pernambuco: Séc. XVII e XVIII*. Editora Metalivros, 1ª edição, 2006.

Sylvia, T. H.C.; Cruz, A. M. *O azulejo na arquitetura Civil de Pernambuco século XIX*. Editora Metalivros, 1ª edição, 2002.

Tiano, P. Biodeterioration of monumental rocks: decay mechanisms and control methods. *Science and Technology for Cultural Heritage*. 1998. Disponível em: <[www.arcchip.cz/w09/w09\\_tiano.pdf](http://www.arcchip.cz/w09/w09_tiano.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2017.

Urzì, C.; F. De Leo. Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. *International Biodeterioration & Biodegradation* v. 60 p. 25-34, 2007.

Villani, F. Characterization in the archaeological excavation site of heterotrophic bacteria and fungi of deteriorated wall painting of Herculaneum in Italy. *Journal of Environmental Biology* v. 32 p. 241- 250, 2011.

Warscheid, T., ‘Prevention and Remediation against biodeterioration of building materials’, in *Proceedings of the Second International RILEM Workshop on Microbial Impact on Building Materials*, ed. M. Ribas Silva, RILEM Publications SARL, Bagneux, 2004.

Weffort, F.; Neto, P. T.; Dias, M. C. V. L.; Silva, M. J. E. S.; Bernardes, H. G.; Souto, J.Únia.; Alcântara, D.; Meco, S.; Marques, M. E.; Malhoa, M.; Sant’Anna, G.G.; Oliveira, M. M.; Fernandes, E.R.; Castro, A.; Fernandes, E.; Cunha, H.; Lordelo, A. M. S. *Organização Maria Cristina Vereza Lodi Dias. Patrimônio Azulejar Brasileiro: Aspectos históricos e de conservação*. Brasília: Ministério da Cultura, 200 páginas. 2001.

Werneck, G. Insetos ameaçam patrimônio histórico. *Revista- Conservação & Restauro IFMG - Ouro Preto - MG*, 16.01.2010. Disponível em <<http://conservacaoerestaurouifmg.logspot.com.br/2010/01/insetos-ameacam-patrimonio-historico.html>> Acessado em 28.02.2018.

Zanatta ,E. M. ; Granato, M. Subjetividade e Objetividade: as decisões nos processos de conservação e restauração dos bens culturais. XVII Encontro Nacional de Pesquisa em Ciência da Informação (XVII ENANCIB), 2016.

Zanirato, S. H. Experiências de prevenção de riscos ao patrimônio cultural da humanidade. Ambiente & Sociedade, Campinas v. XIII, n. 1 p. 151-164 jan.-jun. 2010.

## ARTIGO 1

Diversidade de bactérias e fungos em azulejos da Academia Pernambucana de Letras

### RESUMO

Os painéis decorativos de azulejos brasileiros constituem um patrimônio cultural valioso para a população. O estado de Pernambuco, no Brasil, é considerado uma das regiões com mais representantes de edificações com valiosas fachadas de azulejos. São obras de arte que estão em constante exposição ao ar livre e conseqüentemente vulneráveis às ações da biodeterioração. Os micro-organismos são um dos principais agentes envolvidos no processo de biodeterioração do patrimônio cultural. Objetivo dessa pesquisa foi realizar uma bioprospecção superficial dos fungos e bactérias presentes nas fachadas de azulejos da Academia Pernambucana de Letras, até o momento este é o primeiro trabalho científico no estado que visa isolar e identificar os micro-organismos encontrados nesse substrato. As coletadas foram realizadas em 11 pontos das fachadas leste, oeste e sul do casarão e posteriormente levadas para laboratório. Recorreu às técnicas tradicionais de isolamento microbiano, através seis meios de cultura: BDA, MEA, PGRBA, MH, R2 e TSA, e não foi visto em nenhum outro trabalho de biodeterioração que tenha utilizado uma variedade de meios de cultura como este apresentado. A identificação da população microbiana foi por taxonômica clássica e fragmentos de azulejos com estruturas aderidas entre vitrificado e os biscoitos foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e corados com calcofluor. Não houve diferença significativa entre os meios de cultura utilizados, mas sugerimos a utilização de meios de cultura específicos, dois para fungos (MEA e PGRBA) e dois para bactérias (TSA e R2), sendo um rico e o outro pobre em nutrientes. A diversidade microbiana sofreu influências ambientais, resistentes ao estresse, capazes de crescer a altas temperaturas, níveis de UV, na presença de baixa umidade e tóxicas emissões de combustíveis fósseis. Foi observada uma relação do grau de deterioração do suporte com densidade dos organismos, os pontos 1 e 2, da fachada leste, apresentaram as peças mais deterioradas e foram os mais abundantes tanto nº de UFC como em nº de isolados microbianos. Nesse trabalho foi isolado um total de 175 cepas bacterianas, sendo 23 de actinomicetes e 188 de fungos, destes sete são leveduras. Dos isolados fúngicos a espécie *Aspergillus fumigatus* correspondeu a 37% da biodiversidade de fungos e o isolado *Syncephalastrum racemosu*, até o momento é o primeiro relato dessa cepa em azulejos vitrificados. Verificou-se a partir das imagens do MEV e da coloração com Calcofluor a presença de várias estruturas microbianas entre o vitrificado e o corpo cerâmico.

Palavras chave: Biscoito de azulejo; Rejunte; Argamassa; Calcofluor; Actinomycetes.

## 1 INTRODUÇÃO

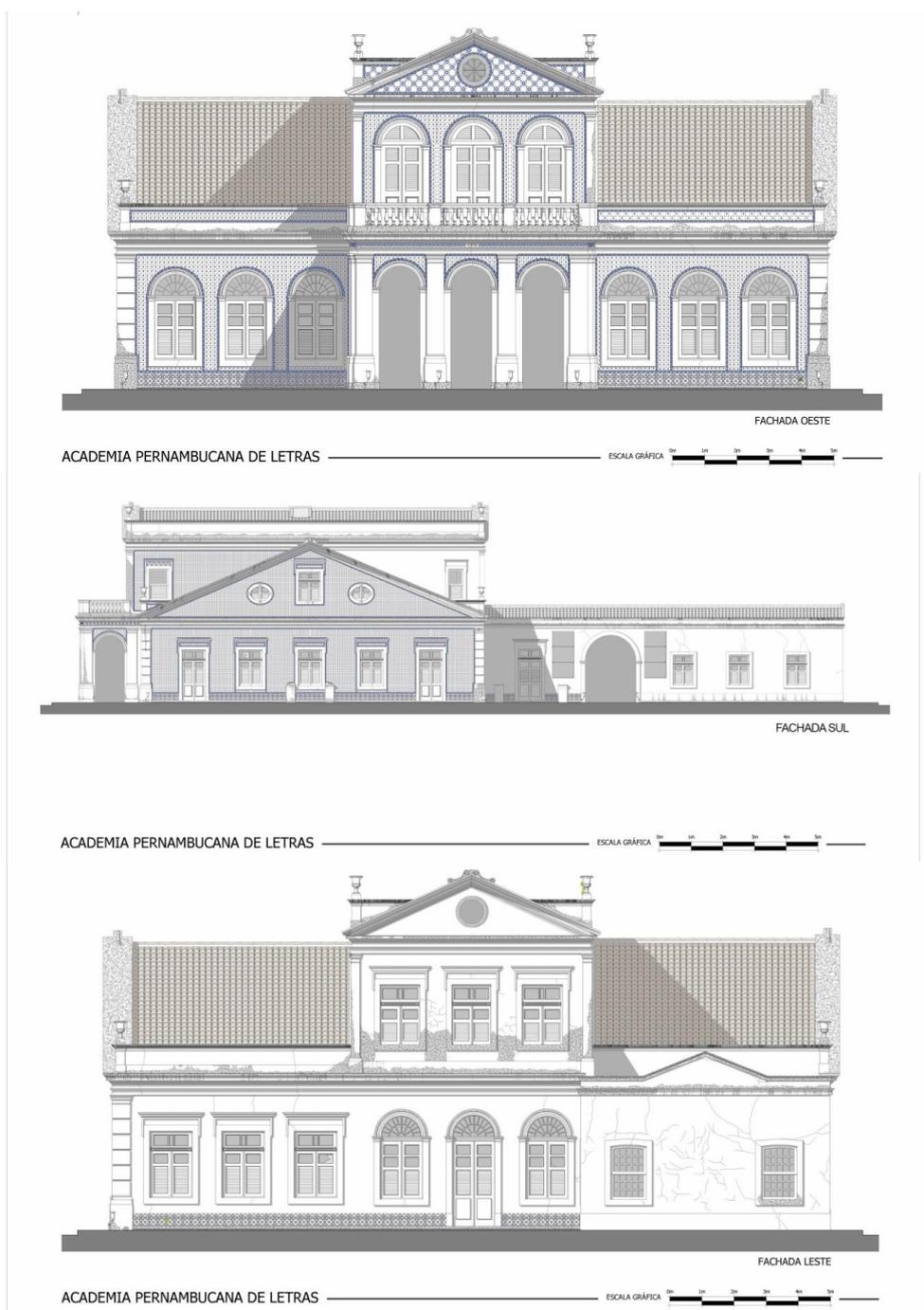
Os bens patrimoniais representam o legado e memória de uma Nação, além de possuírem um valor material e estético, conservam em si elementos da História do lugar e de sua população (Kother *et. al.*, 2015). Os azulejos vitrificados brasileiros fazem parte desse legado cultural, a utilização dessa peça cerâmica remota desde o antigo Egito por volta de 3000 ac. se tornou uma tradição no Oriente e em seguida na Europa graças aos árabes (El nouhy, 2013). Chegando ao Brasil no período colonial difundindo-se principalmente nos estados do Pará, Maranhão, Pernambuco, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Nestas regiões encontram-se os maiores e mais significativos acervos de azulejos históricos do Brasil (Cavalcante, 2002). Em Pernambuco a cultura de revestir edificações nas áreas internas ou externas, de diferentes espaços tais como; igrejas, conventos, casarões, palácios, jardins e até cemitério com azulejos foi um marco da arquitetura civil e religiosa de Pernambuco, tornando segundo Simões o estado em que o azulejo se “nacionaliza brasileiro”. Uma das edificações que expressa bem o empoderamento dos azulejos na arquitetura civil de Pernambuco é Academia Pernambucana de Letras (APL), também conhecida como Casarão do Barão Rodrigues Mendes. O casarão foi construído em 1870 e revestido com azulejos portugueses do século XIX. Sendo considerada por especialistas como uma das únicas edificações históricas no estado que possui extensas fachadas de azulejos vitrificados. Os azulejos da APL, assim como tantos outros acervos azulejares, estão expostos a diversos intemperismo, tais como: fatores antropogênicos (descaso do poder público, abandono do proprietário e vandalismos) e fatores ambientais: físicos (radiação solar, chuvas, umidade e ventos), químicos (sais minerais e poluição atmosférica) e biológicos (animais, plantas e micro-organismos). Os fatores bióticos ou também chamados biodeterioradores são apontados como um dos principais causadores de danos aos azulejos, com destaque ao ataque microbiano que causa danos irreversíveis a obra (Crespo 2016). A ação em conjunta ou não dos fatores citados estão levando a extinção desse rico patrimônio brasileiro. Identificar os micro-organismos deterioradores é um passo importante para entender os mecanismos de deterioração, para o desenvolvimento de tratamentos mais específicos e estabelecimento de novas biotecnologias. A presente pesquisa teve como objetivo investigar os fungos e bactérias possivelmente causadores da deterioração das fachadas de azulejos de um dos mais importantes patrimônios culturais do estado a Academia Pernambucana de Letras.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. LOCAL DE ESTUDO

As amostras de azulejos foram retiradas das fachadas da Academia Pernambucana de Letras – APL. O casarão da APL está situado na cidade do Recife-PE/ Brasil em uma área urbana, com intenso fluxo diário de veículos automotores, e acerca de 560 metros de distância Rio Capibaribe. A edificação possui três fachadas com azulejos, a leste, oeste e sul, o lado norte não possui azulejos. Na figura 1 apresenta o desenho arquitetônico da Academia Pernambucana de Letras, detalhe para as fachadas de azulejo portuguesas do século XIX.

**Figura 1.** Desenho arquitetônico da Academia Pernambucana de Letras (APL).



## 2.2. COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas em 11 pontos das fachadas leste, oeste e sul (figura 2). Diferentes elementos, tais como; a distância do solo, umidade, incidência solar, manchas e estado de conservação dos azulejos foram considerados para a escolha dos pontos. Com auxílio de uma espátula esterilizada realizou-se uma raspagem delicada e superficial da região do rejunte, para não danificar a peça. Também, foram retiradas amostras da parte vitrificada, parcialmente soltas, assim como, fragmentos da chacota exposta dos azulejos mais deteriorados. Em seguida o material foi acondicionado em placas de Petri esterilizadas e levadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI), departamento de Antibióticos do Centro de Biociências da UFPE (DANTI-CB/UFPE).

**Figura 2.** Mapeamento dos pontos de coleta nas fachadas de azulejos da Academia Pernambucana de Letras, Recife-PE/Brasil.



Legenda: 1- Janela Direita no Alto Rui (JDAR); 2- Janela Direita no Baixo Rui (JDAR); 3- Arcos Rui Barbosa (AR); 4- Porta Rui (PR); 5- Janela Superior Rui (JSR); 6- Janela Esquerda no Alto Rui (JEAR); 7- Janela Esquerda no Baixo Rui (JEAR); 8- Janela Malaquias (JM); 9- Porta no Alto Malaquias (PAM); 10- Porta no Baixo Malaquias (PBM) e Janela do Estacionamento (JE).

## 2.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

Com os fragmentos dos azulejos e dos rejuntas foram preparadas suspensões, sendo pesado 0,1g e transferido para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada, após homogeneização, em agitador de tubos de ensaio, por um minuto para favorecer o desprendimento de estruturas microbianas da amostra. Depois, 100 µL da suspensão foram transferidas para placas de Petri contendo meios de cultura: Batata Dextrose Ágar (BDA), Rosa de Bengala Peptona Glicose (PGRBA) e Extrato de Malte Ágar (EMA) suplementados com cloranfenicol (50mg/L), para os fungos e Ágar Mueller-Hinton (MH), Ágar Triptona de Soja (TSA) e R2 suplementados com 50mg/L de nistatina para culturas bacterianas. As placas de Petri foram mantidas a 30°C por 168 horas, a cada 24 horas realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e no sétimo dia a purificação das colônias. Na sequência os isolados fúngicos foram semeados em meio BDA com 50mg/L de Cloranfenicol, e os bacterianos em ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) e MH ambos contendo 50mg/L nistatina. Posteriormente, o material semeado foi incubado a 30°C por cinco dias. Todo o ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *T*.

## 2.4. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS

Para os fungos filamentosos a identificação foi realizada através da técnica de cultura em lâmina de Sidrim *et. al.*, 2004. Para a identificação através de taxonomia clássica de todas as amostras de fungos foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas). A identificação foi realizada através de literatura específica, como: Benny (1982), Domsch (1993), Hesseltine & Fennel (1995), Jacobs & Botha (2008), Pitt *et. al.* (1988); Klich (2002), Raper e Thom (1949), e Subrahmanyam (1983). As leveduras foram identificadas por testes bioquímicos de acordo com Barnett *et al.*, 2000 e Hoog, 2000. Complementando a identificação taxonômica clássica estão sendo realizados testes moleculares.

## 2.5. IDENTIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS BACTÉRIAS

Para os isolados bacterianos, procedeu-se o teste de coloração de Gram, catalase e de oxidase, tendo como base a literatura *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Os resultados dos testes e das colorações foram utilizados para efetuar a identificação dos micro-organismos presentes nas amostras. Enquanto que, os isolados de actinobactérias realizou-se a

observação da micromorfologia, cada linhagem foi cultivada pela técnica de microcultivo segundo a técnica de Shirling e Gottlieb (1966).

## 2.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras da parte vitrificada e pedaços do biscoito dos azulejos foram lavados e fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído / 4% de formaldeído em um tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, a pH 7,2, posteriormente submetidos a ponto crítico usando CO<sub>2</sub> líquido e revestido com ouro coloidal e por ultimo as amostras foram montados em suporte de alumínio, examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura JEOL-5600LV (Jeol, Tokyo, Japan), seguindo a técnica adaptada de Neto et. al., 2017. Os procedimentos de preparo e leitura das amostras foram realizados no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- LIKA/UFPE.

## 2.7. CORANTE FLUORESCENTE CALCOFLUOR WHITE M2R

A técnica de coloração da parede celular fungica foi utilizada para visualizar estruturas filamentosas no biofilme presente nos fragmentos de azulejos obtidos. Seguindo a técnica Harrington *et al.*, 2003, o preparo e leitura das amostras foram feitas no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco.

## 2.8. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS

Com o objetivo de caracterizar a composição mineralógica dos azulejos do Convento de São Francisco, as peças foram analisadas por espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) no DEN-UFPE (Departamento de Energia Nuclear) na Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. AS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS E OS MEIOS DE CULTURA

As unidades formadoras de colônias bacterianas aparecerem após 24 horas e os fungos filamentosos/leveduras após 48 horas, o número de unidades formadoras de colônias das bactérias foi maior do que dos fungos. É esperado que as bactérias se desenvolvessem mais rápido do que os fungos por causa da sua forma de reprodução, porém a quantidade de isolados fúngicos foi maior do que de bactérias. Estatisticamente não houve diferença significativa no número de unidades formadoras de colônias entre os meios MH e TSA, mas quando comparados com R2 estes dois meios foram melhores em quantidade de unidades

formadoras de colônias, embora o maior número de isolados de actinobactérias tenha sido observado em R2, visto que, é um meio de cultura de baixo valor nutricional favorece o desenvolvimento de organismo de crescimento mais lento, como os actinomicetes. Também não houve diferença significativa entre os meios BDA, MEA e PGRBA.

Corroborando com o trabalho de Cabo Verde *et. al.*, 2015, em que sua carga microbiana superficial do painel de azulejos Grande Vista de Lisboa não foi significativamente diferente ( $P > 0.05$ ), devido ao método superficial aplicado de coleta e a utilização apenas do meio de cultura TSA. O autor ainda afirma que o número maior de isolados microbianos é dependente de meios de cultura e das interações entre os micro-organismos presentes na amostra. Logo a escolha de meios de cultura é também um fator importante na determinação do crescimento microbiano e deve ser levado em consideração. Coutinho *et. al.*, 2012 através de métodos de meio de cultura identificou uma maior diversidade de micro-organismos do que as identificadas com métodos de biologia molecular.

A utilização de meios com diferentes composições possibilita isolar micro-organismos heterotróficos (separados entre bactérias e fungos) e também autotróficos, como visto por Mateus *et. al.*, 2013 que isolou micro-organismos de superfícies rochosas da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar. De forma geral, procura-se o isolamento de micro-organismos presentes nas obras degradadas, por metodologias convencionais de isolamento em meios de cultura, complementadas com técnicas independentes de cultura (Caldeira *et al.*, 2015), nessa perspectiva alguns dos isolados obtidos no presente trabalho encontram-se em processo de identificação molecular.

Dentre os onze pontos de coleta, o ponto 1 foi o que apresentou tanto o maior número de unidades formadoras de colônias 615,2 UFC como de isolados (26) bacterianos, obtidos nos meios MH, TSA e R2. Enquanto que os pontos 9 e 10 foram os que apresentaram o menor número de UFC (32,2) e (24,1), e o menor número de isolado foi no ponto 5 com apenas 2 isolados bacterianos, dados apresentados na tabela 1.

Enquanto o ponto 2 foi o que expressou a maior quantidade de unidades formadoras de colônias (22,2 UFC) e de isolados fúngicos (37) crescidas nos meios de cultura BDA, MEA e PGRBA, como mostra a tabela 2. Foram isolados um total de 165 cepas bacterianas, sendo 23 de actinomicetes e 197 de fungos, sendo 7 leveduras.

**Tabela 1.** Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de isolados bacterianos relacionando o ponto de coleta e o meio de cultivo

	UFC				N° de isolados (unidade)			
	MH	TSA	R2	Total	MH	TSA	R2	Total
<b>Ponto</b>								
<b>1</b>	277,5	322,1	15,6	615,2	9	10	7	26
<b>2</b>	86,7	54,0	33,2	174	7	6	6	19
<b>3</b>	183,9	125,7	14,1	323,8	6	8	9	23
<b>4</b>	50,3	39,6	27,7	117,7	5	5	2	12
<b>5</b>	99	31,3	0,0	130,3	1	1	0	2
<b>6</b>	149,3	94,6	60,7	304,7	8	5	5	18
<b>7</b>	168,8	101,6	47,4	317,9	9	5	6	20
<b>8</b>	49,0	78,5	7,2	134,8	5	5	0	10
<b>9</b>	9,5	19,6	3,0	32,2	6	4	1	11
<b>10</b>	10,2	9,8	4,0	24,1	5	5	1	10
<b>11</b>	52,3	51,8	40,4	144,5	4	6	3	13

MH= Mueller Hinton; TSA= Ágar triptonsoja; R2= Meio para heterotróficas.

**Tabela 2.** Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos isolados de fungos relacionando o ponto de coleta e o meio de cultivo

	UFC				N° de isolados			
	BDA	MEA	PGRBA	Total	BDA	MEA	PGRBA	Total
<b>Ponto</b>								
<b>1</b>	2,2	4,2	0,9	7,4	8	5	5	18
<b>2</b>	6,6	4,4	11,1	22,2	13	13	11	37
<b>3</b>	0,5	1,5	0,5	2,8	6	6	1	13
<b>4</b>	1,2	0,9	0,2	2,3	6	6	1	13
<b>5</b>	0,6	1,3	0,0	1,9	2	5	0	7
<b>6</b>	5,3	6,6	0,7	12,7	13	11	4	28
<b>7</b>	5,6	3,6	1	10,2	13	11	5	29
<b>8</b>	0,4	0,3	0,3	1,1	1	1	2	4
<b>9</b>	2,0	1,7	2,7	7,5	6	5	7	18
<b>10</b>	2,3	2,6	0,9	5,9	6	7	5	18
<b>11</b>	1,5	2,6	3,3	7,4	4	5	3	12

BDA= Batata Dextrose Ágar; MEA= Ágar Extrato de Malte; PGRBA= Ágar Peptona Rosa de begala.

Provavelmente um dos fatores que contribui para a diversidade microbiana encontrada nas fachadas de azulejos foi o estado de conservação dos mesmos, os pontos 1 e 2 apresentavam azulejos bastante deteriorados, com fragmentos soltos de vitrificado, craquelê<sup>1</sup>, biscoito exposto<sup>1</sup>, desprendimento de rejunte e várias manchas verdes e pretas. Enquanto o lado da fachada referente aos pontos 8 e 9, seus azulejos haviam passando por processo de restauro a pouco tempo o que pode explicar o menor número de isolados obtidos.

Quando comparado o número isolados fúngicos com os bacterianos dos pontos da fachada oeste sul o número de cepas fúngicas é maior do que das bactérias, provavelmente o método de higienização utilizado no processo de conservação dos azulejos tenha removido com mais facilidade as bactérias do que os fungos, uma vez que, este ultimo possui estruturas filamentosas que conseguem penetrar e se fixar na superfície rochosa (Boniek *et. al.*, 2017).

Contudo o ponto 5 mesmo sendo uma fachada com azulejos deteriorados, foi a que apresentou o menor nº de UFC e de isolados microbianos, provavelmente por ser o local de coleta mais distante do solo, incidência maior da chuva, alta exposição a radiação e baixa umidade. Além disso, o processo de biodeterioração está diretamente relacionado à disponibilidade de água e nutrientes para os micro-organismos Warscheid, *et. al.*, 2000. John, *et. al.*, 1988 e Giacomucci, *et. al.*, 2011, também observaram que a biodiversidade de micro-organismos em peças de cerâmicas arquitetônicas sofreu influências ambientais.

Os fungos são encontrados em habitats variados, tanto em água doce como salgada, terra e ar, seus esporos podem ser disseminados pelo vento, água, insetos, pássaros e até seres humanos, como o casarão da APL, é um centro que recebe bastante visitante, está situado em uma região muito arborizada, perto de rio e com intenso fluxo de carros automotores, no qual fornece uma variedade de compostos orgânicos - principalmente alcanos (produzidos pela combustão da gasolina) - que são responsáveis pelo revestimento preto nos azulejos, que serve de nutrição para o crescimento microbiológico (Pérez-Rodríguez, *et. al.*, 1998) tais condições acima citadas, desempenham um papel decisivo no tipo de colonização e dos processos de deterioração experimentados pelos bens culturais (Herrera *et al.*, 2004). Isto é comprovado pela alta biodiversidade de micro-organismos (Tabelas 1 e 2), bem como os resultados em imagem das estruturas verdes analisadas pelo MEV.

Embora a metodologia de isolamento não permita a caracterização completa das comunidades microbianas presentes nas obras de arte e alguns micro-organismos não possam ser cultivados em condições laboratoriais, a presença de culturas puras de isolados permite

efetuar estudos de simulação laboratorial, em condições controladas e a utilização de elevadas densidades celulares pode tornar-se uma ferramenta útil na compreensão de alguns processos (Caldeira *et al.*, 2015).

Portanto a utilização de técnicas de isolamento de micro-organismos biodegradadores é fundamental para se conhecer os espécimes envolvidos no processo, uma vez que há poucos trabalhos focados na investigação dos mesmos. Ao passo que atende também a necessidade de informar ao restaurador/proprietário pela obra sobre os possíveis impactos da microbiota identificada.

### **3.2. DIVERSIDADE MICROBIANA NOS AZULEJOS DA ACADÊMICA PERNAMBUCANA DE LETRAS**

As bactérias encontradas nas faixadas de azulejos da APL correspondem a 45,6% da comunidade microbiana, a partir das análises morfológicas e testes bioquímicos foram observados diferentes estruturas provavelmente pertencentes ao grupo firmicutes, apresentado os seguintes arranjos; bastonetes curtos e longos, diplobastonetes, cocos, cocobacilos e diplococos, ver tabela 3. Laiz *et al.*,2003 identificou também bactérias na sua grande maioria pertencentes ao grupo firmicutes, assim como; Pepe *et. al.*,2010 e Mateus *et. al.*,2013, também isolaram bactérias com morfologia de bastonetes e cocos. O grupo firmicutes é composto por bactérias com capacidade de produzir EPS (Matriz de Polímero Extra celulares) (Figura 7). Isso permite sua fixação e sobrevivência em ambientes inóspitos, como azulejos (Coutinho *et. al.*, 2012).

Dos 175 isolados bacterianos 13% são de bactérias filamentosas, foram identificados dois gêneros *Streptomyces sp. e Norcardiopsis sp.* O filo Actinobacteria foi identificado em substratos mineralógicos ricos em Ferro, Potássio, Magnésio e outros. Tais componentes químicos também foram vistos nos azulejos da APL (imagem 8). Embora a fachada esteja exposta a sazonalidade de chuvas que podem remover alguns micro-organismos aderidos ao substrato, porém como as actinobactérias possuem células que formam hifas, esta sua característica morfológica pode está favorecendo sua fixação ao substrato. Outra característica importante de alguns actinomicetes é que são conhecidos por produzir diversos tipos de pigmentos em condições de estresse (Oliveira, 2017) e estes pigmentos podem está relacionados às manchas presta encontradas no painel (figura 3). Gaylarde, 2016 em investigou as manchas pretas em fachadas externas de monumentos e actinobactérias, assim como Ettenauer *et al.*, 2014, e associaram a descoloração e manchas bactérias filamentosas.

**Figura 3.** Azulejo da APL deteriorado detalhe para a mancha preta na parede.



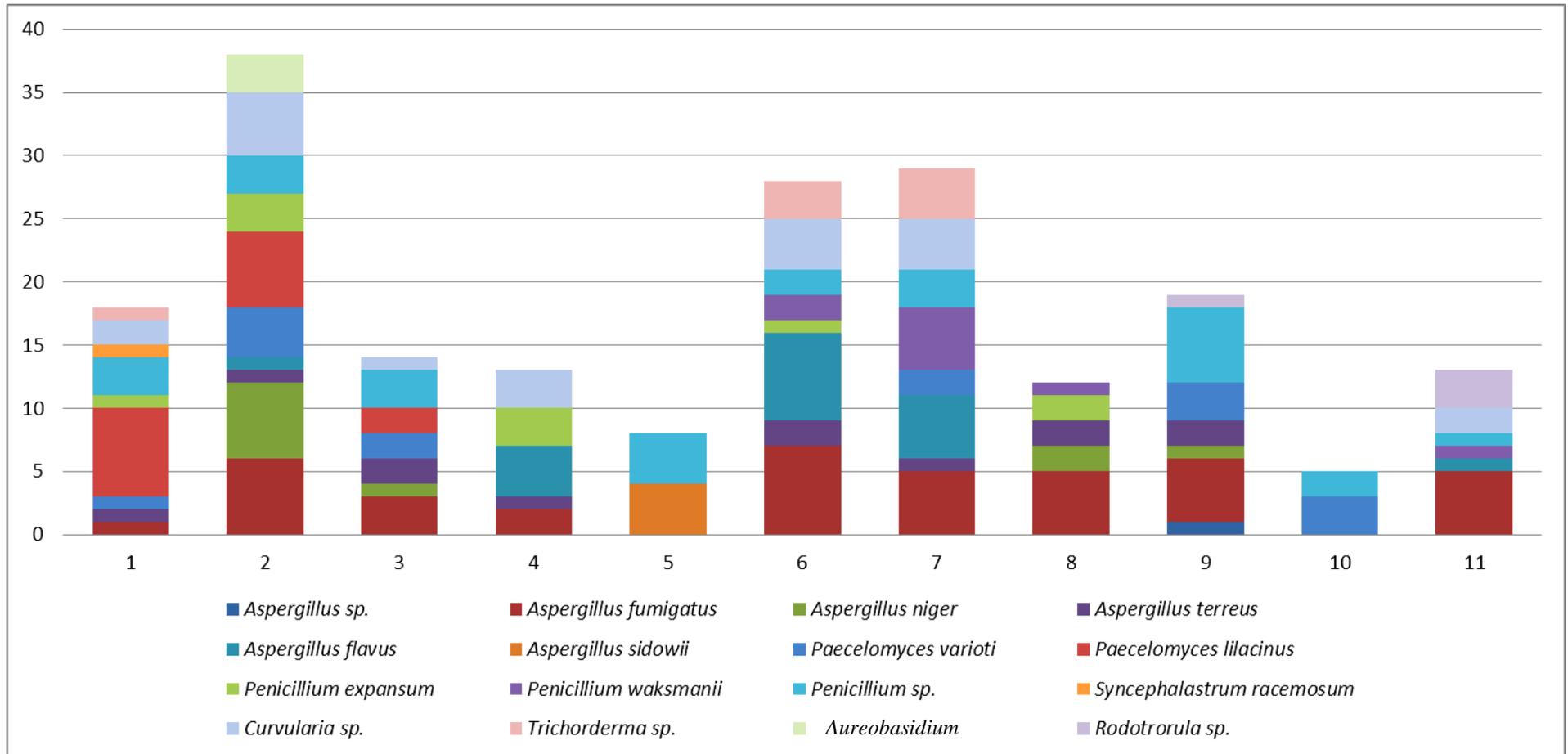
**Fonte:** autora, 2015.

Nas fachadas de azulejos da APL foram isolados 16 morfotipos de fungos, sendo 70% dos isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus*, com destaque as espécies *Aspergillus fumigatus* (39%) e *Aspergillus flavus* (18%), como mostra a figura 4, de acordo com a literatura há apenas um único relato de isolamento de *A. fumigatus* em azulejos portugueses do século XVIII, Cabo verde *et. al.*, 2015, mas existem relatos em monumentos de pedra Sharma, *et. al.*, 2010; De la Rosa-García, *et al.*, 2011. Outros dois morfotipos bastante frequentes foram os gêneros *Penicillium* sp. *Curvularia* sp., com 25% e 20% respectivamente. Os fungos melanizados, como o *Curvularia* sp., estão entre os fungos mais prejudiciais, atacando e penetrando nas superfícies dos monumentos de pedra, como visto por Cappitelli *et. al.*, 2007, que pesquisou fungos produtores de melanina que atacam polímeros sintéticos utilizados no patrimônio cultural, Coutinho *et. al.*, 2012 observou fungos dematiáceos envolvendo algas mortas em biofilme presentes em superfícies de azulejos vitrificados do Palácio Nacional da Pena em Sintra, Portugal. Assim como Sterflinger *et. al.*, 2010 e Simonovi cová *et. al.*, 2004, observaram a presença de fungos melanizados em monumentos culturais.

**Tabela 3.** Relação das bactérias identificadas por testes bioquímicos.

<b>Coloração</b>	<b>Forma</b>	<b>Coloração de Gram</b>	<b>Catalase</b>	<b>Oxidade</b>
Creme	Cocos	+	-	-
Creme	Cocobacilos	+	+	-
Creme	Estafilococos	+	+	-
Creme	Diplococos	+	+	-
Creme	Bastonetes	+	+	-
Creme	Bastonetes curtos	+	-	-
Creme	Bastonetes longos	+	+	-
Creme	Diplobastonetes	+	+	-
Creme	Estreptobacilos	+	+	-
Laranja	Cocos	+	+	-
Laranja	Diplococos	+	+	-
Laranja	Bastonetes	+	+	+
Laranja	Diplobastonetes	+	+	-
Mostarda	Cocos	+	+	-
Rosa	Cocos	+	+	-
Amarelos	Cocos	+	+	-
Amarelos	Cocobacilos	+	+	-
Amarelos	Bastonetes	+	+	-
Amarelos	Bastonetes curtos	+	+	-

**Figura4.** Identificação dos fungos isolados nos azulejos da Academia Pernambucana de Letras (APL).



Quanto aos gêneros *Penicillium* sp. como *Aspergillus* sp., são considerados uns dos fungos mais cosmopolitas, oportunistas e pulverulentos, seus esporos são resistentes e facilmente disseminados, já foram isolados até em vitrais por Carmona *et. al.*, 2006 e Rodrigues *et. al.*, 2014, a superfície de vidro assim como a superfície vitrificada do azulejos é um substrato extremamente limitado de nutrientes, porém esses organismos conseguem se desenvolver em tais superfícies, o que pode ser explicado pela sua natureza osmofílica e xerofílica que alguns fungos apresentam.

Ainda de acordo com Isola, *et. al.*, 2016, os fungos que reside em monumentos deve enfrentar a exposição ao sol, períodos prolongados de secura e deficiência de nutrientes, bem como o estresse adicional da poluição, já que os monumentos geralmente estão localizados em ambientes urbanos. São na maioria espécies de fungos do estado assexuado, que ocorrem em desertos quentes e frios e em outros ecossistemas temperados do planeta (Ruibal, *et. al.*, 2009).

Os fungos conseguem obter nutrientes necessários a sua sobrevivência, em superfícies inóspitas como, azulejos, vidros e pedras, através da produção de compostos como ácido carbônico, nítrico, ácido sulfúrico, e outros ácidos orgânicos, tais como o oxálico, glucônico, glucurônico, láctico, fumárico. Além disso, eles podem formar complexos de quelação com cátions metálicos, especialmente com minerais de silicatos, ferro e minerais de rolamento de magnésio, biotite, olivina e fosfatos diferentes (Williams *et. al.*, 1974). Alguns gêneros, tais como *Aspergillus* e *Penicillium* aqui encontrados em azulejos, produzem ácidos cítrico e oxálico. O ácido oxálico leva à decomposição de minerais de argila e os óxidos de ferro ferruginoso (Caneva *et. al.*, 1991).

A liberação de ácido por fungos pode visar à solubilização de nutrientes encontrados nas fachadas de azulejos (Videla *et. al.*, 2003), sendo o fator mais efetivo de impacto fúngico nas superfícies de pedra, e a atividade acidificante dos fungos é muitas vezes considerada como uma reação adaptativa às mudanças ambientais (Sazanova *et al.*, 2014). Além disso, a produção de ácidos orgânicos sugere uma vantagem competitiva para fungos filamentosos em relação a outros micro-organismos, diminuindo o pH ambiental (Liaud *et al.*, 2014). No presente trabalho estão sendo feitos testes de produção de ácidos e enzimas com os fungos até então isolados da APL, estas análises irão certamente colaborar para entender os mecanismos utilizados pelos fungos para realizar a biodeterioração.

Em relação à espécie *Syncephalastrum racemosu*, pertencente ao antigo filo Zigomycota (Hibbett *et. al.* 2007) apareceu apenas no ponto 1 e até o momento é o primeiro relato desse gênero em azulejos vitrificados, mas os zigomycotas já foram citados em outros trabalhos de biodeteioração de monumentos históricos a base de barro (tijolos e pau-a-pique) como os de Rhodes *et. al.*, 2015 ; Fazio *et. al.*, 2015 respectivamente. A frequência de isolamento dos zigomycotas foi inferior aos demais gêneros, nesta pesquisa, podem estar relacionado com a composição do substrato ou com as influencias da competição microbiana pelo substrato. As únicas leveduras encontrada foram *Aerobasidium* sp. e *Rodotrorula* sp.

A identificação de micro-organismos envolvidos na biodeterioração é uma das etapas mais importantes no processo de preservação e conservação de materiais de construção e deve ser feita antes de qualquer intervenção. Essa identificação facilita a compreensão do papel desempenhado pelos micro-organismos no processo de biodeterioração, correlacionando a interação entre a atividade do organismo e o material. Além disso, tratamentos mais eficientes para mitigação só podem ser alcançados com o conhecimento da comunidade microbiana e seus efeitos (Coutinho *et. al.*, 2012).

No presente trabalho foi observada uma diversidade microbiana dos fungos e das bactérias, principalmente de fungos, corroborando com os estudos de Coutinho *et. al.*, 2015, que pesquisou a diversidade microbiana nos três tipos de cerâmicas; tijolos, telhas e azulejos vitrificados, e observou que a maior diversidade de fungos foi encontrada em azulejos vitrificados, mesmo estes apresentando uma superfície lisa e impermeável o que seria a principio um obstáculo de biorreceptividade. Contudo os acervos azulejares são obras de arte expostas ao ar livre, logo susceptíveis aos intemperismos físicos e químicos, que podem ocasionar o desprendimento do rejunte e formação de fissuras no vitrificado, a perda da integridade da obra é um dos prováveis caminhos de acesso dos micro-organismos aos azulejos (Sanjad *et. al.*,2002; Silva *et. al.*,2013).

### **3.3. ANÁLISES DAS ESTRUTURAS ADERIDAS AO VITRIFICADO**

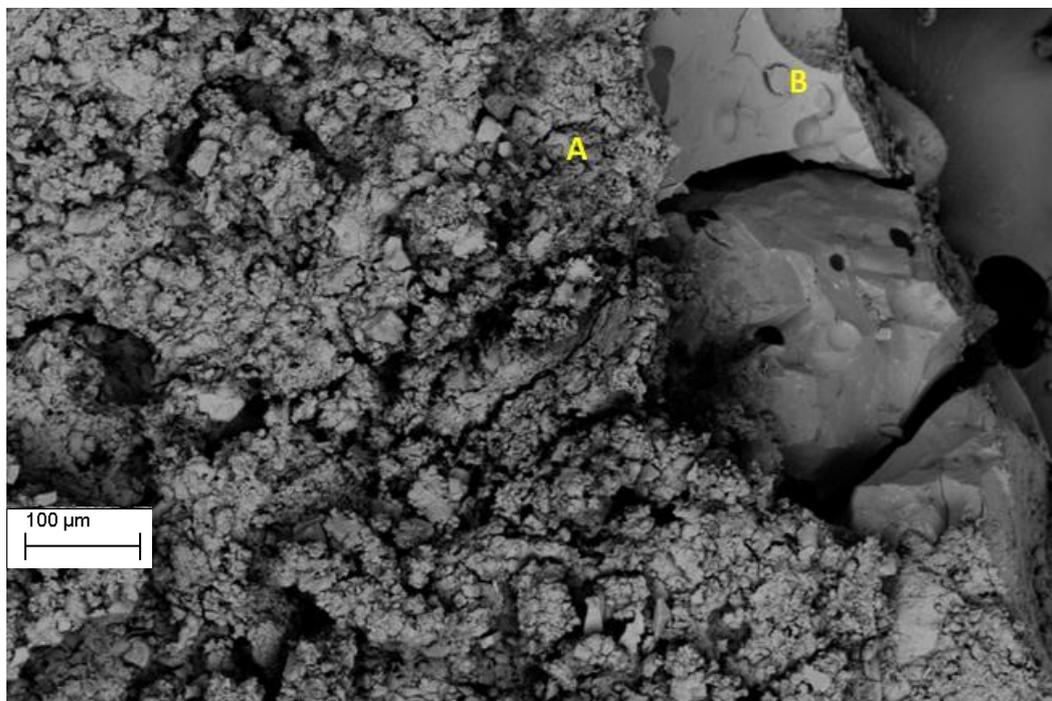
As imagens de MEV da região interna do vidro permitiram observar a interação dos micro-organismos com a zona de interface entre a camada vitrificada e o corpo cerâmico. A figura 5 é possível visualizar a diferença da região do vitrificado livre de contaminação e com uma densa camada microbiana, o que sugere que elas são a causa do desprendimento do vitrificado, provavelmente como resultado de mudanças de volume, penetração na matriz

cerâmica e liberação de substâncias metabólicas, como ácidos orgânicos e inorgânicos, como ocorre em materiais de pedra (Gorbushina, 2007).

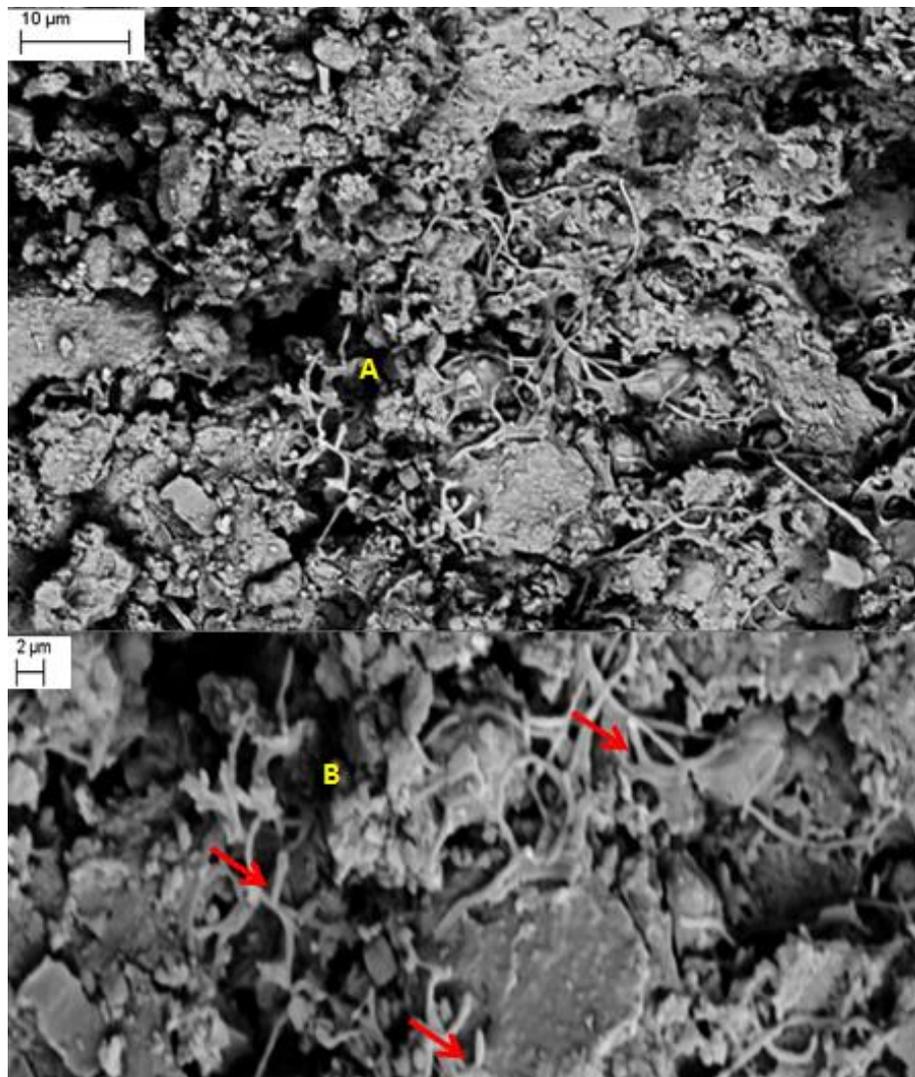
A imagem 6 mostrar vários filamentos dispersos, perpendicular a estes filamentos observam-se possíveis conidióforos, que são estruturas reprodutivas fúngicas. Porém, não foram visualizados conídios aderidos ao conidióforo, pode ser porque esteja em desenvolvimento ou houve a remoção durante a preparação da amostra para análise no MEV, uma vez que os esporos são facilmente dispersados. Sanjad *et. al.*, 2014 e Gaylarde *et. al.*, 2016 também detectaram estruturas filamentosas que concluíram serem fúngicas.

Na figura 7, que corresponde ao ponto 4, outras morfologias unicelulares são observadas; cocos e bastonetes de bactérias, colaborando com os resultados obtidos, em que o número de UFC bacterianos foi maior do que dos fungos. Assim como as imagens obtidas a partir da coloração por calcofluor evidenciaram a presença de estruturas fúngicas do ponto 2, no qual foi o ponto que apresentou a maior diversidade de fungos. Silva *et.al.*,2014 também observou estruturas microbianas e alterações químicas provocadas pela colonização, através da microscopia eletrônica de varredura, assim como Coutinho *et. al.*, 2012.

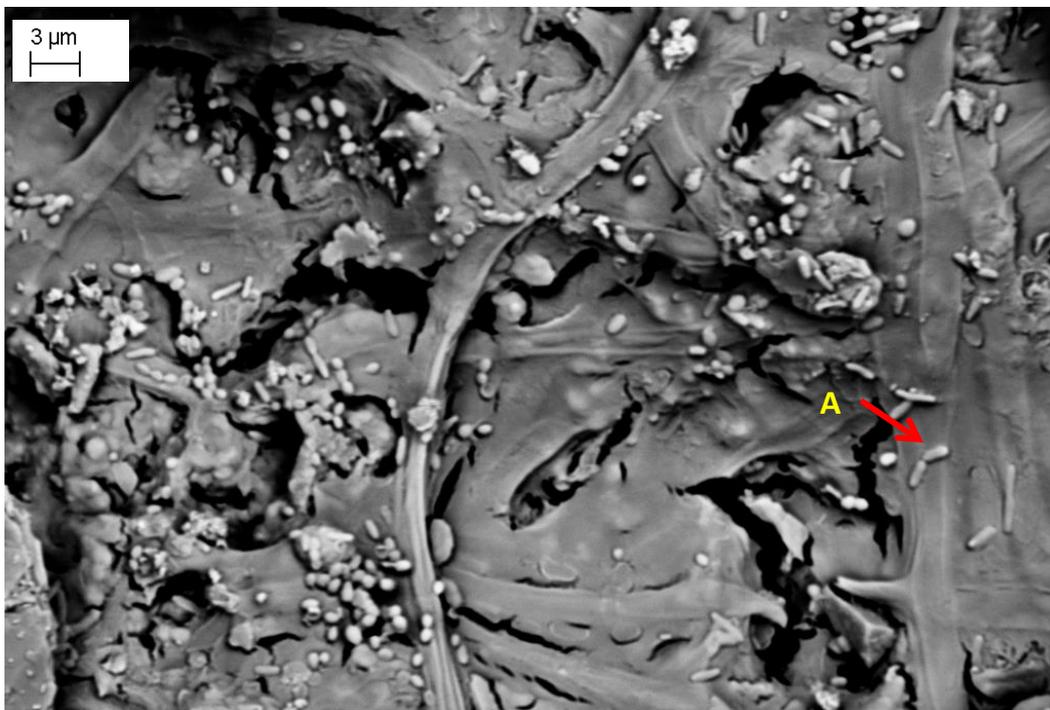
**Figura 5.** Detalhe da mancha verde entre o vitrificado e o corpo cerâmico do ponto 3: A- densa massa microbiana e B- superfície livre de contaminação, observa-se os vacúolos formados durante o cozimento da cerâmica.



**Figura 6.** Imagem obtida da amostra do ponto 1: A-Emaranhado de filamentos e B- imagem ampliada dos filamentos, a seta indica possíveis conidióforos sem esporos.



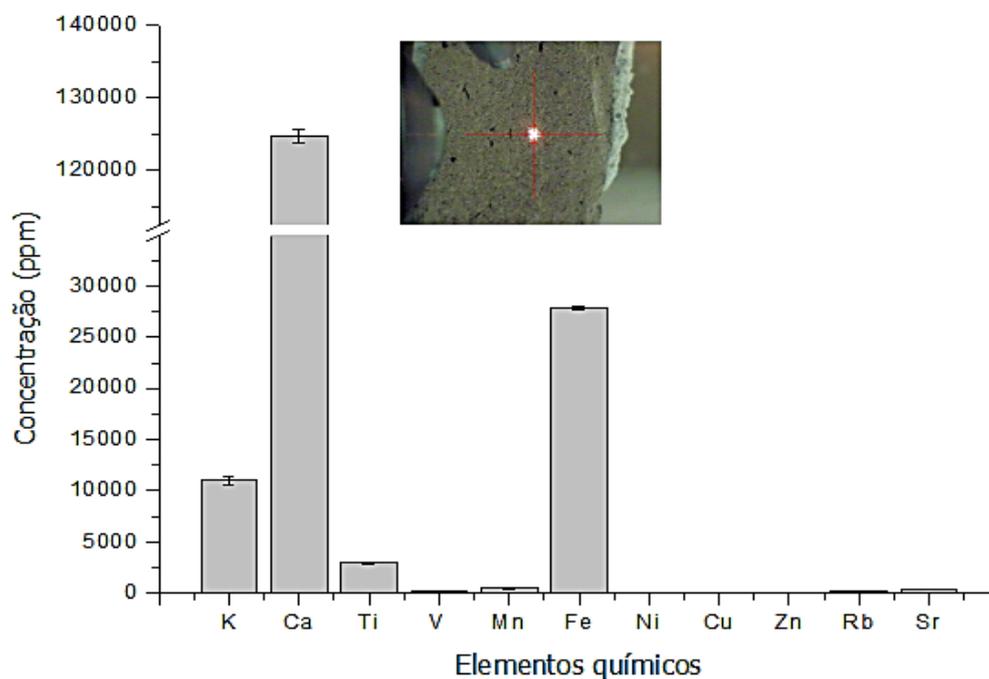
**Figura 7.** Observam-se as estruturas bacterianas. Em (A) seta indica os arranjos na forma de bastonetes e seta (B) na forma de cocos.



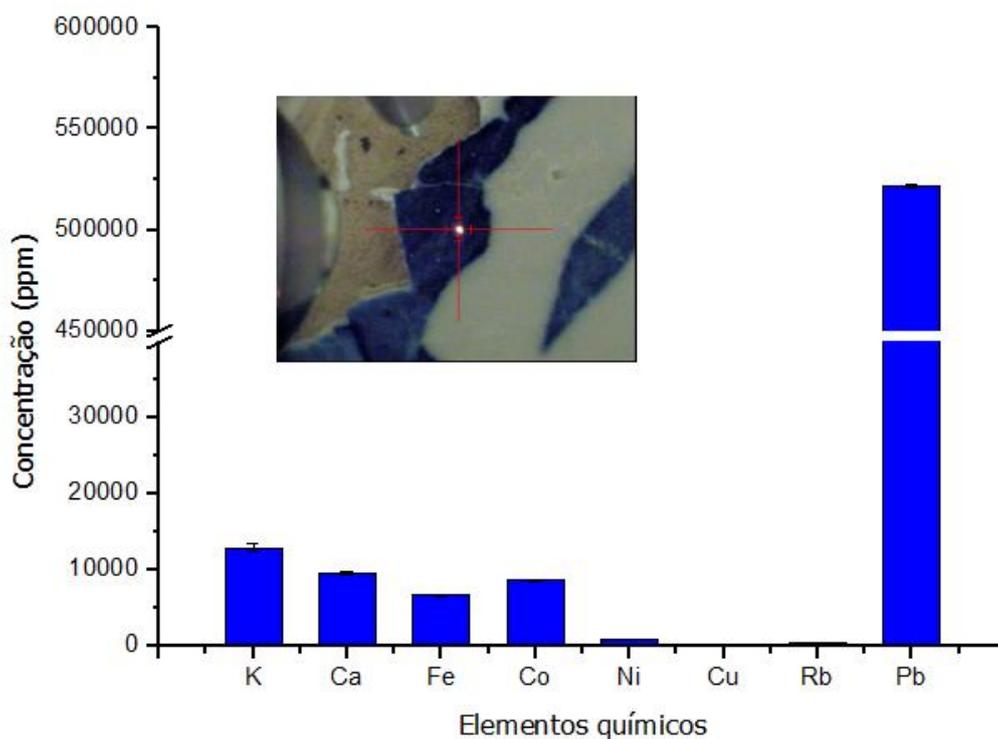
### 3.4 COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS

Na análise por FRX do biscoito (chacota) do azulejo do século XIX (figura 8), identificam-se principalmente três minerais formados; cálcio (Ca), ferro (Fe) e potássio (K). Um dos marcadores que indica uma diferença cronológica é quantidade de cálcio. Isso porque quanto maior o tempo, mais cal decorrente das argamassas empregadas como massa de assentamento é absorvido pela chacota (Muniz et al., 2017). Em relação aos pigmentos azul e branco, na imagem 9, observa-se os picos para os elementos: potássio, cálcio, chumbo (Pb) e cobalto (Co). O dióxido de cobalto é amplamente utilizado nos azulejos português, enquanto a presença de chumbo nesse ponto provavelmente é referente ao branco. Na produção do pigmento branco era adicionado chumbo, como mostra o gráfico da composição do pigmento branco (imagem 10).

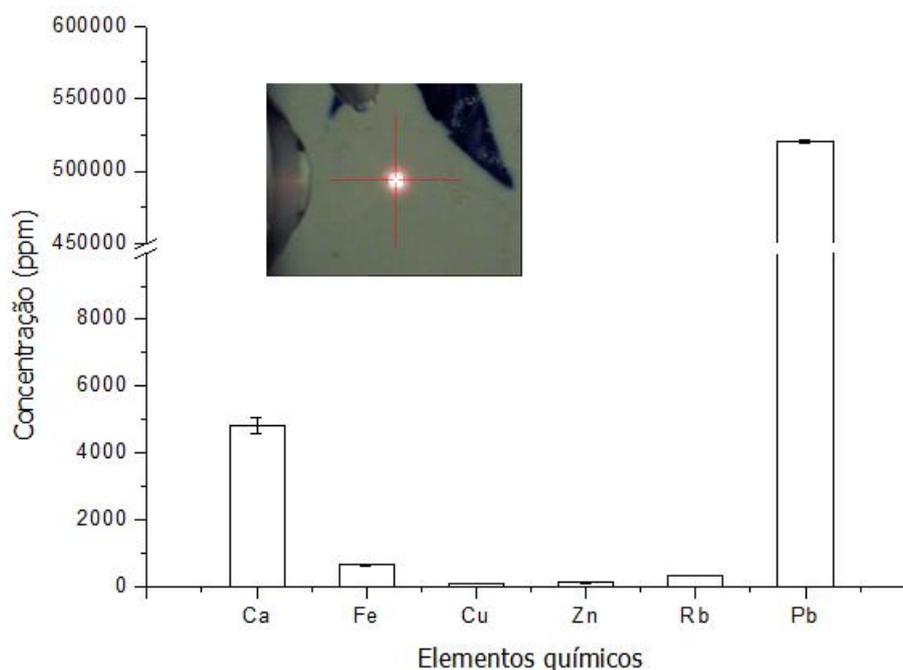
**Figura 8.** Composição mineralógica dos azulejos do século XIX da Academia Pernambucana de Letras. Distribuição dos elementos químicos encontrados no biscoito.



**Figura 9.** Composição mineralógica dos azulejos do século XIX da Academia Pernambucana de Letras. Distribuição dos elementos químicos encontrados no vitrificado detalhe para o pigmento azul.



**Figura 10.** Composição mineralógica dos azulejos do século XIX da Academia Pernambucana de Letras. Distribuição dos elementos químicos encontrados no vitrificado detalhe para coloração branca.



#### 4 CONCLUSÃO

Os micro-organismos isolados podem ser responsáveis pelo processo de deterioração das fachadas de azulejos da Academia Pernambucana de Letras, mesmo que não se tenha feito análises físico-químicas das peças para comprovar as alterações no suporte, as imagens de microscopia de eletrônica de varredura e calcofluor mostraram densas massas microbianas entre o vitrificado e biscoito, principalmente nos pontos com azulejos deteriorados foram os que mais apresentaram diversidade de micro-organismos. A utilização de diferentes meios de cultura contribui para obtenção de um maior número de isolados microbianos.

#### 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas de estudo e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pelo apoio financeiro.

## 6 REFERÊNCIAS

- Barnett, J.A. ; R.W. Payne, D. Yarrow (Eds.), *Yeasts: characterisation and identification*, Cambridge University Press, Cambridge (2000)
- Benny, G.L. 1982. Zygomycetes. Pp. 184-195. In: G.L. Benny (ed.). *Synopsis and Classification of Living Organisms*. New York, McGraw - Hill Book Co. Inc
- Bonieck, D.; I. de Castro Mendes, C.A.O. Paiva, U.G. de Paula Lana, A.F.B.; Santos.M.A. de Resende Stoianoff. Ecology and identification of environmental fungi and metabolic processes involved in the biodeterioration of Brazilian soapstone historical monuments. *Letters in Applied Microbiology* D. Rhodes, R. Hopper, Clay and Glazes for the Potter, Krause Publications, Lola, 2017.
- Bonieck, D.; Lorena Vívien Neves de Oliveira , Noelly de Queiroz Ribeiro, Christiane Abreu Oliveira Paiva , Ubiraci Gomes de Paula Lana , Antônio Fernando Batista dos Santos and Maria Aparecida de Resende Stoianoff. Effect of Environmental Factors on Rock-inhabiting Fungal Communities from Brazilian Soapstone Samples. *Journal of Environmental Science and Engineering B* 6 , 2017.
- Cabo Verde. S.; Silva. T.; Microbiological and compositional features of green stains in the glaze of the Portuguese “Great View of Lisbon” tile panel.
- Caldeira, A. T.; Rosado, T.; Silva, M.; Gonzalez, M.; Candeias, A. *Microrganismos e património - Novas abordagens*, Évora, v 4. p. 1-6, 2015.
- Caneva, G., M.P. Nugari, O. Salvadori, *Biology in the Conservation of Works of Art*, ICCROM, Roma, 1991.
- Cappitelli F, Principi P, Pedrazzani R, Toniolo L, Sorlini C (2007) Bacterial and fungal deterioration of the Milan Cathedral marble treated with protective synthetic resins. *Sci Total Environ* 385:172–181
- Carmona, N.; L. Laiz, J.M. Gonzalez, M. Garcia-Heras, M.A. Villegas, C. Saiz-Jimenez, Biodeterioration of historic stained glasses from the Cartuja de Miraflores (Spain), *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58 (2006)155–161.
- Cavalcante, S. T.; Cruz, A. M. *O azulejo na Arquitetura Civil de Pernambuco- Século XIX*. Metalivros, pag 10, 2002.
- Coutinho, M.L., Miller, A.Z., Gutierrez-Patricio, S., Hernandez-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. Biodegradation* 84, 322–332, 2012.
- Coutinho, M.L., Miller, A.Z., Macedo, M.F., Miller, A.Z., 2015. Biological colonization and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview. *J. Cult. Herit.* (In Press).
- Crespo, S. B. *Determinação da concentração mínima bactericidas em biofilmes do biocida cloreto de benzalcônio*. Dissertação pag- Lisboa, 2016.

De la Rosa-García, SC.; Ortega-Morales O, Gaylarde CC, Beltrán-García M, Quintana-Owen P, Reyes-Estebanez M (2011) Influence of fungi in the weathering of limestone of Mayan monuments. *Revista Mexicana de Micología* 33:43–51.

Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T.H. 1993. *Compendium of soil fungi*. v.I. San Francisco, Academic Press.

El nouhy, H.A. Assessment of some locally produced Egyptian ceramic wall tiles. *HBRC J.* v 9, p. 201–209, 2013.

Ettenauer., J. Sterflinger. Cultivation and molecular monitoring of halophilic microorganisms inhabiting an extreme environment present. *Astrobio.* 9,59-72.2010

Fazio, A. T.; Andrea Cavicchiolib,1, Daysi S.A. Pennab,2, Felipe S. Chambergob,2, Dalva L.A. de Fariaa, Towards a better comprehension of biodeterioration in earthen architecture: Study of fungi colonisation on historic wall surfaces in Brazil. *Journal of Cultural Heritage*

Gadd, G.M., 2007. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 111, 3e49.

Gaylarde, C.; Akiko Ogawa; Iwona Beech, Matthew Kowalski, Jose Antônio Baptista-Neto. Analysis of dark crusts on the church of Nossa Senhora do Carmo in Rio de Janeiro, Brazil, using chemical, microscope and metabarcoding microbial identification techniques. 2016

Giacomucci L, Bertoncetto R, Salvadori O, Martini I, Favaro M, Villa F, Sorlini C, Cappitelli F (2011) Microbial deterioration of artistic tiles from the facade of the Grande Albergo usonia & Hungaria (Venice, Italy). *Microb Ecol* 62:287–298.

Gorbushina, A.A., 2007. Life on the rocks. *Environmental Microbiology* 9,1613e1631.

Harrington, B.J.; Hegeage, G.J. Calcofluor White: a review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology. *Lab Med* 2003; 34:361-7.

Herrera, Liz Karen; Hector A. Videla. The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials *International Biodeterioration & Biodegradation* n° 54, 125 – 134, 2004

Hesseltine, C.W.; Fennel, D.I. (1995). The genus *Circinella*. *Mycologia*, 7, 193-211

Hibbett, DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, MozleyStandridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 3:509-547.

Hoog, J. de Guarro, J. Gené, M.J. Figueras (Eds.), Atlas of Clinical Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn and University Rovira i Virgili, Reus (2000)

Isola, D., Zucconi, L., Onofri, S., Caneva, G., De Hoog, G. S., and Selbmann, L. 2016. "Extremotolerant Rock Inhabiting Black Fungi from Italian Monumental Sites." *Fungal Diversity* 76 (1): 75-96.

Jacobs, K. and Botha, A. (2008). *Mucor renisporus* sp. nov., a new coprophilous species from Southern Africa. *Fungal Diversity* 29: 27-35.

Klich, M. A. Identification of Common *Aspergillus* species. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p

Kother, M. B. M.; Costa, A. S. M. R. ; Gutierrez, V. S. intervention and pathways: between the structure idea and the handling of memory in Europe. *Revista de Direito da Cidade* , v. 7, p. 722-759, 2015.

Laiz, L.; G. Pinar, W. Lubitz, C. Saiz-jimenez, Monitoring the colonization of monuments by bacteria: cultivation versus molecular methods, *Environ.Microbiol.* 5 (2003) 72–74.

Liaud, N., Giniés, C., Navarro, D., Fabre, N., Crapart, S. and Sigoillot, J.C. (2014) Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol Biotechnol* 1, 1–10.

Mateus, D. M. R.; Silva, R.B.; Costa, F. M. C.; Coroado, J. P. F. Diversidade microbiológica do edifício da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e avaliação do seu controle por biocidas. *Conservar Património, Tomar*, v. 17 p. 11- 20, 2013.

Milanesi, C., F. Baldi, S. Borin, R. Vignani, F. Ciampolini, C. Faleri, and M. Cresti. 2006. Biodeterioration of a fresco by biofilm forming bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57:168-173.

Neto, L. N. A.; Lima, M. C. A.; Oliveira, J. F.; Souza, E. R.; Buonafina, M. D. S.; Anjos, M. N. V.; F. A.; Braynerd, L. C. A.; Neves, R. P.; Mendonça-Junior, F. J. B. Synthesis, Cytotoxicity and Antifungal Activity of 5-Nitro-thiophene-thiosemicarbazones Derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, 2017.

Pepe, O.; L. Sannino, S. Palomba, M. Anastasio, G. Blaiotta, F. Villani, G. Moschetti, Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches, *Microbiol. Res.* 165 (2010)21–32.

Pérez-Rodríguez, J.L.; C. Maqueda, M.C. Jiménez de Haro, P. Rodríguez-Rubio, Effect of pollution on polychromed ceramic statues, *Atmos. Environ.* 32 (1998)993–998

Oliveira, J.C. Potencial biotecnológico de actinomicetos para produção de enzimas hidrolíticas e biocontrole in vitro de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha-branca do milho. Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciências Agrárias pela Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas - MG, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal

Pitt, J.I.A. 1988. A laboratory guide to commons *Penicillium* species. North Ryde, Commonwealth.

Raper, K.B.; Thom, C. 1994. A manual of Penicillia 1-878.

Rodrigues, A.; Gutierrez-Patricio S.; Miller, A.Z.; Saiz-Jimenez, C.; Wiley, R.; Nunes, D; Vilarigues, M.; Macedo, M.F. Fungal biodeterioration of stained-glass windows, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 90 2014 152–160.

Rosado, T., J. Mirão, A. Candeias, and A. T. Caldeira. 2014. Characterizing Microbial Diversity and Damage in Mural Paintings. *Microscopy and Microanalysis* doi:10.1017/S1431927614013439.

Ruibal, C., Gueidan, C., Seldmann, L., Gorbushina, A. A., Crous, P. W., Groenwald, J. Z., et al. 2009. “Phylogeny of Rock-inhabiting Fungi Related to Dothideomycetes.” *Studies in Mycology* 64: 123-33.

Sanjad, T. A. B. C. 2002. *Patologias e Conservação de azulejos: estudo tecnológico de conservação e restauração com azulejos dos séculos XVI, XVII e XIX pertencentes às cidades de Belém e Salvador.* 2002. 207 f. Dissertação (Mestrado em Arquitetura e Urbanismo) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Sanjad, T. A. B. C.; Costa, M. L.; Paiva, R. S.; Palácios, F. O. Ação microbiológica nos azulejos históricos das fachadas de Belém, região amazônica. *Pós: Belo Horizonte*, v. 4, n. 8, p. 124 - 133, 2014.

Sazanova, K.V., Shchiparev, S.M. and Vlasov, D.Yu. (2014) Formation of organic acids by fungi isolated from the surface of stone monuments. *Microbiology* 83, 516–522.

Sharma, K, Lanjewar S (2010) Biodeterioration of ancient monumento (Devarbija) of Chhattisgarh by fungi. *J Phytol* 2:47–49 32.

Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996. 16: 313-340

Sidrim, JJC, Rocha, MFG. *Micologia Médica ‘a luz de autores contemporâneos.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, p. 83-86

Silva, Amanda dos Santos Aliança; Arsênio Rodrigues Oliveira; Ana Paula Sampaio Feitosa; Karla Raíza Cardoso Ribeiro; Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro; Ana Cristina Lima Leite; Luiz Carlos Alves; Fábio André Braynera. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. 2014.

Silva, T.P., et al., *Ascertaining the degradation state of ceramic tiles: a preliminary non-destructive step in view of conservation treatments*, *Applied Clay Science* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2013.06.013>

Simonovi cová, A.; Gódyová, M.; Sevc, J. Airborne and soil microfungi as con-taminants of stone in a hypogean cemetery, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 2004, pág 7–11.

Sterflinger, K. Fungi: their role in deterioration of cultural heritage, *FungalBiol. Rev.* 24 (2010) 47–55.

Videla, H.A.; P.S. Guiamet, S.G. Gómez de Saravia, Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya, *Rev. Mus. La Plata* 44 (2003) 1–11.

Warscheid, T., and Braams, J. 2000. “Biodeterioration of Stone: A Review.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 46 (4): 343-68

Williams, M.E. E.D.; Rudolph, The role of lichens and associated fungi in chemical weathering of rock, *Mycologia* 66 (1974) 648–680

## ARTIGO 2

### Diversidade microbiana em painéis de azulejos dos séculos XVI no Convento São Francisco da cidade de Olinda

#### RESUMO

Micro-organismos podem colonizar qualquer ambiente conhecido e modificá-lo devido a sua extremamente ampla e versátil metabolismo. Do ponto de vista do micro-organismo, o patrimônio cultural representa uma série de habitats heterogêneas (cavernas, castelos, quadros, estátuas, azulejos e outros), onde eles podem crescer, bem como em habitats naturais. Modificações estéticas e/ou estruturais de materiais culturais devido ao crescimento e atividade microbiana são referidas como biodeterioração. Nesse sentido para investigar a presença da comunidade microbiana nas superfícies de azulejos históricos mais antigos encontrados em Pernambuco. O Convento de São Francisco em Olinda além de ser o convento mais antigo do Brasil, possuem um belíssimo acervo azulejar. Para tanto, foram realizadas coletas compostas em quatro ambientes do convento (Capela capitulo, Capela Santa Ana, corredor e escadaria) através de raspagens superficiais não invasivas nos painéis. Foi adotado o método cultura dependente para obtenção dos isolados das amostras, em que foi feita uma suspensão de 0,1g em 5mL de água destilada e em seguida 100 $\mu$  foram transferidos para meios de cultura (Ágar Triptona de Soja, R2, Extrato de Malte Ágar e Rosa de Bengala Peptona Glicose). A carga microbiana foi estimada por unidades formadoras de colônias por cm<sup>2</sup>. Fragmentos de azulejos foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calcofluor White e por Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (FRX). Os micro-organismos presentes nas amostras foram os fungos, as microalgas, as cianobactérias, as bactérias firmicutes e as actinobactérias. Os micro-organismos foram identificados por taxonomia clássica, provas bioquímicas, extração molecular e análise proteômica. A maior carga microbiana superficial foi de 356,9 UFC/cm<sup>2</sup> de células bacterianas. A Capela Santa foi o local que apresentou maior diversidade de microrganismos. Dentre os 7 gêneros isolados o *Aspergillus* foi o que exibiu a maior diversidade de espécies. Com destaque também para a cepa *Phenerochaete chrysosporium* como sendo até o momento a primeira ocorrência em azulejos históricos. Através das imagens do MEV e Calcofluor foi possível observar estruturas microbianas aderidas ao vitrificado. As análises de FRX confirmaram que os azulejos do Convento de São Francisco de Olinda são um dos mais antigos de Pernambuco.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil há diversos estudos na área de conservação e restauro investigando diversos tipos de patologias (alteração cromática, desagregação, eflorescência, esfoliação, perda de vidro, craquelê, manchas superficiais e dentre outras) que afetam os painéis de azulejos, encontrados nas áreas externas ou internas dos monumentos. Porém são pouquíssimos trabalhos no âmbito científico investigando as comunidades microbianas que colonizam os painéis podendo ocasionar danos irreversíveis a peça (Silva et al.,2013; Freitas, 2015). Estudos de biodeterioração microbiana em bens integrados são imprescindíveis, pois possibilitam conhecer a relação ecológica entre o material e os organismos colonizadores. Contribuindo para uma conservação mais eficiente.

O acervo azulejar de fachadas internas mesmo não estando expostos diretamente aos intemperismos ambientais (incidência raios solares, ventos, chuva, animais, plantas, aerossóis de combustíveis fosseis oriundos de veículos e dentre outros), estão passíveis também de sofrer as ações dos agentes químicos, físicos e biológicos.

Inicialmente os primeiros registros arquitetônicos de painéis de azulejos faziam parte exclusivamente de ambientes internos das igrejas e conventos trazidos pelos portugueses no período colonial, século VXII, principalmente nos estados da Pará, Maranhão, Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro. Segundo Sylvania 2006, a Bahia e Pernambuco detêm o maior, e mais belo, acervo de azulejos religiosos do Brasil. A azulejaria que é destaque quando o assunto é a arquitetura religiosa de Pernambuco é alvo da presente pesquisa. As cidades de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes são os locais com maior quantidade de edificações com painéis de azulejos no Estado.

Dentre os exemplares de monumentos encontrados nas cidades citadas escolheu como objeto de estudo o Convento São Francisco, em Olinda. O Convento São Francisco é considerado como o convento franciscano mais antigo do país, construído em 1585.

O conjunto arquitetônico composto pela Igreja de Nossa Senhora das Neves, Convento de São Francisco e Ordem Terceira apresenta um dos maiores acervos em azulejaria portuguesa, dos séculos XVI e XVIII do Nordeste brasileiro. O acervo dos azulejos tem grande valor histórico e artístico por ser um dos maiores acervos do tipo no Brasil e, que conta através dos azulejos o período barroco (Martins e Cavalcanti, 2016).

Segundo Sanjard, 2004, os azulejos dos séculos XVI, XVII e XVIII são mais vulneráveis a biodeterioração microbiana em virtude da baixa qualidade de produção, enquanto as peças cerâmicas produzidas após a evolução tecnológica são mais resistentes a patologias. Nesse sentido este trabalho teve como objetivo investigar a presença de agentes microbianos que possam causar danos aos painéis de azulejos do Convento de São Francisco de Olinda.

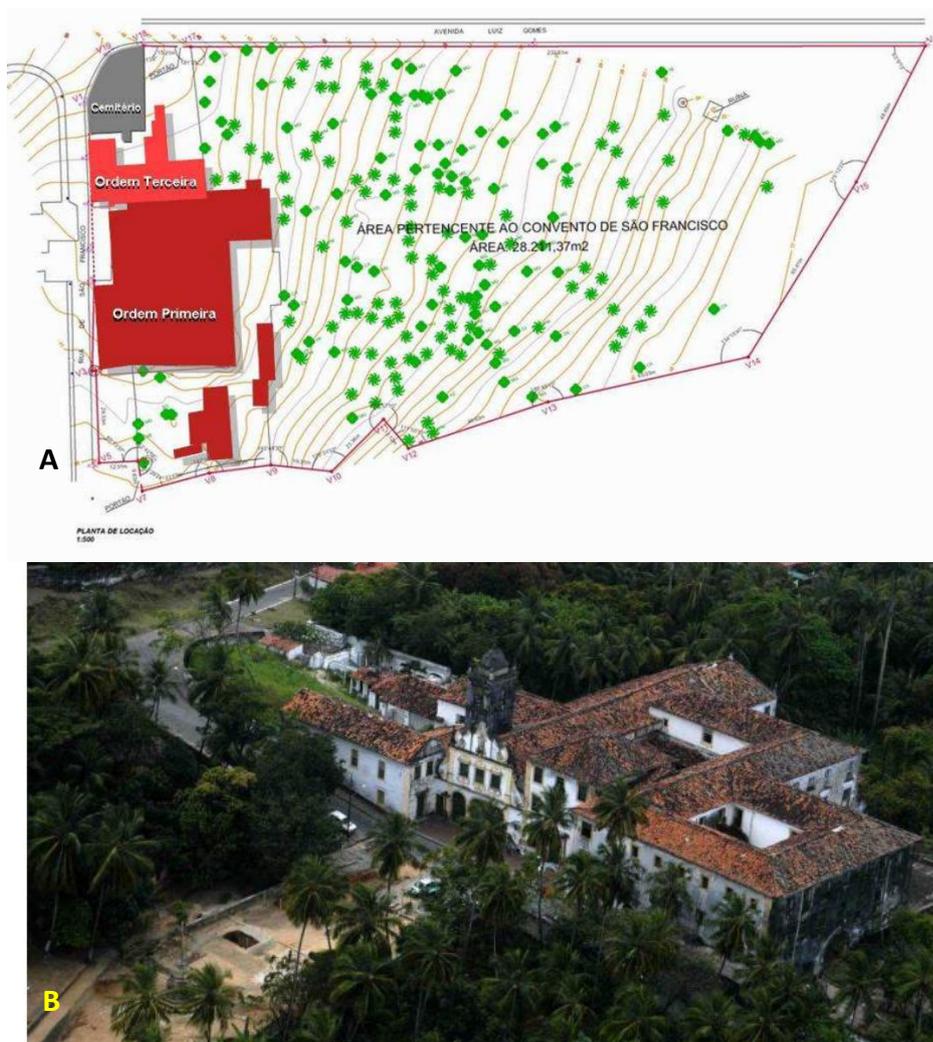
Diante do exposto é pertinente afirmar que o Convento de São Francisco constitui um conjunto artístico com características únicas seculares que deve ser preservado, espera-se que a presente pesquisa científica contribua para alternativas mais eficientes de salvaguarda desse patrimônio.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DE ESTUDO

O convento de São Francisco, localizado à Rua São Francisco, nº 280, na cidade de Olinda, em Pernambuco apresenta uma área total construída de 6.294 m<sup>2</sup>, fica aproximadamente 290 m de distância do mar (figura 1b). O Conjunto Franciscano de Olinda é uma edificação de três andares e que pode ser dividido em dois setores (Figura 1a). O primeiro setor corresponde ao Convento Franciscano e ocupa todos os andares. O outro setor corresponde a Ordem Terceira, ocupa apenas o pavimento térreo e primeiro andar (CECI, 2009).

**Figura 1.** Planta do térreo e localização das edificações (A) e vista panorâmica área do Conjunto Franciscano (B).

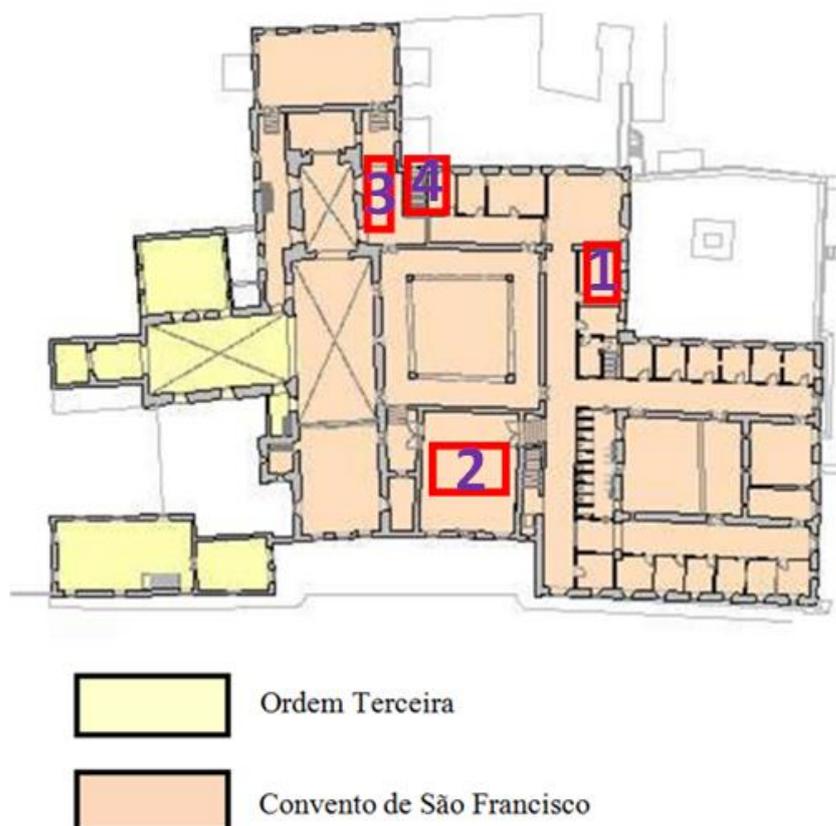


Fonte: CECI, 2009 ; SEPACCTUR/Olinda.

### 2.1.2. Coleta das amostras

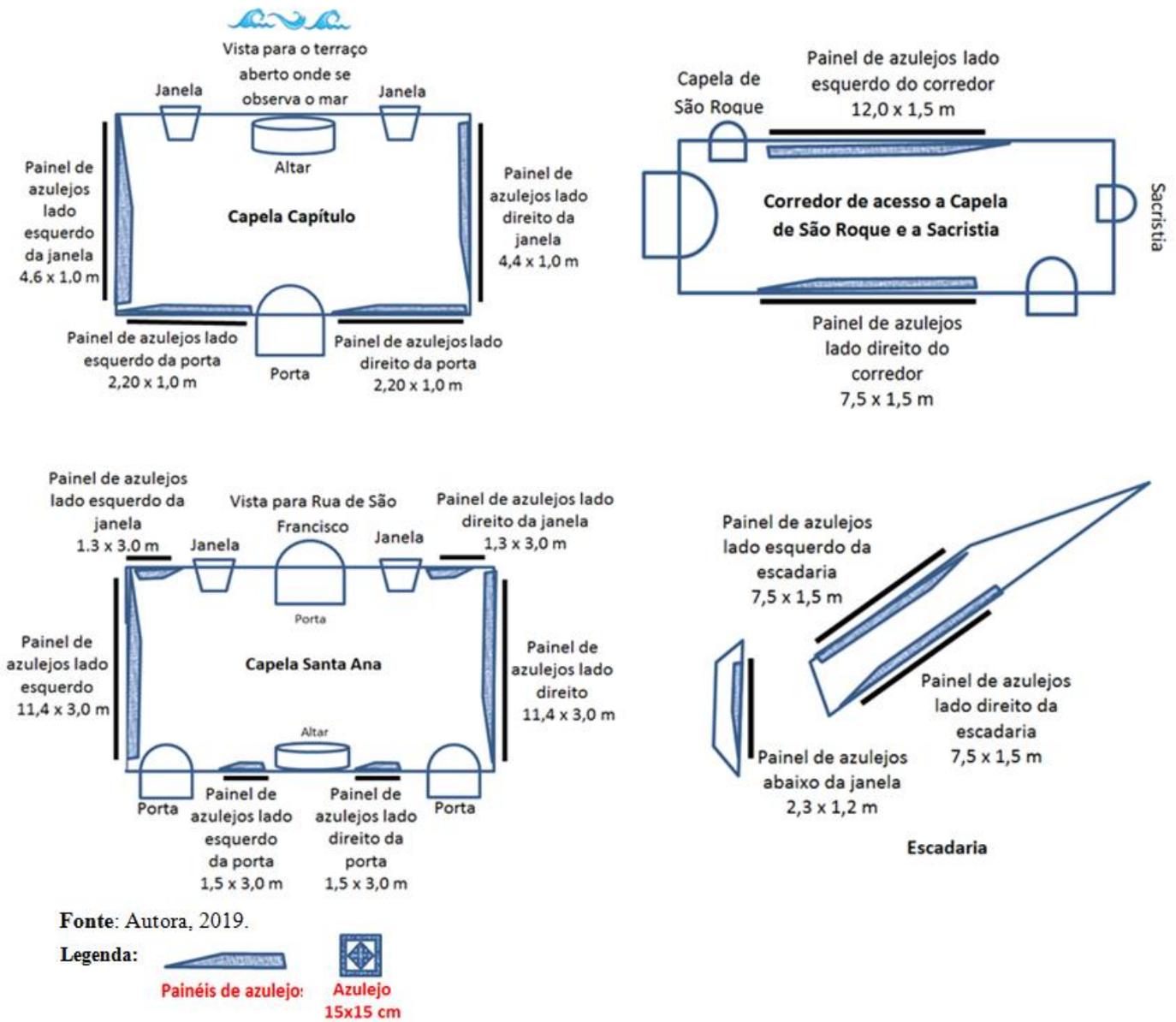
As coletas aconteceram durante o período da manhã e da tarde, no mês de Janeiro de 2019. Foram estabelecidos quatro campos de coletas do térreo da Ordem Primeira/Convento de São Francisco (figura 2), distribuídos da seguinte forma; Capela Capítulo (1), Capela Santa Ana, Corredor (3) e Escadaria (4), ver imagem 4. Parâmetros ambientais foram observados (temperatura, iluminação natural se os ambientes eram escuros ou claros e se as paredes apresentavam sinais de umidade e manchas), assim como foi analisado a presença de dados nos painéis de azulejos, questão imprescindível para determinação dos pontos de coleta e foi tirada a medida da área dos painéis (figura 3). O procedimento para obtenção das amostras foi o mesmo aplicado na Academia Pernambucana de Letras, ver imagem 4. Em seguida o material foi levado ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI), do Departamento de Antibióticos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (DANTI-CB/UFPE).

**Figura 2.** Planta do pavimento térreo vista da Ordem primeira/Convento de São Francisco e Ordem Terceira, com destaque em vermelho para os locais de coleta.



Fonte: CECI, 2009 ; SEPACCTUR/Olinda.

**Figura 3.** Dimensões dos painéis de azulejos do Convento São Francisco de Olinda.



**Figura 4.** Vista do painel direito da Capela Capítulo (A) e detalhe dos azulejos (B). Vista geral da Capela Santa Ana (C) e painel direito da porta (D). Painel do Corredor de acesso a Sacristia (E) e destaque para os azulejos deteriorados (F). Vista da Escadaria e painel (G) abaixo da janela (H). Trabalhos de coleta das amostras (I, J e L).





Fonte: Autora, 2019.

## 2.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS COLETADAS

### 2.2.1. Fungos e bactérias

Com os fragmentos dos azulejos e dos rejuntas foram preparadas suspensões, sendo pesado 0,1g e transferido para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada, após homogeneização, em agitador de tubos de ensaio, por um minuto para favorecer o desprendimento de estruturas microbianas da amostra. Adotou-se a técnica de “spread plate” onde, 100  $\mu$ L da suspensão foram transferidas para placas de Petri contendo meios de cultura, em triplicata: Rosa de Bengala Peptona Glicose (PGRBA) e Extrato de Malte Ágar (EMA) suplementados com cloranfenicol (50mg/L), para os fungos, Ágar Triptona de Soja (TSA) e R2 suplementados com 50mg/L de nistatina para culturas bacterianas. Depois as placas de Petri foram colocadas em estufa a 30°C por 48 h (os meios para bactérias) e por 168 h (os meios para fungos). Como foi observado na pesquisa anterior que a utilização dois meios de cultura (EMA e BDA) não apresentaram diferenças significativas da diversidade de fungos, assim como os outros meios (TSA e MH) também não expressaram diferenças. Nesse contexto foram escolhidos para este trabalho os meios, EMA e Rosa B. e TSA e R2. Para análise estatística foram utilizados os testes de correlação linear de Pearson e o teste t-student, realizada através do programa Statistica, versão 8.0, considerando um nível de significância de 5%.

### 2.2.2. Microalgas e cianobactérias

As amostras foram colocadas em cultivo em meio ASM-1 com pH inicialmente ajustado para 7,4 conforme descrito em Jacinavicius *et al.* (2013). As culturas foram mantidas nas seguintes condições: temperatura 23 $\pm$ 1 °C, irradiância 40-50  $\mu$ mol fótons m<sup>-2</sup>/s<sup>-1</sup> e fotoperíodo 14-10 h claro-escuro, sendo as cepas observadas após 30 dias de crescimento. Ressalta-se que todos os procedimentos de isolamento, de manipulação de meios e de materiais esterilizados foram realizados no interior de câmara de fluxo laminar previamente esterilizada por meio de luz UV durante 30 minutos. As receitas dos meios de culturas utilizados na pesquisa encontram-se em anexo. O estudo com as algas e cianobactérias foi realizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) no laboratório de Ficologia (LabFic).

## 2.3. CONTAGEM, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLOGICA DA COMUNIDADE MICROBIANA.

### 2.3.1. Fungos

#### 2.3.1.1. Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e isolamento

As placas com meio para crescimento de fungos foram incubadas durante 168 horas à temperatura de 30°C. A cada 24 horas, procedeu-se à contagem das colônias em cada placa, utilizando-se lupa binocular (3 a 30x). No sétimo dia ocorreu a purificação das colônias. Em cada placa, foram selecionadas colônias de fungos filamentosos com aparência macroscópica diferente para isolamento. Tais colônias foram repicadas para placas de Petri com o meio EMA. Após o crescimento da cultura (três a quatro dias) as colônias eram observadas para certificar se estavam puras. Em seguida as cepas puras eram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura (EMA) sólido inclinado para preservação do fungo. Os resultados das contagens, expressos em logaritmos de unidade formadora de colônia por cm<sup>2</sup> (log UFC/cm<sup>2</sup>).

#### 2.3.1.2. Identificação morfológica

Depois de isolados, os fungos filamentosos foram submetidos à técnica de cultura em lâmina de Sidrim *et. al.*, 2004, para permitir uma melhor observação de suas estruturas reprodutivas e, assim, poder identificá-las. Para a identificação através de taxonomia clássica de todas as amostras de fungos foram observadas características macroscópicas da colônia (coloração, textura, diâmetro, aspecto da parte superior e inferior da colônia em placa) e microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas). A identificação foi realizada através das seguintes literaturas específicas: Benny (1982), Domsch (1993), Hesseltine & Fennel (1995), Jacobs & Botha (2008), Pitt *et. al.* (1988); Klich (2002), Raper e Thom (1949). Complementando a identificação taxonômica clássica estão sendo realizados testes moleculares.

### 2.3.2. Bactérias

#### 2.3.2.1. Contagem das unidades formadores de colônias (UFC) e isolamento

As culturas de bactérias (em ágar TSA) foram incubadas durante 24 a 48 horas em estufa a 30° C, de acordo com a metodologia recomendada por Cebalhos, 2017. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das colônias, que foram expressas em unidades formadoras de colônias por metro quadrado (UFC/ cm<sup>2</sup>). Para tanto foi utilizado

um contador de colônias manual. As UFC maior que 350 foram consideradas incontáveis, nesse sentido foi estabelecido 350 como o nº máximo de UFC contados por placa. A seleção das colônias isoladas nas placas foi precedida por observações de algumas características morfológicas (coloração, forma, elevação, bordas, superfície, caracteres ópticos e pigmentação) das colônias isoladas na placa. Após essas observações as colônias foram semeadas em placas de Petri com meio (TSA) para garantir a cultura axênica. Em seguida as cepas puras foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura (TSA) sólido inclinado para manutenção e preservação das bactérias.

### 2.3.2.2. Identificação morfológica e proteômica

Para os isolados bacterianos, procedeu-se o método de caracterização das expressões fenotípicas (figura 6), tendo como base a literatura Holt et al, 1993; Barrow & Felthan, 1995; Song & Leff, 2005. Os resultados dos testes e das colorações foram utilizados para efetuar a identificação dos micro-organismos presentes nas amostras. Enquanto que, os isolados de actinobactérias realizou-se a observação da micromorfologia, cada linhagem foi cultivada pela técnica de microcultivo (figura 5), segundo a técnica de Shirling e Gottlieb (1966).

**Figura 5.** Fluxograma de identificação das actinobactérias.

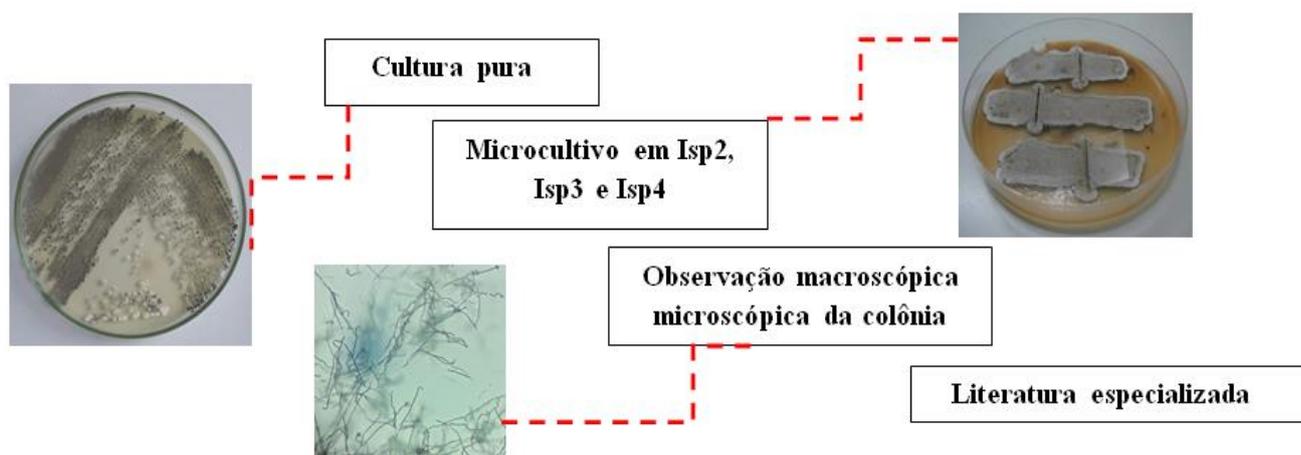
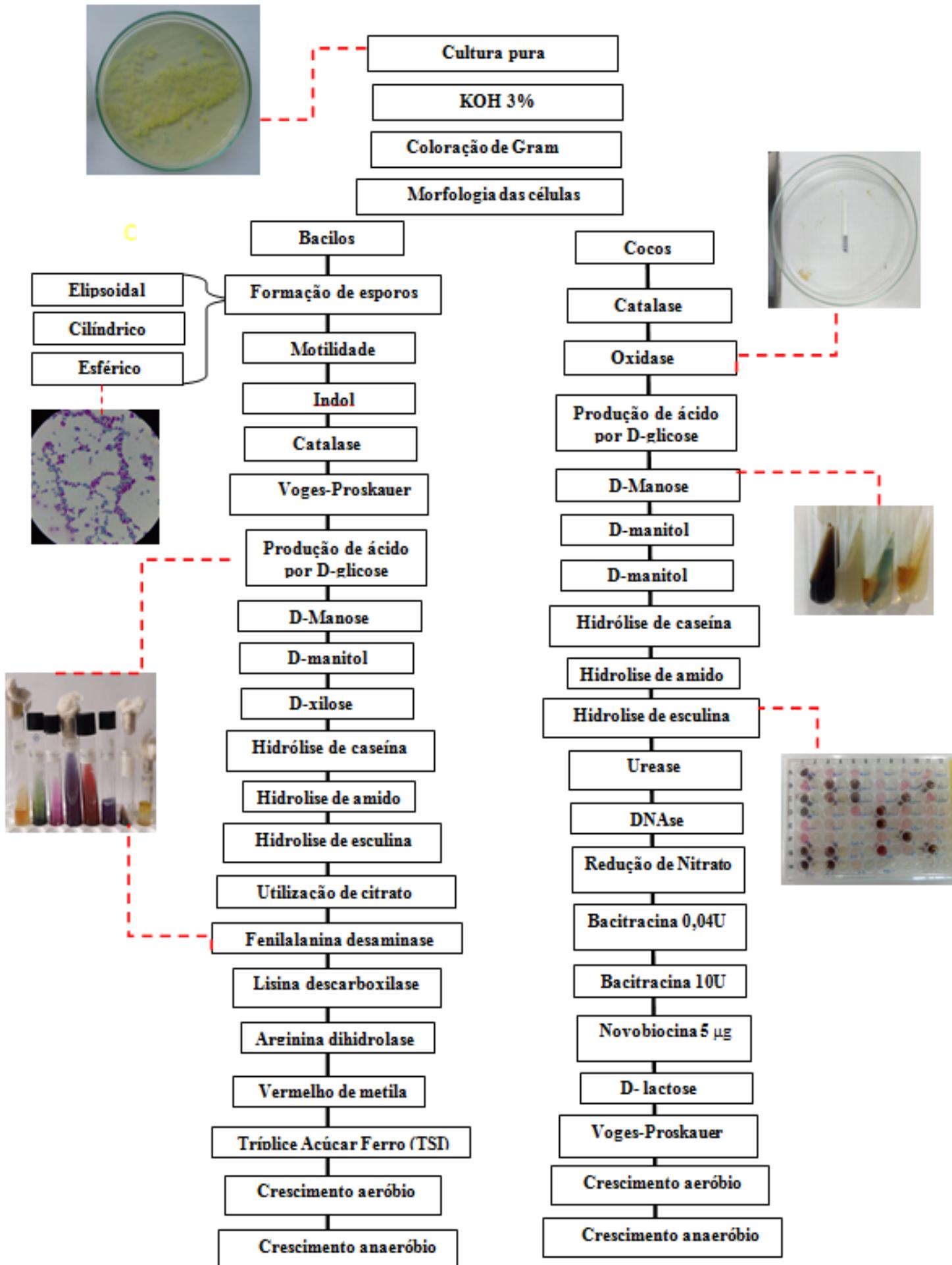


Figura 6. Fluxograma de identificação das provas bioquímicas.



### 2.3.2.3. Testes de identificação morfológica das bactérias

#### a) **Coloração de Gram** (Moyes; Reynolds; Breakwell, 2009)

A técnica de coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial, um método que reage de forma particular com base na estrutura da parede celular bacteriana. As bactérias com uma camada espessa de peptidoglicano prendem o complexo Cristal violeta-Iodo e coram-se em roxo e são designadas como Gram-positivas. As bactérias que possuem uma fina camada de peptidoglicano, além disso, uma segunda camada externa de membrana, não retém o complexo primário e descoram-se com álcool. E quando contra coradas com safranina ou fucsina ficam em tom rosa e são designadas como Gram-negativas. Os isolados foram semeados em Ágar Triptona de Soja (TSA), incubadas 24-48h a 30°C em estufa bacteriológica, para obtenção de colônias jovens. Essa técnica foi empregada para além de classificação das bactérias em Gram-positivas ou Gram-negativas, como também foi utilizada para análise da morfologia e arranjo das células.

#### b) **Solubilidade em KOH 3%** (Moyes; Reynolds; Breakwell, 2009)

Técnica utilizada para confirmação da coloração do Gram é um método rápido para diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sem uso de corantes. O teste é realizado em uma lâmina com a adição de uma gota de uma solução aquosa de KOH 3% (m/v) e, em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica, mistura-se um inóculo obtido a partir de colônias em TSA à solução para fazer uma suspensão. Neste teste as células Gram-negativas formam uma emulsão viscosa e elástica, enquanto as células Gram-positivas, não.

#### c) **Coloração de endosporos** (Reynolds; Moyes; Breakwell, 2009)

Diversas espécies de bactérias são capazes de formar esporos, sendo essa uma característica útil para sua identificação. Esta técnica foi utilizada para verificar a capacidade de formação de endósporos por bactérias. Os isolados identificados como bacilos Gram-positivos foram semeados em Ágar Nutriente (AN), um meio pobre, para promover a esporulação, incubadas 24-48h a 30°C em estufa bacteriológica. Também foi analisada a localização preponderante dos esporos dentro da célula vegetativa (central, paracentral e terminal).

**d) Motilidade, indol e produção de H<sub>2</sub>S** (Koneman et al., 2018)

O meio semissólido Ágar Sulfeto Intol Motilidade (SIM), preparados em camada em alta tubos de ensaio, foi utilizado para avaliar a capacidade de produção de H<sub>2</sub>S e indol pelas bactérias isoladas, a partir respectivamente, do tiosulfato de sódio e triptofano presente em sua constituição. As bactérias foram inoculadas com auxílio de uma alça bacteriológica em agulha e incubadas 24-48h a 30°C em estufa. A natureza semissólida permitiu a avaliação da motilidade destes isolados, observando crescimento difuso em relação ao ponto de inóculo. O sulfeto de hidrogênio foi detectado pela formação de um precipitado preto produzido pela reação desse gás com o sulfato ferroso presente no meio. A ausência de uma coloração negra indica resultado negativo. A detecção do indol produzido foi feita com a adição de reagente Kovac's (dimetilaminobenzaldeído), o qual produz uma camada vermelha na superfície do meio, a ausência desta coloração é considerada como negativo.

**e) Catalase** (Reiner, 2010)

A produção de catalase por micro-organismos é um mecanismo de defesa ao dano oxidativo, é avaliada através da neutralização do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A detecção dessa enzima é útil para identificação e diferenciação de gênero em algumas bactérias. O teste foi realizado em uma lâmina com a adição de uma gota de uma solução aquosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) e, em seguida, com o auxílio de uma alça bacteriológica, mistura-se um inóculo obtido a partir de colônias isoladas crescidas em TSA, a reação positiva foi constatada observando imediato borbulhamento, pela formação de oxigênio, e negativa na ausência da formação de bolhas.

**f) Oxidase** (Shields; Cathcart, 2010)

O teste de oxidase é uma reação utilizada para detecção da enzima citocromo oxidase. A produção dessa enzima foi avaliada utilizando fitas contendo papel de filtro impregnado com o reagente N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (NEWPROV, produtos para laboratório Ltda., Brasil). A enzima é capaz de reduzir esse reagente formando uma coloração roxa. O teste foi realizado com o auxílio de uma alça bacteriológica de plástico, sendo realizado um esfregaço na fita a partir de colônias crescidas em TSA por 24-48h a 30°C. Foi considerada uma reação positiva o aparecimento da coloração roxa entre 15-30 segundos, entre 30-60 segundo reação positiva lenta e ausência na mudança da coloração foram considerados negativos.

**g) Voges-Proskauer** (Mcdevitt, 2009; Rabinovitch; Oliveira, 2015)

O teste Voges-Proskauer é utilizado para pesquisa de acetoína (acetil-metil-carbinol) produzida através da fermentação de açúcares, sendo útil para caracterização de grupos de bactérias. Foi utilizado o meio caldo glicosado – VP e distribuídas alíquotas de 200 µL em placa de microtitulação de 96 poços, de fundo chato estéril (TPP, Switzerland). Os isolados foram testados em duplicata, utilizando inóculo de 10 µL de uma suspensão bacteriana padronizada 0,5 McFarland. A presença de acetoína foi avaliada após 48h de incubação a 30°C em estufa bacteriológica com a adição de 50 µL de uma solução alcoólica de  $\alpha$ -naftol 5% (m/v) seguido da adição de 50 µL de NaOH 1N (m/v) e homogeneização. O aparecimento de uma coloração vermelha em até 2h após adição dos reagentes foi considerado positivo e a ausência negativo.

**h) Produção de ácido por D-glicose, D-Manose, D-manitol e D-xilose** (Rabinovitch; Oliveira, 2015)

A assimilação de carboidratos tem importância diferencial em grupos bacterianos. A produção de ácidos a partir de D-glicose, D-manose, D-manitol e D-xilose foi avaliada utilizando o meio para carboidratos que possui como indicador púrpura de bromocresol. Foram distribuídas alíquotas de 200 µL em placa de microtitulação de 96 poços, de fundo chato estéril (TPP, Switzerland). Os isolados foram testados em duplicata, utilizando inóculo de 10 µL de uma suspensão bacteriana padronizada 0,5 McFarland. Após 48h de incubação a 30°C em estufa bacteriológica o metabolismo dos carboidratos produz ácidos e é observada pela mudança de cor do meio, de púrpura para o amarelo (reação positiva). Não alteração da cor foi considerado negativo. A produção de ácido a partir de D-glicose foi utilizado como positivo para crescimento aeróbio e, adicionalmente, em um dos poços para esse carboidrato foi acrescido uma camada de 100 µL de óleo mineral para avaliar o crescimento anaeróbio.

**i) Hidrólise de caseína e amido** (Rabinovitch; Oliveira, 2015)

A utilização de caseína e amido como fonte nutricional bacteriana foi avaliada pela prova simultânea amilólise e proteólise. Os isolados foram testados em duplicata, utilizando meio contendo ambos substratos em placa de Petri. O inóculo foi realizado de forma pontos equidistante a partir de culturas bacterianas mantidas em TSA, com auxílio de alça bacteriológica em agulha. Após incubação por 48h a 30°C e crescimento foi possível analisar a proteólise da caseína pela formação de halos transparentes ao redor das colônias e

a amilólise colocando a superfície do meio em contato com vapores de iodo ( $I_2$ ). A hidrólise do amido foi considerada positiva quando observada a ausência da formação de cor roxa ao redor das colônias, a cor roxa indica a presença de amido e é característica do complexo amido-iodo.

**j) Hidrólise de esculina** (Rabinovitch; Oliveira, 2015)

O teste avalia a capacidade de hidrolisar esculina em esculetina por bactérias, que é detectada pela reação deste produto com o citrato férrico presente no meio, é também utilizada como caractere diferencial taxonômico. Foram feitos semeios bacterianos em ágar esculina (Himedia, Mumbai, Índia) preparados em tubo inclinado e avaliados após incubação por 48h a 30°C em estufa bacteriológica. A reação positiva produz um precipitado negro e a negativa foi interpretada pela ausência da formação do precipitado.

**k) Utilização de citrato** (Koneman et al., 2018)

O teste avalia a capacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono para o desenvolvimento de bactérias. Foram feitos semeios bacterianos em ágar citrato de Simmons (Himedia, Mumbai, Índia) preparados em tubo inclinado e avaliados após incubação por 48h a 30°C em estufa bacteriológica. A formação de uma coloração azul com crescimento indica reação positiva e a manutenção da coloração verde indica ausência de crescimento e metabolismo do citrato.

**l) Produção de fenilalanina desaminase** (Rabinovitch; Oliveira, 2015)

Foi utilizado o meio ágar fenilalanina, preparados em tubos inclinados, para detecção da produção da enzima fenilalanina desaminase. O produto da reação é o ácido fenilpirúvico que foi constatado após 48h de incubação a 30°C do semeio bacteriano. Os tubos foram examinados adicionando uma solução aquosa de cloreto férrico a 10% (m/v) ( $FeCl_3$ ) e o desenvolvimento de uma coloração verde na superfície do meio foi interpretado como reação positiva e a não reação após adição do reagente indicou resultado negativo.

**m) Urease** (Brink, 2010)

A habilidade de utilizar a ureia como única fonte de nitrogênio foi avaliada utilizando o meio ágar ureia de Christensen. O meio utiliza o indicador vermelho de fenol e hidrólise da ureia produz metabólitos alcalinos, essa alcalinização é verificada pela mudança do meio para coloração rosa, reação positiva da urease. O consumo apenas de outras fontes

nutricionais do meio excetuando a ureia causa a mudança do meio para coloração amarela, reação negativa.

n) **DNase** (Koneman et al., 2018)

O teste DNase avalia a capacidade de bactérias degradarem ácido desoxirribonucleico através da produção da enzima desoxirribonuclease. Essa característica, além de conferir virulência, é utilizada na diferenciação de cocos Gram-positivos. Foi utilizado o meio ágar DNase (Himedia, Mumbai, Índia), preparado e distribuído em placa de Petri. O semeio é realizado através de inóculo denso circular e incubado por 48h a 30°C em estufa bacteriológica. Após crescimento foi utilizado uma solução aquosa de HCl 1N (v/v) como revelador, foi aliquoteado um volume suficiente para cobrir toda colônia. Observa-se o desenvolvimento de halos transparentes ao redor das colônias DNase positivas e a ausência de halo quando não há produção da enzima.

o) **Redução de Nitrato** (Rabinovitch; Oliveira, 2015)

O teste de redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), mediado pela enzima nitrato redutase, é um caractere diferencial utilizado na identificação dos membros bacterianos. Foi utilizado o meio caldo nitrato (Himedia, Mumbai, Índia) distribuído através de alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  em placa de microtitulação de 96 poços, de fundo chato estéril (TPP, Switzerland). Os isolados foram testados em duplicata, utilizando inóculo de 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão bacteriana padronizada 0,5 McFarland. A pesquisa de nitrito foi realizada após 48h de incubação a 30°C em estufa bacteriológica. Adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido sulfanílico 8 g/L dissolvido em ácido acético glacial 5 N (m/v) seguido da adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -naftilamina 5 g/L também dissolvida em ácido acético glacial 5 N (m/v). O aparecimento de uma coloração vermelha escura em poucos minutos indica presença de nitrito e resultado positivo. A não formação da cor vermelha indica ausência de nitrito, portanto resultado negativo.

p) **Susceptibilidade a bacitracina 0,04 U e novobiocina 5  $\mu\text{g}$**  (Koneman et al., 2018)

A susceptibilidade a bacitracina 0,04U e novobiocina 5  $\mu\text{g}$  são testes empregados na diferenciação taxonômica de cocos Gram-positivos. Os isolados foram testados em duplicata, utilizando o meio ágar Mueller-Hinton em placas de Petri. O semeio foi realizado com o auxílio de um Swab por toda superfície do meio a partir de suspensões bacterianas padronizadas a 0,5 na escala McFarland. Adicionado os discos as placas foram incubadas

em estufa bacteriológica por 24-48h a 30°C. A sensibilidade a bacitracina foi verificada através da formação de halo de inibição  $\geq 10$  mm ao redor do disco e a resistência quando  $\leq 9$  mm de diâmetro. E para novobiocina o isolado foi considerado sensível quando foram verificados halos  $> 16$  mm e resistentes se  $\leq 16$  mm de diâmetro.

#### **2.3.2.4. Identificação proteômica por MALD-TOF MS**

Para identificação foram utilizadas suspensões bacterianas cultivadas em NA (Caldo Nutritivo) à 30°C por 24 horas. Os isolados submetidos a análise através da extração proteica por espectrometria de massa (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd: yag smartbeam, Bruker Daltonick Inc., USA/Germany). Quarenta isolados bacterianos foram transferidos para tubos Eppendorf de 1,5 mL misturados completamente em 300  $\mu$ L de água destilada e esterilizada e agitadas ao vortéx. Em seguida adicionado 900  $\mu$ L etanol absoluto, o conteúdo cuidadosamente homogeneizado e então centrifugado a 12.000 g durante 2 min: o sobrenadante foi descartado e o sedimento seco a temperatura ambiente. O pellet foi misturado com 50  $\mu$ L de ácido fórmico (70%), levado ao vortéx, em seguida adicionado 50  $\mu$ L de acetonitrila e homogeneizado sobre o vortéx. A solução foi então centrifugada a 12.000 g durante 2 min, e 1  $\mu$ L do sobrenadante foi colocado em duplicata sobre a placa de aço, seco e temperatura ambiente a 25°C. Posteriormente, cada amostra foi revestida com 1  $\mu$ L de solução de matriz, o qual consiste de uma solução de  $\alpha$ -ciano- Ácido 4 hidroxí-cinâmico (HCCA) em 50 % de acetonitrila e 2,5% ácido trifluoroacético (concentração final: 10mg HCCA/mL) e seca temperatura ambiente a 25°C. A placa alvo em aço polido de MALD\_TOF MS subsequentemente introduzida no espectrómetro de massa para obtenção dos espectros proteicos. A lista de picos obtidos foi exportada ao software Biotyper (Biotyper system, versão 3.0) onde as identificações finais foram determinadas Malakhova et al., 2014.

### **2.3.3. Microalgas e cianobactérias**

#### **2.3.3.1. Identificação morfológica**

A análise qualitativa das cepas foi realizada via microscópio óptico binocular Carl Zeiss, modelo Axioplan-2 com câmara clara e ocular de medição. Durante a análise qualitativa foram observadas as características morfológicas e métricas de no mínimo 50 indivíduos de cada cepa com objetivo de registrar a variabilidade morfométrica. O material foi fotografado por meio de câmera digital Canon SD890 IS adaptada à ocular micrometrada

do microscópio e os dados métricos foram obtidos analisando as fotografias por meio do programa Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.6.3.

A identificação taxonômica foi baseada em literatura especializada (Gardner 1927; Desikachary 1959; Komárek & Anagnostidis 1998, 2005; Komárek 2013; Komárek & Hauer 2014), além de artigos mais recentes e específicos para cada gênero. Sempre que possível, as descrições originais dos táxons também foram analisadas para que o conceito inicial fosse preservado e eventualmente comparado com demais estudos. O sistema de classificação adotado foi o de Komárek *et al.* (2014).

#### 2.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E LUPA BINOCULAR

Amostras da parte vitrificada e pedaços do biscoito dos azulejos foram lavados e fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído / 4% de formaldeído em um tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, a pH 7,2, posteriormente submetidos a ponto crítico usando CO<sub>2</sub> líquido e revestido com ouro coloidal e por último as amostras foram montados em suporte de alumínio, examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5600LV (Jeol, Tokyo, Japan), seguindo a técnica adaptada de Neto *et al.*, 2017. Os procedimentos de preparo e leitura das amostras foram realizados no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco.

#### 2.5. CORANTE FLUORESCENTE CALCOFLUR WHITE M2R.

A técnica de coloração da parede celular fungica foi utilizada para visualizar estruturas filamentosas no biofilme presente nos fragmentos de azulejos obtidos. Seguindo a técnica Harrington *et al.*, 2003, o preparo e leitura das amostras foram feitas no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco.

#### 2.6. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS

Com o objetivo de caracterizar a composição mineralógica dos azulejos do Convento de São Francisco, as peças foram analisadas por espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) no DEN-UFPE (Departamento de Energia Nuclear) na Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

### 3. RESULTADOS E DISCURSÃO

#### 3.1 AS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS E OS MEIOS E OS PONTOS DE COLETA

Assim como foi observado na pesquisa anterior (Diversidade microbiana nos painéis de azulejos da Academia Pernambucana de Letra-APL) a utilização dois meios de cultura (MEA e BDA) não apresentaram diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônia (UFC), os resultados quantitativos das unidades formadoras de colônias dos fungos do Convento mostraram também que não houve diferenças significativas entre os meios de cultura Extrato de Malte Ágar (EMA) e Rosa de Bengala Peptona Glicose (PGRBA). Assim como os meios (TSA e MH) que não expressaram diferenças significativas para os isolamentos das bactérias da APL, os resultados mostraram que o TSA comparado ao R2 não apresentou diferença significante.

Mesmo que não sida estatisticamente significante a diferença UFC entre os dois meios citados é importante utilizar no mínimo dois tipos meios de cultura com composições distintas. Recomenda-se utilizar um meio mais complexo (TSA e EMA) ricos em fonte de carbono e/ou nitrogênio. Estes são voltados para fungos e bactérias autotróficas (Tortora et al.2012). E um seletivo com mais componentes minerais (R2 e PGRBA). A utilização de meios com componentes minerais unifica o tempo de crescimento de colônias de crescimento mais lento ou rápido, visto que, os micro-organismos que são isolados em ambientes construídos são adaptados a condições inóspitas e uma vez em condições de crescimento em vitro com um meio de cultura rico em fontes orgânicas dificulte o desenvolvimento de colônias de crescimento lento ou fastidiosas (Mateus, 2013; Coutinho, 2015; Cabo Verde, 2015).

É imprescindível que as comunidades microbianas sejam investigadas através de métodos diferentes, podendo ser por método dependente de cultura (com base na cultura de microrganismos) ou por cultura independente (com base na análise de moléculas de diagnóstico, principalmente ácidos nucleicos). Mesmo que os métodos de cultura dependentes permitam estudar a fisiologia e o metabolismo dos microrganismos isolados (Qi-Wang et al. 2010; Otlewska et al.2014; Cebalhos,2017; Cavalieri, 2018).

Um total de 356,9 UFC/cm<sup>2</sup> de colônias bacterianas foram contabilizadas a partir dos dados obtidos dois meios dos meios TSA (208,5 UFC/cm<sup>2</sup>) e R2 (148,4 UFC/cm<sup>2</sup>), dessas

foi possível isolar 51 cepas. Em todos os quatro locais de coleta as unidades formadoras de colônias apareceram, com destaque para o ponto dois (Capela Santa Ana) e ponto quatro (Escadaria), 131,45 UFC/cm<sup>2</sup> e 108,29 UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Em contra partida os pontos um (Capela Capitulo) e três (Corredor) corresponderam às regiões com menores números de colônias bacterianas, ver tabela 1. Observou-se que a quantidade de bactérias isoladas apresentou uma uniformidade na distribuição entre os quatro pontos coletados, tabela 1. As cianobactérias e microalgas, de acordo com o método adotado, não foram possíveis contabilizar as unidades formadoras de colônias e conseqüentemente o isolamento. A partir da análise de presença ou ausência dos organismos autotróficos nas amostras, foi possível identificar a presença de 4 gêneros e 2 espécie de cianobactérias e 3 gêneros de microalgas com apenas 1 espécie identificada. Dos três pontos, a Capela Santa Ana foi o local de coleta que apresentou o maior número de indivíduos presentes na amostra.

Em relação às unidades formadoras de colônias dos fungos foram observados um total de 1,77 UFC/cm<sup>2</sup>, destes sendo EMA (0,94 UFC/cm<sup>2</sup>) e RGRBA (0,83 UFC/cm<sup>2</sup>), foi visto que os maiores dados de UFC e de isolados fúngicos foram observados no ponto 3 (Corredor) e ao ponto 4 (Escadaria), ver tabela 3. Caracterizando um padrão de distribuição das cepas um pouco diferente dos demais grupos citados, principalmente em relação ao ponto 3 (Corredor), em que não houve crescimento de organismos autotróficos e os dados de UFC bacteriano foi o menor. Do total de unidades formadoras de colônias foi possível isolar 49 cepas. Dessas cepas o maior número de isolados foi observado na Capela Santa Ana (tabela 2)

**Tabela 2.** Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e de isolados bacterianos relacionados ao ponto de coleta e meio de cultivo.

Ponto	UFC/cm <sup>2</sup>			Nº de isolados (unidades)		
	Meios de cultura					
	TSA	R2	Total	TSA	R2	Total
1	57,26	21,59	78,85	7	3	10
2	69,15	62,3	<b>131,45</b>	7	6	13
3	26,5	11,81	38,31	7	7	14
4	55,57	52,72	<b>108,29</b>	7	7	14

**Legenda:** MH= Mueller Hinton; TSA= Ágar triptona soja; R2= Meio para heterotróficas. 1(Capela capitulo); 2 (Capela Santa Ana); 3(Corredor) e 4(Escadaria).

**Tabela 2.** Distribuição dos organismos autotróficos aos locais de coleta.

	Pontos			
	1	2	3	4
Cianobactéria	1	1	0	1
Cianobactéria	0	1	0	0
Cianobactéria	0	1	0	1
Cianobactéria	1	1	0	1
Cianobactéria	1	0	0	0
Microalga	1	1	0	0
Microalga	0	1	0	0
Microalga	0	1	0	0
Microalga	1	1	0	1
<b>Total</b>	5	<b>8</b>	0	4

**Legenda:** Presença (1) e Ausência (0). 1(Capela capitulo); 2 (Capela Santa Ana); 3(Corredor) e 4(Escadaria).

**Tabela3.** Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e de isolados fúngicos relacionados ao ponto de coleta e meio de cultivo.

Ponto	UFC/cm <sup>2</sup>			Nº de isolados (unidades)		
	EMA	RGRBA	Total	EMA	RGRBA	Total
<b>1</b>	0,08	0,14	0,22	4	5	9
<b>2</b>	0,2	0,2	0,4	6	9	<b>15</b>
<b>3</b>	0,34	0,25	<b>0,59</b>	6	7	13
<b>4</b>	0,32	0,24	<b>0,56</b>	6	6	12

Legenda: BDA= Batata Dextrose Ágar; MEA= Ágar Extrato de Malte; PGRBA= Ágar Peptona Rosa de begala. 1(Capela capitulo); 2 (Capela Santa Ana); 3(Corredor) e 4(Escadaria).

Quando foram comparados os pontos não houve diferença significativa em relação às unidades formadoras de colônia e número de isolado, todavia, é interessante salientar que o corredor foi o ambiente com mais unidades formadoras de colônias fúngicas ( $0,59\text{UFC}/\text{cm}^2$ ), menos bactérias ( $38,31\text{ UFC}/\text{cm}^2$ ) e nas amostras desse ponto não houve desenvolvimento de organismos fotoautótrofos. A ausência do desenvolvimento de cianobactérias e microalgas podem estar relacionadas com a baixa incidência de luz desse ponto, porém não é possível afirmar porque esse parâmetro físico não pode ser avaliado através de equipamentos específicos. Foi observado que assim como na Academia Pernambucana de Letras, os painéis do Convento de São Francisco apresentavam vários pontos de deterioração, o que pode estar favorecendo a colonização microbiana, segundo Sanjad, 2009, as manifestações da ação microbiológica correm principalmente entre o vitrificado e a parte cerâmica (biscoito). O caminho de acesso dos micro-organismos a esta região de interface entre as duas camadas é o craquelê existente no vitrificado, que corta a seção transversal do mesmo. Estes, juntamente com as juntas de qualquer painel, representam pontos de entrada de contaminação sendo o início para a deterioração de cada azulejo a partir do esmalte para o corpo da cerâmica e até mesmo a argamassa (Coutinho, 2015).

## 3.2. DIVERSIDADE MICROBIANA NOS AZULEJOS DO CONVENTO DE SÃO FRANCISCO

### 3.2.1. Identificação dos fungos filamentosos

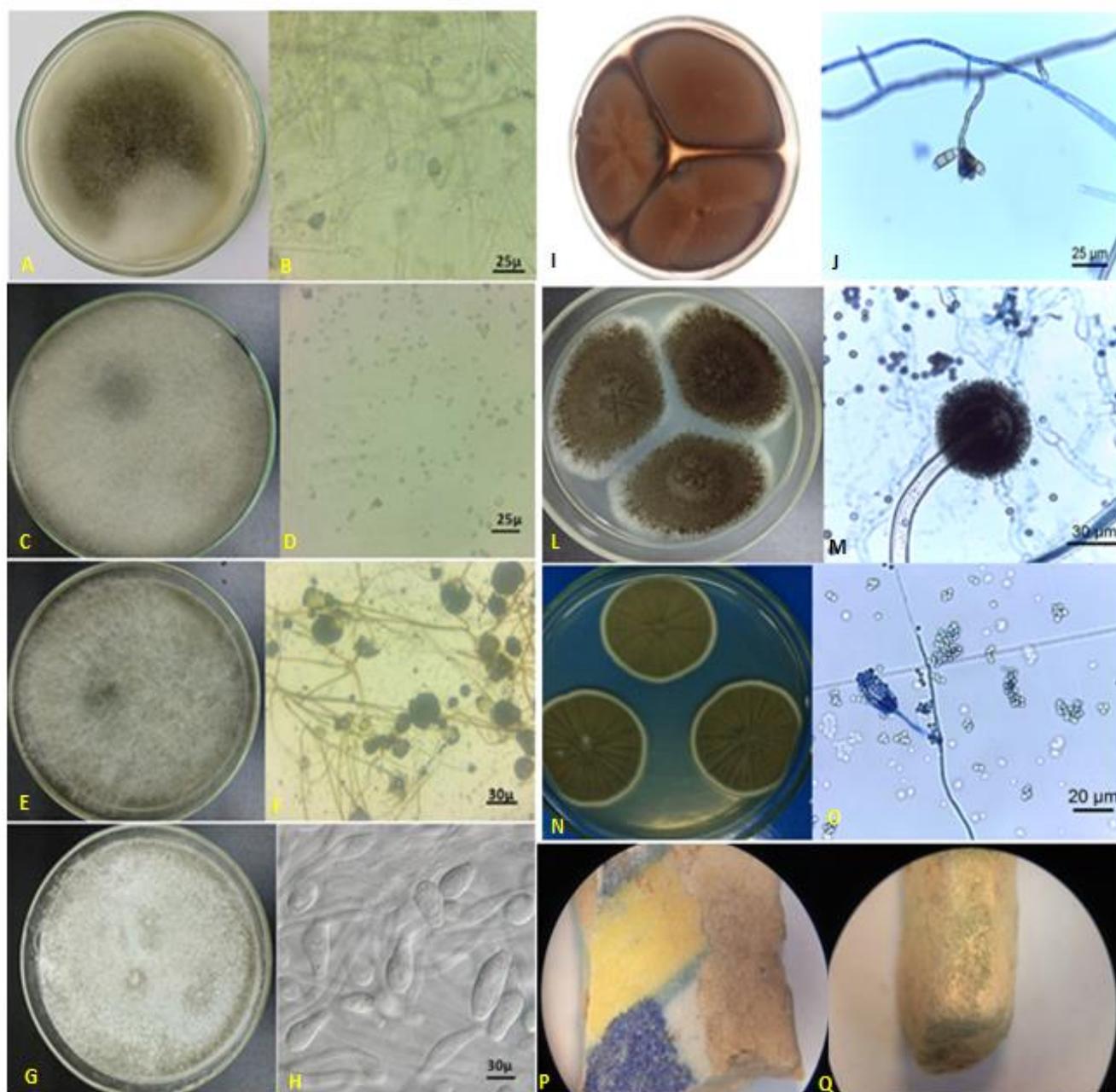
Foram isoladas 49 cepas fungícas, desse quantitativo foram identificados 7 gêneros de fungos (*Aspergillus*, *Curvularia*, *Lichtheimia*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Phenerochaete* e *Penicillium*) e 12 espécies (ver figura 7).

Do total de unidades formadoras de colônias 48,5 % foram de fungos pertencentes à ordem Mucorales; *Lichtheimia hyalospora* (Kerts. Hoffm, Walther & K. Voigt, 2009), *Rhizopus stolonife* (Vuill, 1902) e *Syncephalastrum sp.* Seguido do gênero *Aspergillus* com 26,5% do total de UFC.

O número maior de táxons (gênero e espécie) identificados pertence ao gênero *Aspergillus*, Destaque também para o gênero *Curvularia* sendo o segundo maior em número de táxons (figura 8).

O número elevado de UFC dos fungos Mucorales, principalmente de *Lichtheimia hyalospora*, *Rhizopus stolonife* e *Syncephalastrum sp*, encontrados no ponto 3(corredor) pode está sendo influenciada pelas relações estabelecidas entre outros micro-organismos. Sabe-se que no desenvolvimento de uma comunidade microbiana existem várias influencias entre elas a competição pelo substrato. Como o corredor foi o ponto de coleta que apresentou o menor número de UFC bacteriano e não houve crescimento de organismos fotoautróficos esse contexto pode ter favorecido as cepas em questão. Em vez que alguns dos fungos da ordem Mucolares; *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Lichtheimia*, *Mucor* e dentre outros, são considerados como, organismos altamente competitivos e se desenvolvem rapidamente nos substratos, devido ao seu alto poder enzimático (Lima, 2018).

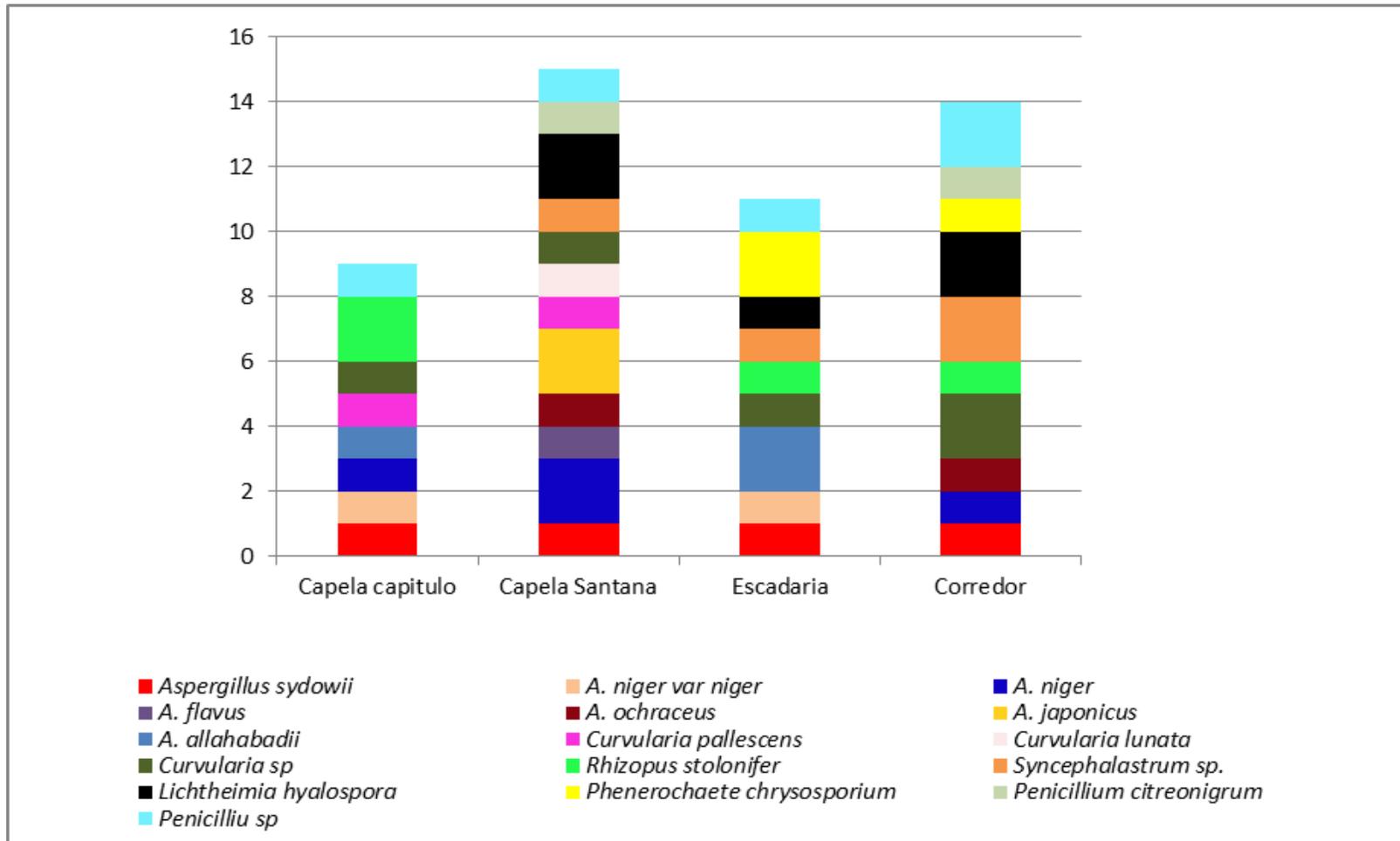
**Figura 7.** Macroscopia e microscopia das colônias dos fungos e fragmento do azulejo. *Lichtheimia hyalospora* (A e B); *Syncephalastrum* sp (C e D); *Rhizopus stolonife* (E e F); *Phanerochaete chrysosporium* (G e H); *Curvularia* sp (I e J); *Aspergillus niger* (L e M); *Pnicillium* sp. (N e O) e detalhe do azulejo com manchas na chacota (P e Q).



Fonte: Autora, 2019.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

**Figura 8.** Distribuição dos isolados fungicos nos locais de coleta.



Existem poucos relatos de Zigomicetes envolvidos na biodeterioração de ambientes construídos (Coutinho, 2015; Fazio, 2016) isolaram Mucorales em monumentos históricos, porém os autores citados afirmam que até o momento não se conhece quais seriam as ações e consequências realizadas pelos Zigomicetes na biodeteioração. O que caracteriza a necessidade da realização de futuros trabalhos.

É importante ressaltar que o gênero *Syncephalastrum sp.*, foi possível determinar sua espécie porque foi observado pela identificação por taxonômica clássica a presença de estruturas diferenciadas na conformação dos esporangiosporos o que pode ser uma espécie nova ou variação de espécie. Para atender ao questionamento a cepa encontra-se em processo de identificação molecular.

Em relação *Phanerochaete chrysosporium*, é um fungo popularmente conhecido por causar a podridão branca (Wang, 2018) há relatos da sua ação de biodeterioração principalmente em superfícies de madeira. Sendo até o momento a primeira ocorrência (de acordo com a busca realizada no *index fungorum*) dessa cepa fungícas em painéis de azulejos, seu isolamento pode está associado ao processo de fabricação dos azulejos mais antigos, como os do século XVI e VXII, uma vez que nesse período a fabricação das peças eram feitas artesanalmente sendo muito comum encontrar várias impurezas. Pretende-se realizar análises mais específicas nas peças de azulejos do século VXII para investigara a presença ou ausência de substancias que comprovem essa hipótese.

Quanto aos gêneros *Penicillium sp.* como *Aspergillus sp.*, são considerados uns dos fungos mais cosmopolitas, oportunistas e pulverulentos, seus esporos são resistentes e facilmente disseminados, já foram isolados até em vitrais por Carmona *et. al.*,2006 e Rodrigues *et. al.*, 2014, a superfície de vidro assim como a superfície vitrificada do azulejos é um substrato extremamente limitado de nutrientes, porém esses organismos conseguem se desenvolver em tais superfícies, o que pode ser explicado pela sua natureza osmofílica e xerofílica que alguns fungos apresentam. Além da sua natureza de causar biodeterioração alguns fungos, como *A. allahabadii* vêm sendo utilizados para produção de biocidas no tratamento dos biofilmes encontrados em edifícios (Hongli Hu,2013).

González-Abradelo, 2019, estudou a primeira demonstração de fungos halófilicos ascomicetos, entre ele esta o fungo *Aspergillus sydowii* em que removeram 100% das

amostram que continham hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) em águas residuais de biorrefinaria salina concluindo que esse fungo pode ser usado para tratamentos de micotoxicidade em condições de salinidade. O corroborando para justificar a presença de *Aspergillus sydowii* em um substrato inorgânico que possuem a presença de sal na superfície.

### 3.2.2. Identificação das bactérias

Os resultados dos testes de caracterização das expressões fenotípicas através de provas diferenciadas, de alguns dos 51 isolados (28/TSA e R<sub>2</sub>/23), são apresentados nas tabelas 4 e 5. Em relação à morfologia das células, 70,5 % foram de bacilos, 17,6% cocos, 11,7% filamentosa. Com base nos caracteres citomorfológicos de bacilos Gram-positivos e cocos Gram-positivos e das análises micromorfológicas das estruturas filamentosas foi possível identificar 6 gêneros; *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp. e *Mycobacterium* sp. (bacilos), *Micrococcus* sp. e *Kocuria* sp. (cocos) e *Streptomyces* sp. (actinobactéria).

As análises por MALDI-TOF MS identificou apenas 2 isolados, em nível de espécie com valores de registro (score)  $\geq 2.0$ , os demais isolados não foram possíveis de identificar apresentaram um score abaixo de 2.0. Provavelmente os resultados exibidos de um score abaixo para maioria dos isolados pode está relacionado com a base de dados do equipamento, uma que este, dispõem de mais informações voltadas para identificar cepas bacterianas de interesse clínico, possuindo poucos dados em relação a bactérias de origem ambiental. Um exemplo do relatório de identificação dos isolados com seus respectivos scores estão exemplificados na Figura 9.

**Figura 9.** Resultados das bactérias identificadas pelo MALDI Biotyper.

Amostra	Organismo	Score	Organismo	Score
A	Não identificado	0.000	Não identificado	1.001
B	<i>Bacillus subtilis</i>	2.051	Não identificado	0.000
C	Não identificado	0.001	Não identificado	0.000
D	<i>Bacillus megaterium</i>	2.050	Não identificado	1.000

Range	Description	Symbol	Color
2.300 - 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 - 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 - 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 - 1.699	not reliable identification	(-)	red

Fonte: Fonte: Software MALDI Biotyper versão 3.1.

A identificação dos isolados bacterianos por via molecular, não apresentou resultados satisfatórios. Mesmo realizando alterações ao método de extração e PCR (Sambrook, 2001), não houve extração suficiente de material genético, ou mesmo diante do material extraído não sucedeu a amplificação por PCR do DNA. Esse resultado evidencia a necessidade de novas adaptações aos protocolos de extração e de PCR para otimização dos resultados com o material genético procarioto dos isolados nos painéis de azulejos.

Segundo Cavalieri, 2018, diante da dificuldade de extrair o material genético de cepas selvagens ambientais, se faz necessário recorrer a diferentes técnicas moleculares de investigação da comunidade microbiana. Atualmente os microbiologistas que investigam a biodeterioração, estão utilizando técnicas de sequenciamentos de alta geração (NGS), pois apresentam melhorias em relação ao processo original de sequenciamento, permitem o sequenciamento em massa de diferentes amostras de DNA (independentemente de cultivo e clonagem) dos mais variados tipos de ambientes (Gutarowska, 2015).

Em relação à distribuição das bactérias no Convento de São Francisco de Olinda, as cepas *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Micrococcus* sp. e *Streptomyces* sp. foram isoladas em todos os quatro pontos de coleta, destaque para *Bacillus* sp. que correspondeu a 33% do total de isolados bacterianos ver tabela 6.

Algumas bactérias do grupo Firmicutes, que incluem principalmente os *Bacillus* sp., apresentam endósporos, que são estruturas de existência que garantem a sobrevivência da bactéria por períodos de estresse ambiental. Estes são, portanto resistentes à radiação ultravioleta e gama, temperatura, ambientes secos e/ou salinos. Os representantes do firmicutes são organismos com capacidade de produzir EPS (Matriz de Polímero Extracelular). Isso permite sua fixação e sobrevivência em ambientes inóspitos, como azulejos (Coutinho *et. al.*, 2012). Cabo Verde, 2015 identificou através de testes de expressão fenotípica, verificou que 77 % dos isolados bacterianos foram bacilos Gram-positivos formadores de endósporos, das amostras obtidas dos painéis de azulejos na sala do Museu Nacional do Azulejo (Lisboa, Portugal).

**Tabela 4.** Caracterização fenotípica através de provas diferenciais de bacilos Gram-positivos.

Caracteres citomorfológicos de bacilos Gram-positivos																													
Características	Bac 4 Con	Bac 5 Con	Bac 6 Con	Bac 7 Con	Bac 9 Con	Bac 11a Con	Bac 11b Con	Bac 12 Con	Bac 13 Con	Bac 16 Con	Bac 17 Con	Bac 19 Con	Bac 20 Con	Bac 21 Con	Bac 22 Con	Bac 23 Con	Bac 24 Con	Bac 26 Con	Bac 27 Con	Bac 28 Con	Bac 29 Con	Bac 30 Con	Bac 31 Con	Bac 2	Bac 6	Bac 34	Bac 43	Bac 100	
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>KOH 3%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Morfologia das células</b>	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	
<b>Arranjo das células</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	str	-	str	-	-	str	-	str	-	-	-	-	-	
<b>Colônias pigmentadas:</b>																													
<b>Amarelo/rosa/vermelho/laranja</b>	-	-	a	-	-	-	a	-	-	a	v	v	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	l	-
<b>Formação de esporo</b>	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Elipsoidal</b>	+	+	+	+	+	nd	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+
<b>Cilíndrico</b>																													
<b>Esférico</b>	+																												
<b>Esporângio distendido</b>	-	-	-	nd	nd	nd	-	-			-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	-	
<b>Posição preponderante do esporo:</b>	nd	nd		nd		nd	nd														nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd	
<b>Central</b>			+		+			+			+	+	+	+		+		+	+	+		+							
<b>Terminal</b>												+					+	+											
<b>Paracentral</b>			+								+	+		+	+		+					+							+
<b>b: bacilo; str: estreptobacilo; a: amarelo; v: vermelho; l: laranja; nd: não foi possível determinar</b>																													

Características																													
	Bac 4 Con	Bac 5 Con	Bac 6 Con	Bac 7 Con	Bac 9 Con	Bac 11a Con	Bac 11b Con	Bac 12 Con	Bac 13 Con	Bac 16 Con	Bac 17 Con	Bac 19 Con	Bac 20 Con	Bac 21 Con	Bac 22 Con	Bac 23 Con	Bac 24 Con	Bac 26 Con	Bac 27 Con	Bac 28 Con	Bac 29 Con	Bac 30 Con	Bac 31 Con	Bac 2	Bac 6	Bac 34	Bac 43	Bac 100	
<b>Motilidade</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Indol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Produção de H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxidase</b>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+l	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+l	+	-	-	+	+	-	+	
<b>Voges-Proskauer</b>	-	+	+	-	-	+	-	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	-	nd	-	-	nd	-	-	+	+	-	+	
<b>Crescimento aeróbico</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Crescimento anaeróbico</b>	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	nd	-
<b>Produção de ácido por:</b>																													
<b>D-Glicose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>D-Manose</b>	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>D-Manitol</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
<b>D-Xilose</b>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>Hidrólise da caseína</b>	+	+	+	+	+	nd	-	+	-	+	nd	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	nd	nd	nd	-	n	d
<b>Hidrólise de amido</b>	-	-	-	+	-	nd	-	+	-	+	nd	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	nd	-	-	
<b>Hidrólise de Esculina</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<b>Utilização de Citrato</b>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	
<b>Redução de Nitrato</b>	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	
<b>Fenilalanina desaminase</b>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<b>Lisina descarboxilase</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<b>Arginina dihidrolase</b>	-	-	-	-	-	nd	-	+	+	+	nd	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-

nd: não foi possível determinar; +l: positivo lento;

**Tabela 5 .** Caracterização fenotípica através de provas diferenciais de cocos Gram-positivos.

Características										
	Bac 2 Con	Bac 8 Con	Bac 10 Con	Bac 14 Con	Bac 25 Con	Bac 5	Bac 12	Bac 41	Bac 90	Bac 135
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>KOH 3%</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Morfologia das células</b>	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
<b>Arranjo das células</b>	tr	trsr	st	pcd	tr	nd	st	st	pcd	tr
<b>Colônias pigmentadas:</b>										
<b>Amarelo</b>					+		+			+
<b>Amarelo pálido</b>	+	+								
<b>Creme pálido a laranja pálido</b>				+					+	
<b>Rosa-vermelho</b>								+r		
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxidase</b>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<b>Voges-Proskauer</b>	nd	nd	-	-	nd	+	-	nd	nd	nd
<b>Crescimento aeróbico</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Crescimento anaeróbico</b>	+	-	-	+	nd	-	+	-	-	nd
<b>Produção de ácido por:</b>										
<b>D-Glicose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>D-Manose</b>	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<b>D-Manitol</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>D-Xilose</b>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>Urease</b>	+	+	nd	+	-	nd	+	+	+	nd
<b>DNase</b>	-	+	nd	-	+	nd	+	nd	nd	+
<b>Redução de nitrato</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>Bacitracina 0,04 U</b>	S	S	nd	S	S	S	S	S	R	S
<b>Bacitracina 10 U</b>	S	S	nd	S	S	S	S	S	R	S
<b>Novobiocina 5 µg</b>	S	S	nd	S	S	S	S	S	S	S

c: cocos; tr: tétrades; trsr: tétrades e sárcinas; st: estafilococos; nd: não foi possível determinar; r: rosa; S: sensível; R: resistente.



	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<b>Cap. Santa Ana</b>	18	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	13
	19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	28	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	21	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	22	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
	23	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	24	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	26	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	27	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	31	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
<b>Corredor</b>	32	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	33	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	

	34	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	35	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	37	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	38	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	39	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	49	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	41	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	42	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	43	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<b>Escadaria</b>	44	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	45	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	46	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	47	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	48	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	49	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	50	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	51	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		<b>13</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>3</b>

14

<i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	<i>Brevibacillus</i> <i>sp.</i>	* <i>Bacillus</i> <i>megaterium</i>	* <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	<i>Micrococcus</i> <i>sp.</i>	<i>Kocuria</i> <i>sp.</i>	<i>Mycobacterium</i> <i>sp.</i>	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>	Não identificado
-------------------------------	------------------------------------	--	--------------------------------------	----------------------------------	------------------------------	------------------------------------	-----------------------------------	---------------------

**Legenda:** \* Além da caracterização fenotípica através de provas diferenciais esses dois isolados foram os únicos a serem identificados por MALDI-TOF MS.

Enquanto Sheng, 2010 identificou usando uma abordagem acoplada envolvendo análise independente de cultivo de desnaturação eletroforese em gel de gradiente (DGGE) bactérias (*Bacillus*, *Massilia*, *Brevibacillus*, *Glacialice*, *Acinetobacter*, *Brachysporum* e *Achromobacter*) em um monumento histórico na China. Assim como Gaylarde, 2017, utilizando técnicas de sequenciação de DNA da próxima geração, identificou que os grupos bacterianos mais abundantes foram o Actinobacteria e Micrococcaceae.

O crescimento bacteriano é frequentemente associado à formação de biofilmes, promovendo descoloração, a degradação de componentes químicos do substrato o que leva a deterioração da superfície do monumento. Porém é importante destacar que a presença do biofilme bacteriano não é exclusivamente maléfica a estrutura do monumento. Estudos recentes e avançados na área da biorregeneração, pesquisam alguns tipos de bactérias (*Bacillus pseudofirmus*) como aditivo a mistura de concreto promovendo a sua regeneração. Provam que ao contrário da ação da biodeterioração, a presença de alguns tipos de bactérias podem contribuir para solucionar problemas estruturais em ambientes construídos (Claudino, 2017).

### 3.2.3. Identificação das cianobactérias e microalgas

No que se refere à identificação de micro-organismos fotossintéticos foram observadas nas amostras de azulejos a presença de 4 gêneros e 2 espécies de cianobactérias, que são *Chroococcidiopsis muralis* (Geitler, 1933), *Chlorogloeopsis fritschii* (Miltra & Pandev, 1967), *Chlorogloeopsis sp.*, *Leptolyngbya sp.* e *Nostoc sp.* E

As cianobactérias *Chroococcidiopsis muralis* e *Nostoc sp.* foram os únicos gêneros que apareceram em todos os locais de coleta (ver tabela 7), com exceção ao ponto três (corredor) que não houve crescimento de organismos autótrofos nas amostra desse local como já havia sido mencionado. *Chroococcidiopsis muralis* e *Nostoc sp.* são encontrados amplamente em diversos tipos substratos e ambientes (Galindo-Alcázar, 2018), Malone et. al, 2016 identificou *Nostoc sp.* e *Leptolyngbya sp.* em lagos salinos, mostrando que são organismo halotolerantes. O que colabora com os dados da presente pesquisa, uma vez que existe a presença de sal nas superfícies dos painéis de azulejos do Convento de São Francisco.

A maioria das cianobactérias e microalgas encontradas foram relatadas como organismos fotobiontes com associação líquênica tais com *Nostoc sp.*, *Coccomyxa sp.* e *Scytonema sp.* (Ahmadjian, 1993; Salvadori, 2017). Coutinho, 2015 também identificou a

presença de *Nostoc* sp e *Tapinothrix* sp em painéis de azulejos do Palácio Nacional da Pena (Sintra, Portugal).

Existem vários estudos sobre a ação microbiana de organismos autotróficos colonizadores de substratos inorgânicos. Os primeiros modelos de colonização em monumentos consideravam que os organismos pioneiros era obrigatoriamente um fotoautótrofo, dado que estes requerem apenas luz solar, água e minerais para o seu crescimento. Assumia-se que estes abririam caminho para bactérias heterotróficas, fungos e organismos superiores, promovendo o aparecimento de uma camada de biofilme que é enriquecido com matéria orgânica e com sais inorgânicos (Allsopp,2016). Dessa forma a biomassa dos micro-organismos fotossintéticos pode ser utilizada por micro-organismos heterotróficos como fonte de carbono e energia. Atualmente, porém, tem sido discutido principalmente entre os microbiologistas da área de biodeterioração, que a colonização inicial de ambientes construídos pode ser realizada por bactérias e fungos organotróficos, em conjunto com os organismos fotoautotróficos (Mateus, 2013).

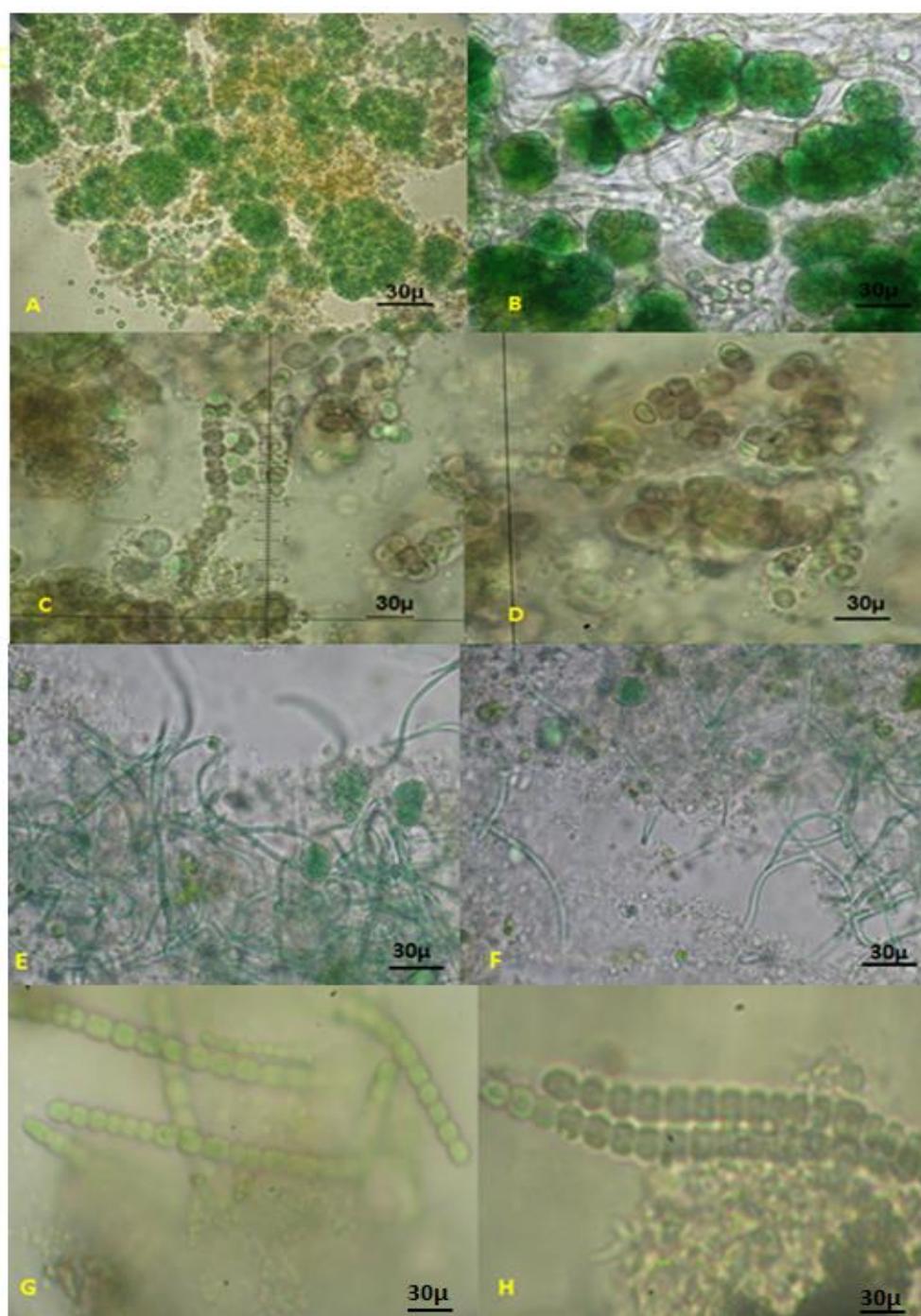
Independentemente se os organismos fotoautotróficos são os primeiros na colonização microbiana, eles são os principais responsáveis por causar manchas verdes e pretas nas superfícies inorgânicas e possuem a capacidade de aderir a estas superfícies através da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que são liberados pelas cianobactérias sob condições de estresse tais como dessecação e irradiação UV (Keshari, 2014). E são capazes de desenvolvem-se em ambientes mesmo com pouca intensidade de luz, como em dentro de igrejas, conventos, cavernas, catacumbas e outros (Macedo et al.2005; Ma,2015).

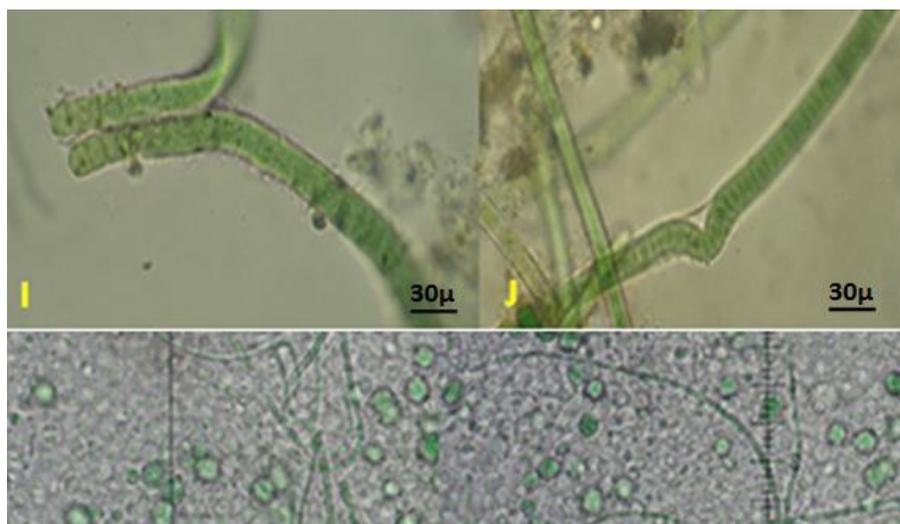
**Tabela 7.** Micro-organismos fototróficos identificados por métodos de cultura nos painéis azulejos do Convento de São Francisco de Olinda.

Gêneros/Espécies	Pontos			
	1	2	3	4
<i>Chroococidiopsis muralis</i> (Geitler, 1933)	1	1	0	1
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> (Miltra & Pandev, 1967)	0	1	0	0
<i>Chlorogloeopsis sp.</i>	0	1	0	1
<i>Nostoc sp.</i>	1	1	0	1
<i>Leptolyngbya sp.</i>	1	0	0	0
<i>Scytonema hofmanni</i> (C. Flahault, 1886)	1	1	0	0
<i>Scytonema sp.</i>	0	1	0	0
<i>Tapinothrix sp.</i>	0	1	0	0
<i>Coccomyxa sp.</i>	1	1	0	1

**Legenda:** Presença (1) e Ausência (0). **1**(Capela capitulo); **2** (Capela Santa Ana); **3**(Corredor) e **4**(Escadaria).

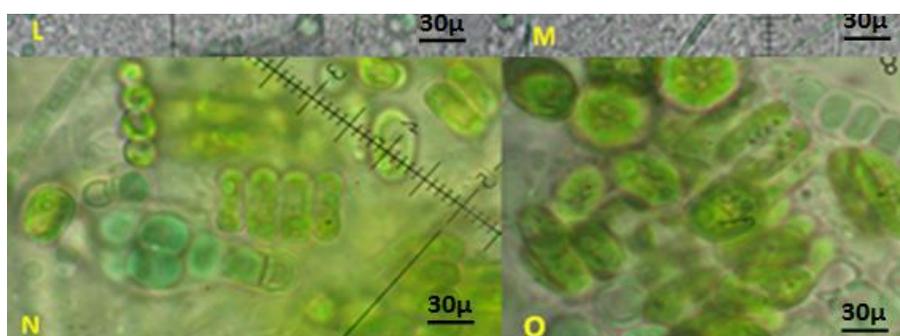
**Figura 10.** Cianobactérias e microalgas presentes nas amostras de azulejos do Convento São Francisco de Olinda. *Chroococidiopsis muralis* (A e B), *Chlorogloeopsis fritschii* (C) e *Chlorogloeopsis* sp. (D), *Leptolyngbya* sp. (E e F) (*Nostoc* sp. (G e H), *Scytonema hofmanni* (I) e *Scytonema* sp. (J), *Tapinothrix* sp. (L e M) e *Coccomyxa* sp. (N e O).





Fonte: Autora, 2019.

3.3



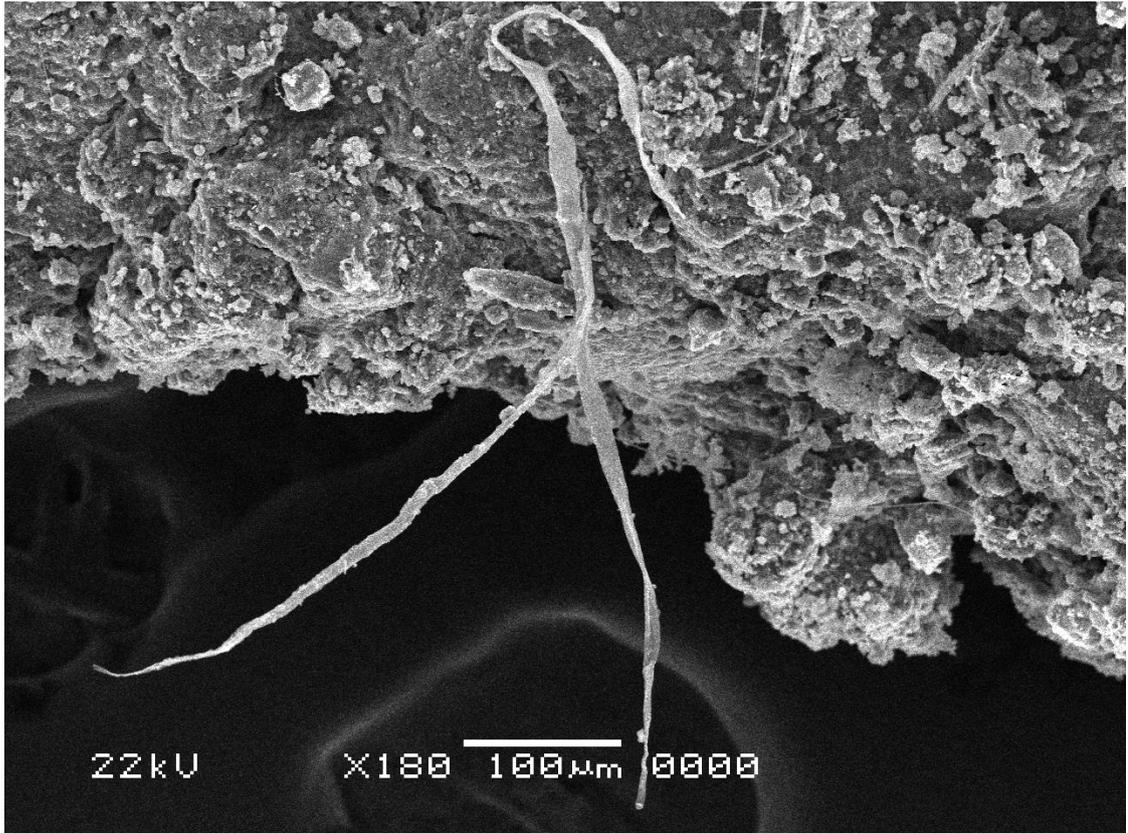
### MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E LUPA BINOCULAR

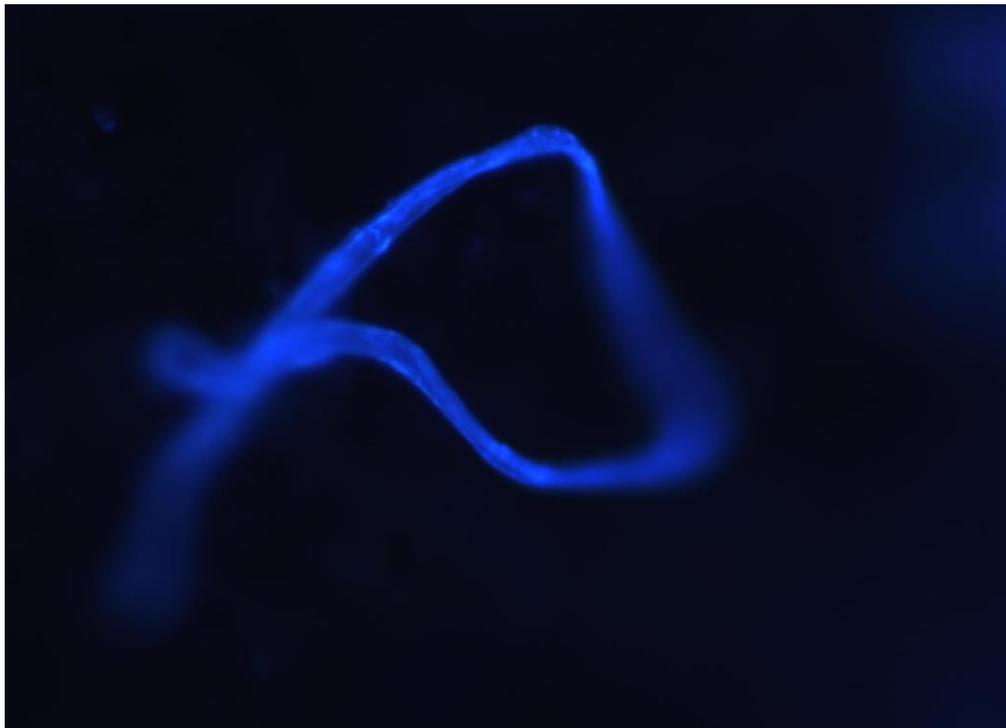
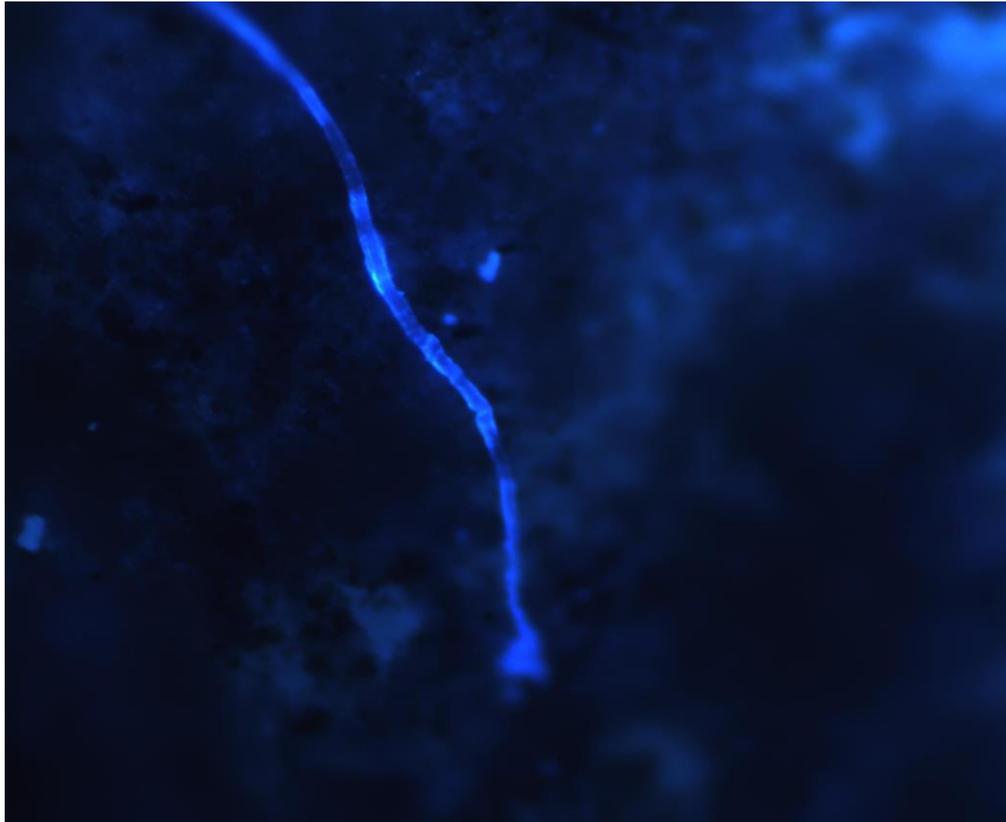
As imagens obtidas através do MEV dos fragmentos de azulejos foram possíveis perceber alguns longos filamentos (figura 11), provavelmente possa ser estruturas morfológicas relacionadas aos organismos presentes na comunidade microbiana aderida ao azulejo. Dentre os micro-organismos que apresentam a morfologia em questão (filamentosa); são os fungos (*Aspergillus*, *Curvularia*, *Lichtheimia*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Phenerochaete* e *Penicillium* e outros gêneros), as cianobactérias (*Leptolyngbya* e *Nostoc*), microalgas (*Scytonema*, *Tapinothrix* e outros), há também actinobactérias (*Streptomyces sp.* e *Nocardiopsis*). A presença desses micro-organismos e outros no na superfície dos azulejos pode causar mudanças de volume, penetração na matriz cerâmica e liberação de substâncias metabólicas, como ácidos orgânicos e inorgânicos, como ocorre em materiais de pedra (Gorbushina, 2007; Sanjad *et. al.*, 2014; Gaylarde *et. al.*, 2016).

Corroborando com os resultados as imagens obtidas a partir da coloração por calcofluor evidenciaram a presença de estruturas fungícas (figura 12), do ponto 2 (Capela Santa Ana), sendo este um ponto que apresentou a maior diversidade de fungos. Silva et.al. 2014, também observou estruturas fungícas e alterações químicas provocadas pela colonização, através da microscopia eletrônica de varredura, assim como Coutinho et. al., 2019 que testou a biorreceptividade de uma espécie nova de fungo *Devriesia imbrexigena* isolada em azulejos.

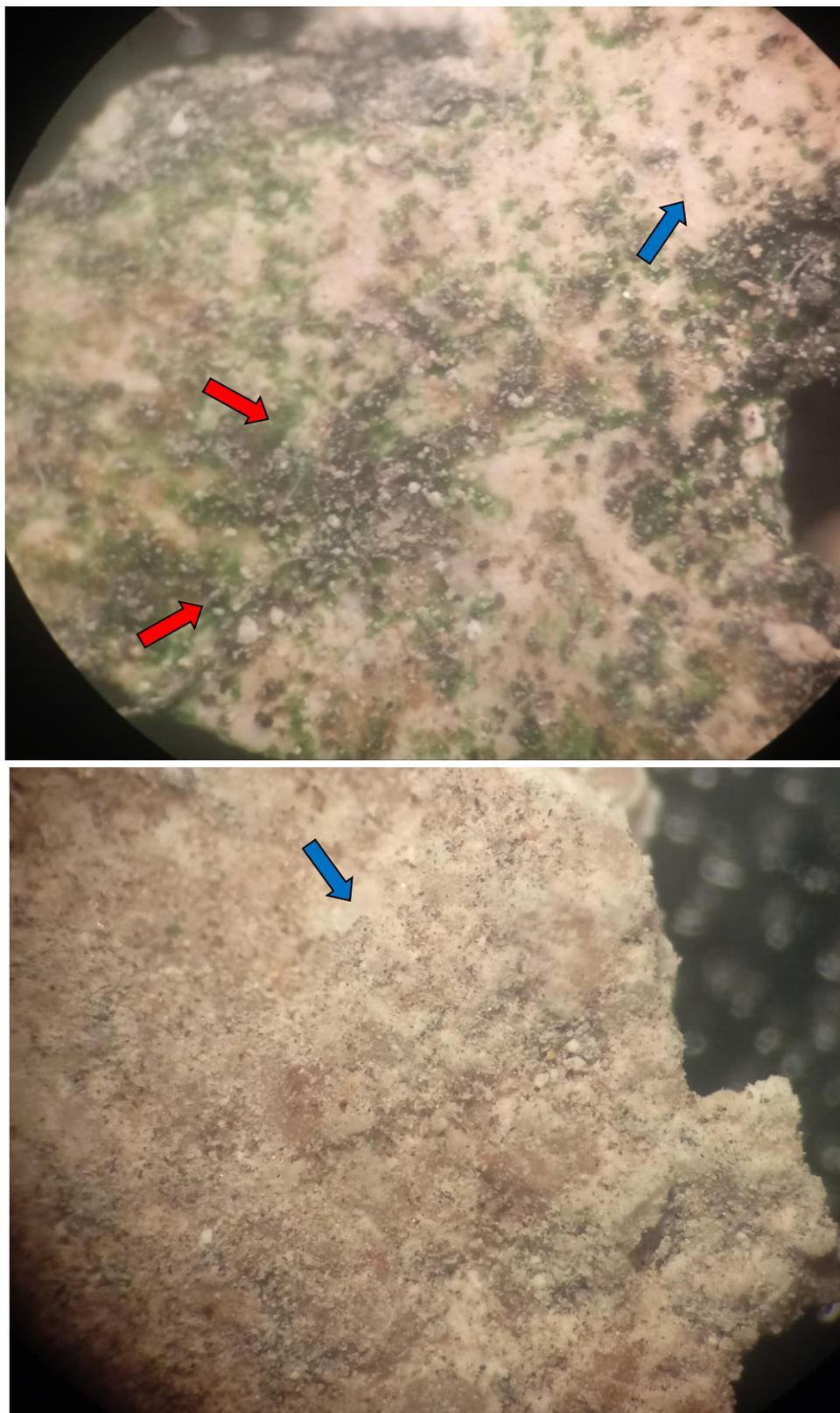
Em relação a outras estruturas morfologias unicelulares (cocos e bastonetes de bactérias) não foram são observadas através do MEV. O que pode estar relacionada com a densa camada de sal depositada na superfície dos azulejos visualizada através da lupa binocular (figura 13). Segundo Esteves et al.,2016 um dos problemas mais comuns nos edifícios antigos é presença de sais, senão o maior fenômeno de degradação de azulejos (Sanjad, 2002) . Como resultado dessas reações temos que a perda da camada vítrea possibilita a infiltração de água pluviais, e conseqüentemente cria um micro-habitat para micro-organismo principalmente para os halófilos.

**Figura 11.** Imagem MEV da crosta aderida ao fragmento de azulejo do século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Revelando uma estrutura longa filamentosa provavelmente microbiana.<sup>17</sup>





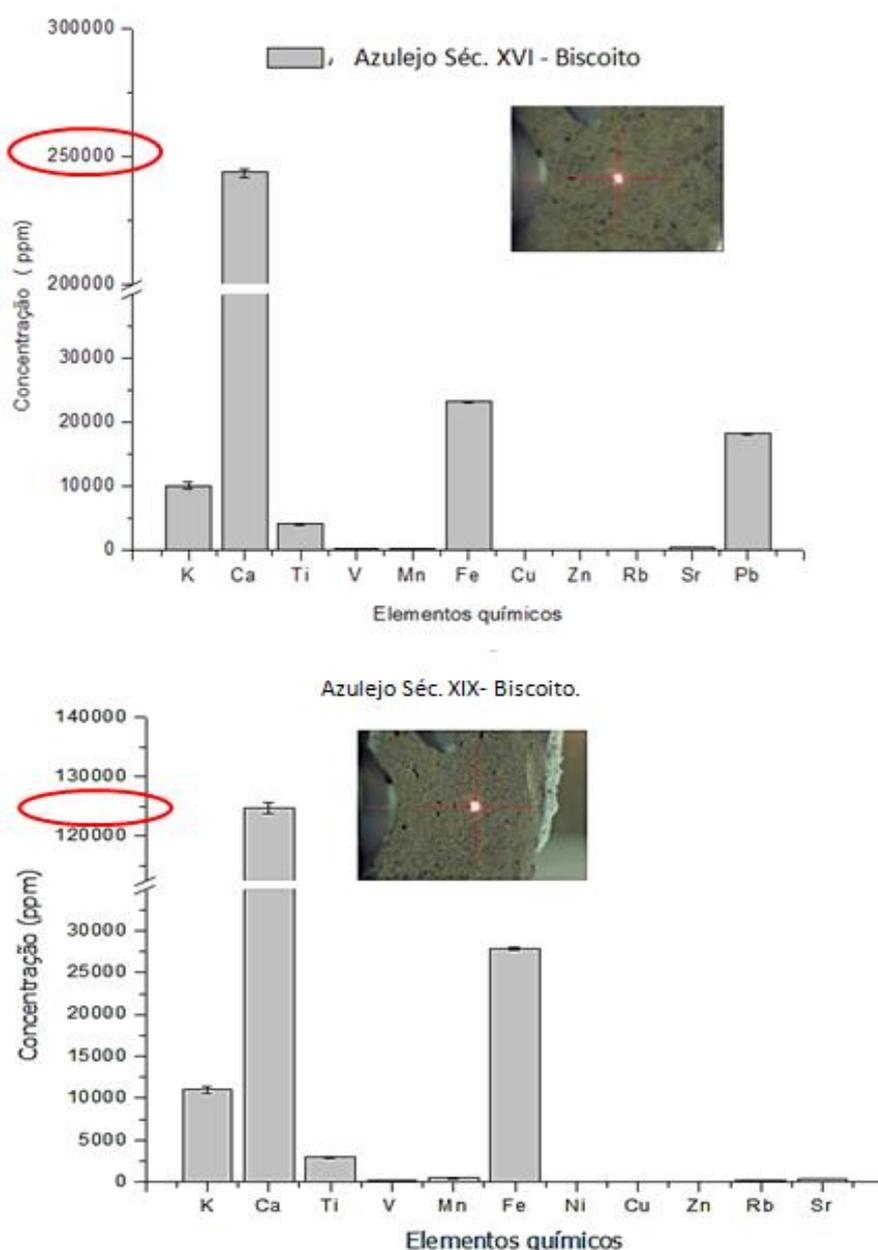
**Figura 13.** Imagem por lupa binocular do detalhe de um fragmento do azulejo século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Observa-se a camada de sal (seta azul) e pontos de crostas esverdeadas (seta vermelha) depositados na superfície do azulejo.



### 3.5. COMPOSIÇÃO MINERALÓGICA DOS AZULEJOS

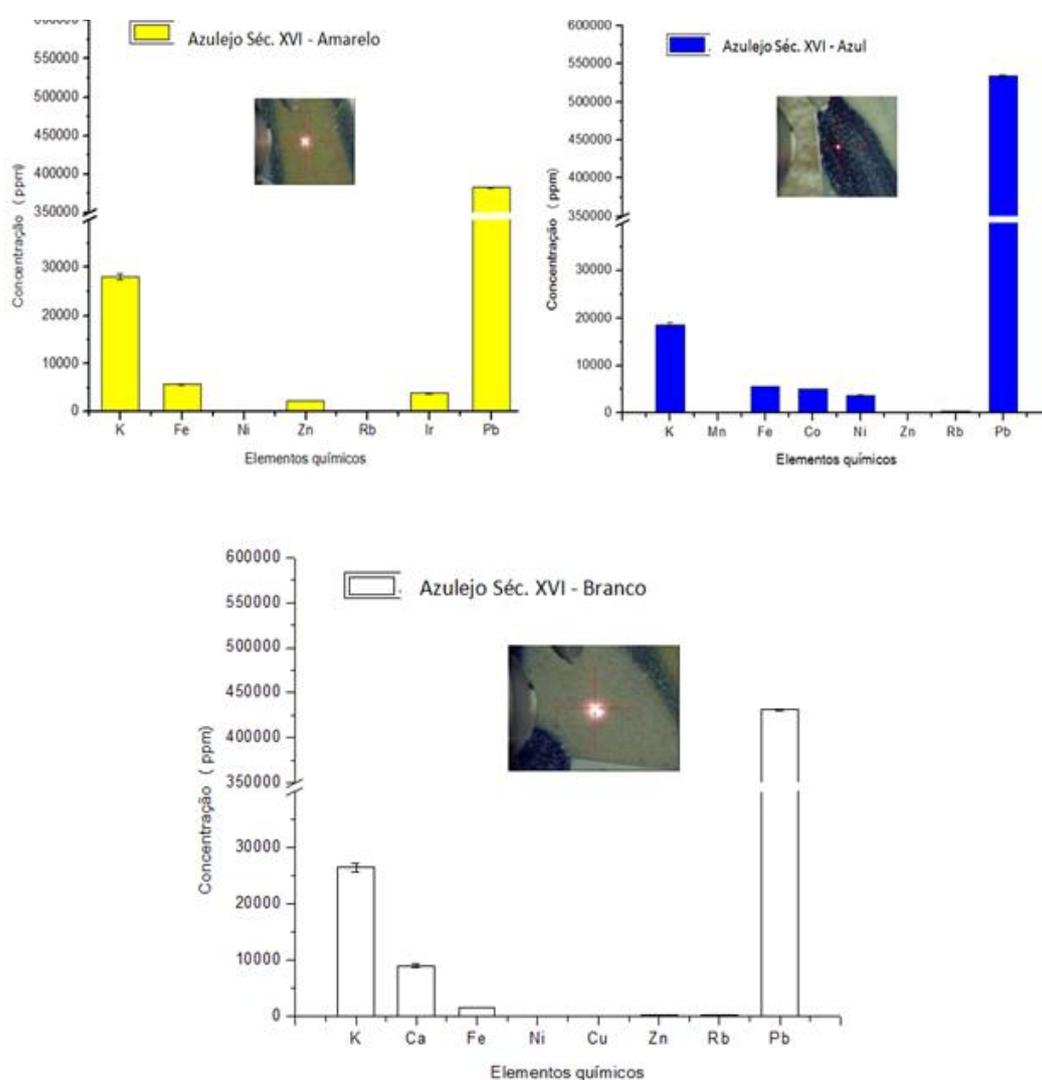
Através dos resultados das análises por FRX possível verificar que os azulejos do século XVI do Convento de São Francisco de Olinda são de fato os azulejos antigos que os da Academia Pernambucana de Letras. Ao compararmos os dados obtidos do elemento cálcio (Ca) das duas amostras (século XVI e XIX), observa-se que o pico de cálcio na amostra do século XVI é aproximadamente duas vezes maior do que a amostra do século XIX (figura 14). Corroborando com Muniz et al.,2017, em relação da característica do cálcio ser um dos marcadores que indica diferenças cronológicas.

**Figura 14.** Gráfico da composição mineralógica dos azulejos do século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Comparação da composição de cálcio dos biscuitos dos azulejos do século XVI com o do século XIX. .



Em relação aos pigmentos presentes no vitrificado amarelo e azul, apresentaram diferenças na concentração de chumbo (figura 15). O que pode explicar essa diferença na concentração de chumbo de um pigmento para outro na mesma peça, poderia estar relacionado com a maior complexidade mineralógica das peças mais antigas, em decorrência de uma argila impura, rica em diversos materiais. Já os biscuitos mais modernos como os do século XIX fruto de um processo semi-industrial de produção, possuem uma mineralogia mais simples (Sanjad, 2002; Caldeira et al., 2015).

**Figura 15.** Gráfico da composição mineralógica dos azulejos do século XVI do Convento de São Francisco de Olinda. Composição dos pigmentos presentes na cama vitrificada.



#### **4 CONCLUSÃO**

É importante lembrar que o monumento construído e seus bens integrados, como azulejos, estão inseridos em um meio ambiente, em que tudo nasce se transforma e morre. No entanto, o morrer (biodeterioração) do azulejo não é bem quisto pelos seres humano quando o tema é preservação de patrimônio, pois se dá um valor especial a peça. Na verdade nada se perde tudo se transforma e essas transformações quem realiza são os MICRO-ORGANISMOS, em um processo natural e complexo (geomicrobiologia). Não há tamanha preocupação negativa quando essas transformações são “benéficas” aos seres humanos, como por exemplo, as que são feitas dentro do aparelho digestivo pela microbiota, produção de bebidas, antibióticos, queijos, pães e tantos outros. Nessas situações citadas o ser humano não entende como transformações deletérias. Independente desse processo natural que realizam os micro-organismos faz se necessário à preservação desses bens que compõem o patrimônio cultural que é importante para contar a História dos seres humanos. Essa preservação se dá também via estudos como este, onde se analisa a presença de micro-organismos, seguida da devida identificação para assim relacionar, ou não, a existência desses agentes ao estado da deterioração da peça, neste caso, os azulejos.

#### **5 AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas de estudo e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pelo apoio financeiro.

## 6 REFERÊNCIAS

ALLSOPP, D.; SEAL, K J.; GAYLARDE, C. C.; BENTO, F. M. **Introdução à biodeterioração**. Porto Alegre, UFRGS, 2016, 272p.

BARROW, G.I. e FELTHAM, R.K.A. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993. 216 p. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511527104>.

BENNY, G.L. 1982. Zygomycetes. Pp. 184-195. In: G.L. Benny (ed.). *Synopsis and Classification of Living Organisms*. New York, McGraw - Hill Book Co. Inc

BRINK, B. Urease Test Protocol. **American Society for Microbiology**, p. 1–10, 2010. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/>>.

CAVALIERI, D.; PERITO, B.; GALINDO-ALCÁZAR, O. e MEDINA-JARITZ, N.B. **Innovative metagenomic approaches for detection of microbial communities involved in biodeterioration of cultural heritage**. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 364 (2018) 012074 Doi: oi:10.1088/1757-899X/364/1/012074.

Caldeira, A. T.; Rosado, T.; Silva, M.; Gonzalez, M.; Candeias, A. *Microrganismos e património - Novas abordagens*, Évora, v 4. p. 1-6, 2015

Ceci, **Restauo Sacristia e Capela dos noviços, relatório final**. Olinda 2009. Disponível em <[file:///C:/Users/Seu20carlos/Downloads/Ordem20Terceira20\(Sacristia20e20Capela20NoviC3A7os\)20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Seu20carlos/Downloads/Ordem20Terceira20(Sacristia20e20Capela20NoviC3A7os)20(3).pdf)> Acessado em 02.03.2019.

CLAUDINO, Abreu, C. M.; GOMES, B. M. C.; NEVES, Y. T. e NASCIMENTO, M. V. **Presença de bactérias no concreto: uma análise da biodeterioração e bioregeneração CONPAR2017** - Recife, 30 e 31 de agosto de 2017.

CEBALLOS, B. S. O. **Técnicas de microbiologia sanitária e ambiental**. /Beatriz Susana Ovruski de Ceballos, Célia Regina Diniz. – Campina. Pág 171 à 181. Disponível em <<http://www.uepb.edu.br/download/ebooks/Tecnicas-de-Microbiologia.pdf>> Acessado em 22.03.2018

CYANOBACTERIA AND MICROALGAE FROM SURFACE BIOFILM FROM MALINALCO, MEXICO, AN ARCHAEOLOGICAL SITE

GONZÁLEZ-ABRADELO, D.; PÉREZ-LLANO, Y.; PEIDRO-GUZMÁN, H; SÁNCHEZ-CARBENTE, M. R.; FOLCH-MALLOL, J. L.; ARANDA, E.; VAIDYANATHAN, V K.; CABANA, H.; GUNDE-CIMERMAN, N. e BATISTA-GARCÍA, R. A.. **First demonstration that ascomycete halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycorremediation under high salinity conditions**. *Bioresource Technology* volume 279 , maio 2019 , páginas 287-296

Desikachary, TV. *Cyanophyta*. New Delhi Indian Council of Agricultural Research, Gardner, NL. 1927. *New Myxophyceae from Porto Rico*. New York, New York Botanical Garden, Jacinavicius, FR, Gama-Jr, WA, Azevedo, MTP, Sant'Anna, CL. 2013. *Manual para cultivo de cianobactérias*. São Paulo, Instituto de Botânica, 32 p. 1959.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W. & Anderson, T.H. 1993. **Compendium of soil fungi**. v.I. San Francisco, Academic Press.

FAZIO, A. T.; ANDREA, C.; DAYSI, S.A.; CHAMBERGOB, F. S. e DALVA, L.A. **Towards a better comprehension of biodeterioration in earthen architecture: Study of fungi colonisation on historic wall surfaces in Brazil.** Journal of Cultural Heritage 76, 75–96, 2016.

GAYLARDE, C.; OGAWA, A.; BEECH I.; KOWALSKI, M. e BAPTISTA-NETO, J. A. **Analysis of dark crusts on the church of Nossa Senhora do Carmo in Rio de Janeiro, Brazil, using chemical, microscope and metabarcoding microbial identification techniques.** 2017.

GUTAROWSKA B; CELIKKOL-AYDIN S.; BONIFAY V.; OTLEWSKA A; AYDIN E; OLDHAM AL.; BRAUER JI.; DUNCAN K. E.; ADAMIAK J.; SUNNER J.A. e BEECH I.B. 2015. **Metabolomic and high-throughput sequencing analysis-modern approach for the assessment of biodeterioration of materials from historic buildings.** Front. Microbiol., 6:979.

HESSELTINE, C.W.; FENNEL, D.I. **The genus. *Circinella*.** *Mycologia*, 7, 193-211.

Gorbushina, A.A., 2007. Life on the rocks. *Environmental Microbiology* 9,1613e1631.

HOLT, J G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9 ed. 1994. 787p.

Jacobs, K. e BOTHA, A. (2008). *Mucor renisporus* sp. nov., a new coprophilous species from Southern Africa. *Fungal Diversity* 29: 27-35.

Keshari, N. e Adhikary, S. P. **Ecology of cyanobacteria on stone monuments, biodeterioration, and the conservation of cultural heritage.** Cyanobacteria: An Economic Perspective. Edited by Naveen K. Sharma, Ashwani K. Rai and Lucas J. Sta 2013.

KLICH, M. A. **Identification of Common Aspergillus species.** Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002. 116 p

KOMÁREK, J. 2013. **Cyanoprokaryota–3. Teil/3rd Part: Nostocales.** Süßwasserflora von Mitteleuropa 19:1-1130.

KOMÁREK, J e ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. **Teil 1: Chroococcales.** In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. & Mollenhauer, D. [Eds.] Süßwasserflora von Mitteleuropa. Springer Spektrum, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, pp. 548. 1998

KOMÁREK, J. e ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. **Teil Oscillatoriales.** In: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. & Schagerl, M. [Eds.] Süßwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, pp. 759. 2005.

KOMÁREK, J e HAUER, T. **CyanoDB.cz: The on-line database of cyanobacterial genera.** České Budějovice, República Tcheca: University of South Bohemia. 2014.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; MAREŠ, J. e JOHANSEN, JR. 2014. **Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach.** *Preslia* 86:295-335.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

LIMA, D. X.; CORDEIRO, T. R. L.; SOUZA, C. A. F.; SANTIAGO, A. L. C. M. A. e SOUZA-MOTTA, C. M. **Diversity of basal fungal order Mucorales (Mucoromycota) in a remaining area of the Brazilian Atlantic Rainforest.** *Nova Hedwigia*, Volume 107, Numbers 3-4, November 2018, pp. 459-471(13)

. Coutinho M.L., A.Z. Miller b,c , A. Phillip d , J. Mirão b , L. Dias b , M.A. Rogerio-Candelera c , C. Saiz-Jimenez c , P.M. Martin-Sanchez e,f , L. Cerqueira-Alves g , M.F. Macedo. **Biodeterioration of majolica glazed tiles by the fungus *Devriesia imbrexigena*** *Construction and Building Materials* 212 (2019) 49–56.

MA, Y; ZHANG, H; DUAN, Y; TIAN, T; XIANG, T; LIU, X; WU, F; AN, L; WANG, W; GU, J. e FENG, H. **The community distribution of bacteria and fungi on ancient wall paintings of the Mogao Grottoes.** *Scientific Reports*, 2015, v. 5, p. article no. 7752, 2015. <http://hdl.handle.net/10722/232885>.

**Macedo, M. F. e MILLER, A. Mapping and characterization of a green biofilm inside of Vilar de Frades Church (Portugal).**2006 *Journal of Cultural Heritage*.

Malakhova, M. V.; VERESHCHAGIN, V. A.; IL'INA, E.N.; GOVORUN, V.M.; FILIMONOVA, O.; GRUDININA, S.A.; SIDORENKO, S.V.MALDI-ToF mass-spectrometry in analysis of genetically determined resistance of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolone. *Antibiot.Khimioter.v.52 p.10–17, 2007*

MALONE, C. F. S.; SANTOS, K R. S.; e SANT'ANNA, C. L. **Algas e cianobactérias de ambientes extremos do Pantanal brasileiro.** *Oecol. Aust.*, 16(4): 745-755, 2016. Ahmadjian, V., 1993. *The Lichen Symbiosis*. Wiley, New York.

MARTINS, H. e CAVALCANTI, V. **A restauração do cruzeiro do convento de São Francisco de Olinda/PE.** *Revista Geonomos*, 24(2), 252-256. Universidade de Minas Gerais. 2016. Doi: 10.18285/geonomos.v24 .

MATEUS, D. M. R.; Silva, R.B.; COSTA, F. M. C. e COROADO, J. P. F. **Diversidade microbiológica do edifício da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e avaliação do seu controle por biocidas.** *Conservar Património, Tomar*, v. 17 p. 11- 20, 2013.

MATSUURA, A. B. J. M. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação /** Ani Beatriz Jackisch Matsuura. – Campinas, SP: [s.n.], 429p, 2004.

MCDEVITT, S. Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. **American Society for Microbiology**, p. 1–9, 2009.

MOYES, R. B.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. P. **Differential Staining of Bacteria: Gram Stain.** In: *Current Protocols in Microbiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009. p. 1–8.

Muniz, E. F.; Monteiro, G.A.; Lavallo, H.; Maior, M. S. Cronologia de azulejos históricos danos e caracterização química dos revestimentos das fachadas do museu da Abolição no Recife, Pernambuco. *Clio Arqueológica* 2017, V32N2, p.253-288. 10.20891/clio.V32N2p253-289

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A. e PDLUGONSKI, J. **Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*.** *Growth and product characterization.* *Journal of Biotechnology*, n. 92, p. 287-294, 2002.

PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O. e SAVINO, A. **The index of microbial air contamination.** *Journal of hospital infection.* V. 46, n. 4, p. 15, 2000.

PITT, J.I.A. **A laboratory guide to commons *Penicilium* species.** North Ryde, Commonwealth. 1988.

RABINOVICTH, L.; OLIVEIRA, E. J. de. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos.** 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

RAPER, K.B.; THOM, C. 1994. **A manual of *Penicillia* 1-878.**

REINER, K. Catalase Test Protocol. **American Society for Microbiology**, p. 1–9, 2010. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3226-catalase-test-protocol>>.

REYNOLDS, J.; MOYES, R.; BREAKWELL, D. P. **Differential Staining of Bacteria: Endospore Stain.** *Current Protocols in Microbiology*, n. November, p. 1–5, 2009.

SHIELDS, P.; CATHCART, L. Oxidase Test Protocol. **American Society for Microbiology**, p. 1–5, 2010. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3229-oxidase-test-protocol>>.

SALVADORI, O.; MUNICCHIA, A. C. **The Role of Fungi and Lichens in the Biodeterioration of Stone Monuments.** *The Open Conference Proceedings Journal*, 2016, 7, (suppl 1: M4) 39-54

SAMBROOK, J. e RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. v. 3

SANJAD, T. A. B. C.; COSTA, M. L.; PAIVA, R. S. e PALÁCIOS, F. O. **Ação microbiológica nos azulejos históricos das fachadas de Belém, região amazônica.** *Pós: Belo Horizonte*, v. 4, n. 8, p. 124 - 133, 2014.

Sanjad, T. A. B. C. **Patologias e conservação de azulejos: um estudo tecnológico de conservação e restauração de azulejos encontrados nas cidades de Belém e Salvador.** 2002.

SHIRLING, E. B. e GOTTLIEB, D. **Methods for characterization of *Streptomyces* species.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996. 16: 313-340  
Sidrim, JJC, Rocha, MFG. *Micologia Médica ‘a luz de autores contemporâneos.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004, p. 83-86

SONG, B. e LEFF, L. **Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station.** *Microbiological Research*, vol. 160, no. 2, 2005. pp. 111-117.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.005>. PMID:15881827

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. e CASE, C. L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artemed, 2012.

Verde, S. C e Silva, T.; **Microbiological and compositional features of green stains in the glaze of the Portuguese “Great View of Lisbon” tile panel.**

Wang, Y. ; Fan, Z. Z.; JieWang. **Wood carbonization as a protective treatment on resistance to wood destroying fungi***International Biodeterioration & Biodegradation* Volume 129, April 2018, Pages 42-49.

## **APÊNDICE**

**Tabela 1.** Análise dos dados estatisticamente pelo teste *T* da Academia Pernambucana de Letras.

		T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Meios)						
		Note: Variables were treated as independent samples						
Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1
MH vs. TSA	101,347	68,5500	1,22468	66	0,225048	34	34	101,462
MH vs. R2	101,347	22,7470	4,25438	66	0,000068	34	34	101,462
MH vs. ROSA B	101,347	2,6558	5,66144	66	0,000000	34	34	101,462
		T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Meios)						
		Note: Variables were treated as independent samples						
Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1
TSA vs. MH	68,5500	101,3471	-1,22468	66	0,225048	34	34	118,6980
TSA vs. R2	68,5500	22,7471	2,15217	66	0,035046	34	34	118,6980
TSA vs. ROSA B	68,5500	2,6559	3,23272	66	0,001915	34	34	118,6980
		T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Meios)						
		Note: Variables were treated as independent samples						
Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1
R2 vs. MH	22,7470	101,347	-4,25438	66	0,000068	34	34	36,2017
R2 vs. TSA	22,7470	68,5500	-2,15217	66	0,035046	34	34	36,2017
R2 vs. ROSA B	22,7470	2,6559	3,19096	66	0,00217	34	34	36,2017

		T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Meios) Note: Variables were treated as independent samples							
Group 1 vs. Group 2		Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1
ROSA B vs.	MH	2,65588	101,347	-5,6614	66	0,00000	34	34	6,1079
ROSA B vs.	TSA	2,65588	68,550	-3,2327	66	0,00191	34	34	6,1079
ROSA B vs.	R2	2,65588	22,747	-3,1909	66	0,00217	34	34	6,1079

		T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Meios) Note: Variables were treated as independent samples							
Group 1 vs. Group 2		Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1
BDA vs.	MH	2,47647	101,347	-5,6800	66	0,00000	34	34	2,67378
BDA vs.	TSA	2,47647	68,550	-3,2449	66	0,00184	34	34	2,67378
BDA vs.	R2	2,47647	22,747	-3,2560	66	0,00178	34	34	2,67378

		T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Meios) Note: Variables were treated as independent samples							
Group 1 vs. Group 2		Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1
MALTE vs.	MH	2,99705	101,347	-5,6487	66	0,00000	34	34	3,47697
MALTE vs.	TSA	2,99705	68,550	-3,2188	66	0,00199	34	34	3,47697
MALTE vs.	R2	2,99705	22,747	-3,1665	66	0,00233	34	34	3,47697

T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Pontos)											
Note: Variables were treated as independent samples											
Group 1 vs. Group 2	Mean Group 1	Mean Group 2	t-value	df	p	Valid N Group 1	Valid N Group 2	Std.Dev. Group 1	Std.Dev. Group 2	F-ratio Variances	p Variances
P1(JEAR) vs. P1(JDAR)	15,98333	132,7000	-1,43376	10	0,182159	6	6	30,8514	197,0015	40,775	0,000939
P1(JEAR) vs. P2(JDAR)	15,98333	121,1500	-1,23821	10	0,243918	6	6	30,8514	205,7455	44,474	0,000761
P1(JEAR) vs. P3(JDAR)	15,98333	70,7333	-0,99604	10	0,342722	6	6	30,8514	131,0608	18,047	0,006480
P1(JEAR) vs. P4(JDBR)	15,98333	54,1333	-1,29146	10	0,225595	6	6	30,8514	65,4516	4,501	0,124358
P1(JEAR) vs. P5(JDBR)	15,98333	19,9667	-0,27206	10	0,791111	6	6	30,8514	18,2871	2,846	0,275659
P1(JEAR) vs. P6(JDBR)	15,98333	22,8500	-0,40734	10	0,692338	6	6	30,8514	27,4439	1,264	0,803550
P1(JEAR) vs. P4(PBM)	15,98333	2,3667	1,07874	10	0,306034	6	6	30,8514	2,0461	227,343	0,000014
P1(JEAR) vs. P5(PBM)	15,98333	4,6167	0,89124	10	0,393737	6	6	30,8514	4,9126	39,439	0,001017
P1(JEAR) vs. P6(PBM)	15,98333	8,0333	0,61736	10	0,550794	6	6	30,8514	6,5689	22,058	0,004060
P1(JEAR) vs. P1(JSR)	15,98333	22,0333	-0,29487	10	0,774123	6	6	30,8514	39,6735	1,654	0,594390
P1(JEAR) vs. P1(JSR)	15,98333	12,9333	0,20538	10	0,841399	6	6	30,8514	19,2735	2,562	0,324954
P1(JEAR) vs. P2(JSR)	15,98333	19,9167	-0,22593	10	0,825804	6	6	30,8514	29,4393	1,098	0,920608
P1(JEAR) vs. P3(JSR)	15,98333	27,1833	-0,60745	10	0,557096	6	6	30,8514	32,9835	1,143	0,886973
P1(JEAR) vs. P1(AR)	15,98333	58,8667	-1,21263	10	0,253139	6	6	30,8514	80,9430	6,883	0,054014
P1(JEAR) vs. P2(AR)	15,98333	90,1000	-1,25973	10	0,236373	6	6	30,8514	140,7757	20,821	0,004647
P1(JEAR) vs. P3(AR)	15,98333	13,4000	0,17027	10	0,868196	6	6	30,8514	20,7215	2,217	0,402801
P2(JEAR) vs. P1(JDAR)	81,58333	132,7000	-0,52499	10	0,611032	6	6	134,4349	197,0015	2,147	0,421402
P2(JEAR) vs. P2(JDAR)	81,58333	121,1500	-0,39434	10	0,701608	6	6	134,4349	205,7455	2,342	0,371840
P2(JEAR) vs. P3(JDAR)	81,58333	70,7333	0,14156	10	0,890242	6	6	134,4349	131,0608	1,052	0,956870
P2(JEAR) vs. P4(JDBR)	81,58333	54,1333	0,44969	10	0,662523	6	6	134,4349	65,4516	4,219	0,140149
P2(JEAR) vs. P5(JDBR)	81,58333	19,9667	1,11245	10	0,291972	6	6	134,4349	18,2871	54,042	0,000474
P2(JEAR) vs. P6(JDBR)	81,58333	22,8500	1,04853	10	0,319074	6	6	134,4349	27,4439	23,996	0,003330
P2(JEAR) vs. P4(PBM)	81,58333	2,3667	1,44321	10	0,179546	6	6	134,4349	2,0461	4316,741	0,000000
P2(JEAR) vs. P5(PBM)	81,58333	4,6167	1,40145	10	0,191345	6	6	134,4349	4,9126	748,861	0,000001
P2(JEAR) vs. P6(PBM)	81,58333	8,0333	1,33853	10	0,210359	6	6	134,4349	6,5689	418,829	0,000003
P2(JEAR) vs. P1(JSR)	81,58333	22,0333	1,04067	10	0,322536	6	6	134,4349	39,6735	11,482	0,018071
P2(JEAR) vs. P1(JSR)	81,58333	12,9333	1,23819	10	0,243927	6	6	134,4349	19,2735	48,652	0,000612
P2(JEAR) vs. P2(JSR)	81,58333	19,9167	1,09760	10	0,298106	6	6	134,4349	29,4393	20,853	0,004630
P2(JEAR) vs. P3(JSR)	81,58333	27,1833	0,96265	10	0,358422	6	6	134,4349	32,9835	16,612	0,007844
P2(JEAR) vs. P1(AR)	81,58333	58,8667	0,35460	10	0,730255	6	6	134,4349	80,9430	2,758	0,289724
P2(JEAR) vs. P2(AR)	81,58333	90,1000	-0,10717	10	0,916772	6	6	134,4349	140,7757	1,097	0,921898
P2(JEAR) vs. P3(AR)	81,58333	13,4000	1,22784	10	0,247623	6	6	134,4349	20,7215	42,090	0,000869
P3(JEAR) vs. P1(JDAR)	14,48333	132,7000	-1,46401	10	0,173907	6	6	17,6809	197,0015	124,146	0,000061

		T-test for Independent Samples (Nova análise Matriz Pontos)									
		Note: Variables were treated as independent samples									
Group 1 vs. Group 2	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	
	Group 1	Group 2				Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Variances	
P1(PAM) vs. P1(JM)	21,15000	8,55000	1,26733	10	0,233753	6	6	19,69018	14,33091	1,89	
P1(PAM) vs. P2(JM)	21,15000	9,48333	0,94536	10	0,366755	6	6	19,69018	22,93664	1,36	
P1(PAM) vs. P3(JM)	21,15000	49,86667	-0,80459	10	0,439766	6	6	19,69018	85,17865	18,71	
P1(PAM) vs. P1(JE)	21,15000	18,13333	0,20440	10	0,842138	6	6	19,69018	30,31763	2,37	
P1(PAM) vs. P2(JE)	21,15000	16,30000	0,30979	10	0,763077	6	6	19,69018	32,90702	2,79	
P1(PAM) vs. P3(JE)	21,15000	43,45000	-1,14260	10	0,279823	6	6	19,69018	43,56314	4,89	
P1(PAM) vs. P4(JE)	21,15000	39,78333	-0,98757	10	0,346658	6	6	19,69018	41,81260	4,51	
P2(PAM) vs. P1(JM)	1,80000	8,55000	-1,14120	10	0,280378	6	6	2,12979	14,33091	45,28	
P2(PAM) vs. P2(JM)	1,80000	9,48333	-0,81702	10	0,432952	6	6	2,12979	22,93664	115,98	
P2(PAM) vs. P3(JM)	1,80000	49,86667	-1,38183	10	0,197113	6	6	2,12979	85,17865	1599,52	
P2(PAM) vs. P1(JE)	1,80000	18,13333	-1,31640	10	0,217414	6	6	2,12979	30,31763	202,64	
P2(PAM) vs. P2(JE)	1,80000	16,30000	-1,07708	10	0,306742	6	6	2,12979	32,90702	238,73	
P2(PAM) vs. P3(JE)	1,80000	43,45000	-2,33912	10	0,041401	6	6	2,12979	43,56314	418,37	
P2(PAM) vs. P4(JE)	1,80000	39,78333	-2,22228	10	0,050499	6	6	2,12979	41,81260	385,43	
P3(PAM) vs. P1(JM)	0,53333	8,55000	-1,36900	10	0,200961	6	6	0,60882	14,33091	554,07	
P3(PAM) vs. P2(JM)	0,53333	9,48333	-0,95547	10	0,361868	6	6	0,60882	22,93664	1419,31	
P3(PAM) vs. P3(JM)	0,53333	49,86667	-1,41865	10	0,186408	6	6	0,60882	85,17865	19573,93	
P3(PAM) vs. P1(JE)	0,53333	18,13333	-1,42169	10	0,185548	6	6	0,60882	30,31763	2479,74	
P3(PAM) vs. P2(JE)	0,53333	16,30000	-1,17342	10	0,267819	6	6	0,60882	32,90702	2921,42	
P3(PAM) vs. P3(JE)	0,53333	43,45000	-2,41290	10	0,036502	6	6	0,60882	43,56314	5119,82	
P3(PAM) vs. P4(JE)	0,53333	39,78333	-2,29912	10	0,044320	6	6	0,60882	41,81260	4716,62	

**Tabela 2.** Análise dos dados estatisticamente pelo teste *T* do Convento Franciscano de Olinda.

		T-test for Independent Samples (CONVENTO Nova análise Matriz Meios)									
		Note: Variables were treated as independent samples									
Group 1 vs. Group 2	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	Group 1	Group 2				Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Variances	Variances
TSA vs. R2	229,0833	147,6250	1,844623	46	0,071536	24	24	149,7769	156,1053	1,09	0,844378
TSA vs. MALTE	229,0833	1,0278	7,459095	46	0,000000	24	24	149,7769	1,2469	14428,76	0,000000
TSA vs. ROSA B	229,0833	0,8611	7,464597	46	0,000000	24	24	149,7769	1,1290	17600,72	0,000000

		T-test for Independent Samples (CONVENTO Nova análise Matriz Meios)									
		Note: Variables were treated as independent samples									
Group 1 vs. Group 2	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	Group 1	Group 2				Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Variances	Variances
R2 vs. TSA	147,6250	229,0833	-1,844623	46	0,071536	24	24	156,1053	149,7769	1,09	0,844378
R2 vs. MALTE	147,6250	1,0278	4,600454	46	0,000033	24	24	156,1053	1,2469	15673,80	0,000000
R2 vs. ROSA B	147,6250	0,8611	4,605704	46	0,000033	24	24	156,1053	1,1290	19119,47	0,000000

		T-test for Independent Samples (CONVENTO Nova análise Matriz Meios)									
		Note: Variables were treated as independent samples									
Group 1 vs. Group 2	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	Group 1	Group 2				Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Variances	Variances
MALTE vs. TSA	1,027778	229,0833	-7,459104	46	0,000000	24	24	1,246896	149,7769	14428,76	0,000000
MALTE vs. R2	1,027778	147,6250	-4,600454	46	0,000033	24	24	1,246896	156,1053	15673,80	0,000000
MALTE vs. ROSA B	1,027778	0,8611	0,485423	46	0,629685	24	24	1,246896	1,1290	1,22	0,430000

		T-test for Independent Samples (CONVENTO Nova análise Matriz Meios)									
		Note: Variables were treated as independent samples									
Group 1 vs. Group 2	Mean	Mean	t-value	df	p	Valid N	Valid N	Std.Dev.	Std.Dev.	F-ratio	p
	Group 1	Group 2				Group 1	Group 2	Group 1	Group 2	Variances	Variances
ROSA B vs. TSA	0,861111	229,0833	-7,464604	46	0,000000	24	24	1,128963	149,7769	17600,72	0,000000
ROSA B vs. R2	0,861111	147,6250	-4,605704	46	0,000033	24	24	1,128963	156,1053	19119,47	0,000000
ROSA B vs. MALTE	0,861111	1,0278	-0,485423	46	0,629685	24	24	1,128963	1,2469	1,22	0,430000