



**UFBA É UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE ARQUITETURA**  
**PPG-AU É PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ARQUITETURA E URBANISMO**

**ADRIANO BRAGA DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO BIOLÓGICA E APLICAÇÃO DE BIOCIDAS NA  
POPULAÇÃO MICROBIANA QUE FORMA OS BIOFILMES DE ALGUNS  
MONUMENTOS HISTÓRICOS DA BAHIA**

**SALVADOR-BAHIA**

**2011**

**ADRIANO BRAGA DOS SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO BIOLÓGICA E APLICAÇÃO DE BIOCIDAS NA  
POPULAÇÃO MICROBIANA QUE FORMA OS BIOFILMES DE  
ALGUNS MONUMENTOS HISTÓRICOS DA BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Arquitetura e Urbanismo da Faculdade de Arquitetura da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de mestre em Arquitetura e Urbanismo.

Orientador: Prof. Dr. Mário Mendonça de Oliveira  
Co-orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto

SALVADOR-BAHIA  
2011

Faculdade de Arquitetura da UFBA - Biblioteca

S237 Santos, Adriano Braga dos.  
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. : il.

Orientadora: Prof. Dr. Mário Mendonça de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Arquitetura, 2011.

1. Edifícios históricos - Conservação e restauração - Bahia. 2. Conventos . Biodegradação. I. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Arquitetura. II. Oliveira, Mário Mendonça. III. Título.

CDU: 72.025

ADRIANO BRAGA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO BIOLÓGICA E APLICAÇÃO DE BIOCIDAS NA  
POPULAÇÃO MICROBIANA QUE FORMA OS BIOFILMES DE  
ALGUNS MONUMENTOS HISTÓRICOS DA BAHIA**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Arquitetura e Urbanismo,  
Faculdade de Arquitetura da Universidade Federal da Bahia.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Mário Mendonça de Oliveira - UFBA  
(Presidente/Orientador)

---

Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto . UEFS

---

Prof. Dr. Lazaro Benedito da Silva- UFBA

Salvador, 04 de agosto de 2011

Aos meus pais (in memoriam), pelas oportunidades de aprendizado nos momentos difíceis da vida. A Alessandra Argôlo Espírito Santo, pela inserção e contribuição na minha formação no universo da pesquisa e da docência.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar força para enfrentar todos os momentos difíceis da minha vida.

A meu filho João Miguel e meus irmãos: Flávio, Fábio, Fernando e Tarciano pelas palavras, gestos de carinho, incentivo e presença na minha vida.

Agradeço ao prof. Mário Mendonça de Oliveira pela simplicidade e, por ter me dado à oportunidade e confiança de ingressar neste trabalho interdisciplinar.

Ao meu Co-Orientador, o prof. Aristóteles Góes Neto pelo seu idealismo acadêmico, as sugestões e acolhimento nas pesquisas da Biologia Molecular.

A equipe de pesquisas Biotecnológicas do LAPEM e LAMOL da UEFS (Paulo Ricardo, Bruno Andrade e Catiane) pelo acolhimento e contribuições.

Agradeço à Bióloga, Daiana Lima pelo apoio e a parceria entre a UNIME e a UFBA.

Ao amigo Claudio Ressureição pela energia e incentivo na seleção do mestrado.

Ao professor José Dirson Argôlo pela gentileza e parceria profissional.

Aos meus amigos de luta da EMBASA pela proatividade e apoio nas dificuldades.

A George da ETA e Angela da UFBA, grato pelas dicas na formatação do trabalho.

A Ulisses Viterbo pelo apoio incansável nas coletas em Cairu-BA, mesmo após enfrentarmos uma madrugada exausta de trabalho de turno na Embasa.

Ao Programa de Pós Graduação da FAUFBA, seus funcionários, coordenação e professores pela assistência e acolhimento (Silvandira, Telmo e outros).

A Gilson Carvalho, professor Biólogo da UFBA pela ajuda na Bioestatística.

A Microbiologia da UNIME pelo suporte durante a metodologia (Andréa e Aidê).

Ao pessoal do NTPR da UFBA que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado João Dannemann, Rosinaldo, LG, Carla, Flávia, Isadora, Ana, Verônica, Andrea, Aníbal, Sérgio, Erwic, Angela, Iara Chamusca e Luciene.

**O meu sincero obrigado.**

Defender o nosso patrimônio histórico e artístico é alfabetização+

Mario de Andrade.

## RESUMO

Este trabalho visa a caracterização biológica e a aplicação de biocidas na população microbiana presente nos biofilmes encontrados em diferentes substratos em processo de biodeterioração nos monumentos históricos da Bahia, conventos franciscanos: de Salvador, de Santo Antônio de São Francisco do Conde e de Santo Antônio de Cairu, relacionando-os a fatores ambientais. As amostras foram submetidas a análises microbiológicas quantitativas e qualitativas, análises moleculares, além da determinação de temperatura, umidade relativa e luminosidade dos ambientes. Após 30 dias de aplicação dos biocidas, foi realizada nova avaliação microbiológica para verificar a ação dos biocidas. Os fungos presentes cultiváveis e isolados, por métodos tradicionais, no convento de Cairu, são caracterizados pelos gêneros: *Aspergillus* sp1, *Aspergillus* sp2, *Paecilomyces* sp1, *Paecilomyces* sp2, *Penicillium* sp1, *Phialophora* sp1 e *Rhizopus* sp. A microbiota fúngica cultivável, identificada por técnicas moleculares presentes no convento de Salvador, é das espécies: *Aspergillus aculeatus* e *Cunninghamella blakesleeana*. Os fungos identificados no convento do Conde pertencem às espécies: *Aspergillus aculeatus* e *Trichoderma longibrachiatum*. Esses micro-organismos presentes nos biofilmes, associados a fatores ambientais, podem influenciar os processos de biodeterioração. Os índices de temperatura, umidade e luminosidade favoreceram o crescimento de bactérias e fungos. A partir dos resultados obtidos, podemos sugerir a concentração de 0,5% do biocida de Cobre e Zinco, o melhor entre os aplicados *in loco*, pois apresenta toxicidade mediana ao ser humano, possui eficácia equivalente aos demais biocidas testados na redução dos micro-organismos avaliados, além de menor custo. Entretanto, por mais que se obtenha o efeito residual, a proliferação para ser controlada é necessária à manutenção preventiva dos edifícios históricos por parte das autoridades e dos usuários. Este trabalho possibilitou o conhecimento acerca da ocorrência de micro-organismos relacionados à biodeterioração dos edifícios, para auxiliar os restauradores na escolha de agentes de controle adequados à preservação do patrimônio histórico e do meio ambiente.

**Palavras-chave:** Biodeterioração. Monumentos Históricos. Biofilme. Biocidas e Preservação.



## ABSTRACT

This work is in biological characterization and application of biocides in the microorganisms found in biofilms on different substrates in the process of biodeterioration that constitute the historical monuments of Bahia: Franciscan Convent in Salvador, a Franciscan St. Anthony of San Francisco of Conde and Franciscan St. Anthony of Cairu, relating them to environmental factors. The samples were submitted to microbiological analysis of quantitative and qualitative bacteria and fungi by classical taxonomy for fungi, molecular analysis for fungi, and determination of temperature, relative humidity and light. In the most contaminated with fungi and bacteria were applied in situ, the 1:1 mixture of the biocide alternative (with Copper Sulphate Zinc Sulphate) in order to assess their effectiveness in combating microorganisms in the biofilm compared with traditional biocides (Thymol and Preventol BP) used in the Conservation and Restoration. After 30 days of application of biocides a new microbiological evaluation was performed to verify the action of biocides. The present cultivable fungi and isolated by traditional methods in the convent of Cairu, are characterized by genera: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Phialophora* and *Rizhopus*. The culturable fungal microflora, identified by molecular techniques present in the Convent of the Salvador, is the species: *Aspergillus aculeatus* and *Cunninghamella blakesleeana*. The fungi identified in the convent the Conde to the species: *Aspergillus aculeatus* and *Trichoderma longibachiatum*. These microorganisms present in biofilm associated with environmental factors can influence the processes of biodeterioration. The rates of temperature, humidity and light favored the growth of bacteria and fungi. From the results, we suggest the 0.5% concentration of the biocide of copper and zinc, applied among the best spot, because it presents the median toxicity to humans, has equivalent efficacy to other biocides tested in the reduction of microorganisms evaluated, and lower cost. But, as to obtain residual effect, the proliferation to be controlled is required preventative maintenance of historic buildings by public authorities and users. This study gave insight into the occurrence of microorganisms related to the biodeterioration of buildings, to assist conservators in selecting appropriate control agents for the preservation of historical heritage and the environment.

**KEYWORDS:** Biodeterioration, Monuments Historics, Biofilms, Biocides and Preservation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Edificação do Engenho da Freguesia em Cabôto-BA atacada por diversos tipos de biodeteriorações.....	32
Figura 2- Biodeterioração estética em edificação. Cairu-BA.....	33
Figura 3 - Localização dos municípios de Salvador, São Francisco do Conde e Cairu na Bahia. Escala:1/3500.....	52
Figura 4 - Fachada da igreja de São Francisco (1ª ordem) de Salvador-BA.....	53
Figura 5 - Mapa da Localização geográfica do convento de São Francisco de Salvador-BA .....	54
Figura 6 - Convento franciscano de Santo Antônio de Cairu, BA.....	55
Figura 7- Fachada da igreja do convento franciscano de Santo Antonio (1ª ordem) de São Francisco do Conde-BA.....	56
Figura 8 - Equipamentos usados nas análises ambientais dos conventos: Luxímetro digital, termohigrômetro, GPS e termômetro de infravermelho.....	57
Figura 9 - Raspagem superficial do biofilme, realizada nos conventos de Salvador (A) e de São Francisco do Conde-BA (B) em 29 e 30/03/2010.....	58
Figura 10 - Procedimento de coleta das amostras no interior (A) e exterior do convento (B) franciscano de Santo Antônio de Cairu, BA.....	59
Figura 11 - Preparo de amostras (A e B) para ensaios microbiológicos.....	60
Figura 12 - Procedimento para inoculação dos meios de cultura (A e B).....	61
Figura 13 - Verificação das unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias totais no laboratório de Microbiologia da UNIME (A e B).....	61
Figura 14 - Cultura de fungo repicada no laboratório da UNIME.....	62
Figura 15 - Realização da técnica de microcultivo.....	63
Figura 16 - Fungos sendo preservados e água destilada (A e B).....	65

Figura 17- Amostras sendo maceradas (A e B) para extração do DNA no LAPEM da UEFS.....	66
Figura 18 - Amostras (A e B) sendo centrifugadas durante a extração do DNA no LAPEM da UEFS.....	66
Figura 19 - Amostras (A e B) após purificação do DNA no LAPEM da UEFS.....	67
Figura 20 . Amostras sendo submetidas a diversos ciclos na análise de PCR.....	68
Figura 21 - Amostras submetidas à eletroforese no LAPEM da UEFS.....	69
Figura 22 - Produtos do PCR para sequenciamento do material fúngico extraído....	70
Figura 23 - Produtos do PCR sendo processados em sequenciador automático.....	71
Figura 24 - Biocidas aplicados (A e B) na área externa do claustro superior do convento de São Francisco de Salvador-BA.....	73
Figura 25 - Biocidas aplicados (A e B) na área interna do claustro superior do convento de São Francisco de Salvador-BA.....	73
Figura 26 - Biocidas aplicados (A e B) na área interna da biblioteca do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA.....	73
Figura 27 - Biocidas aplicados (A e B) na área externa da sala de estudos do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA.....	74
Figura 28 - Biocidas aplicados (A e B) na área interna da chaminé da cozinha do convento franciscano de Cairu-BA.....	74
Figura 29 - Biocidas aplicados (A e B) na área externa do claustro inferior do convento franciscano de Cairu-BA.....	74
Figura 30 - Coletas das amostras após 30 dias de aplicação dos biocidas na área interna da chaminé (A) e externa do claustro inferior (B) do convento franciscano de Cairu-BA.....	75

Figura 31 - Coletas das amostras após 30 dias de aplicação dos biocidas na área interna da biblioteca (A) e externa da sala de estudos (B) do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA.....	75
Figura 32 - Coletas das amostras dos substratos após 30 dias de aplicação dos biocidas na área interna (A) e externa (B) do claustro superior do convento de São Francisco de Salvador-BA.....	76
Figura 33 - Gráfico da análise canônica de correspondência realizada entre as variáveis ambientais e os gêneros de fungos identificados no convento franciscano de Cairu-BA.....	82
Figura 34 - Gráfico da análise canônica de correspondência realizada entre os tipos de substratos e os gêneros de fungos identificados no convento franciscano de Cairu-BA.....	82
Figura 35 - <i>Aspergillus</i> sp1. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	83
Figura 36 - <i>Aspergillus</i> sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	84
Figura 37 - <i>Phialophora</i> sp. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios.....	85
Figura 38 - <i>Paecilomyces</i> sp1. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios.....	85
Figura 39 - <i>Paecilomyces</i> sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios.....	86
Figura 40 - <i>Penicillium</i> sp. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios.....	87
Figura 41 - <i>Rhizopus</i> sp. A . Aspecto macroscópico da colônia. B . Esporangióforo e esporangiósporos. C . Hifas não septadas.....	87

Figura 42 - Indeterminado. A . Aspecto macroscópico da colônia. B . Aspecto microscópico.....	88
Figura 43 - Gráfico da abundância dos fungos verificados no claustro inferior externo do convento de São Francisco de Cairu-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	89
Figura 44 - Gráfico da abundância dos fungos verificados na chaminé da cozinha (interna) do convento de São Francisco de Cairu-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	90
Figura 45 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e 30 dias de tratamento (B) na área externa do claustro do convento de Santo Antônio de Cairu-BA.....	90
Figura 46 - Gráfico da abundância de bactérias (UFC/g) por locais de coleta do convento de São Franciscano de Salvador- BA.....	95
Figura 47 - Gráfico da abundância de fungos (UFC/g) por locais de coleta do convento de São Francisco de Salvador-BA.....	95
Figura 48 - <i>Aspergillus</i> sp3. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	96
Figura 49 - <i>Aspergillus</i> sp4. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	97
Figura 50 - <i>Aspergillus</i> sp5. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	98
Figura 51 - <i>Penicillium</i> sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	99
Figura 52 - <i>Penicillium</i> sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	100
Figura 53 - Avaliação da qualidade do DNA dos fungos do convento de São Francisco de Salvador-BA no LAMOL da UEFS.....	101

Figura 54 - Determinação da PCR dos fungos do convento de São Francisco de Salvador-BA no LAMOL.....	101
Figura 55 - Determinação da PCR dos fungos do convento franciscano de Salvador - BA, após limpeza e purificação.....	102
Figura 56 - Gráfico da abundância das bactérias verificadas no claustro superior (região interna) do convento de São Francisco de Salvador-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	103
Figura 57 - Gráfico da abundância as bactérias verificadas no claustro superior (região externa) do convento franciscano de Salvador-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas .....	103
Figura 58 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e após 30 dias de tratamento (B) na área externa do claustro superior do convento franciscano de Salvador-BA.....	104
Figura 59 - Gráfico da abundância dos fungos verificados no claustro superior (região interna) do convento de São Franciscano de Salvador-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	105
Figura 60 - Gráfico da abundância dos fungos verificados no claustro superior (região externa) do convento de São Francisco de Salvador-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	105
Figura 61 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e após 30 dias de aplicação de tratamento (B) na área externa do claustro superior do convento franciscano de Salvador-BA.....	106
Figura 62 - Gráfico da abundância de fungos (UFC/g) por locais de coleta do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA.....	110
Figura 63 - Gráfico da abundância de bactérias (UFC/g) por locais de coleta do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA.....	110
Figura 64 - <i>Aspergillus</i> sp6. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	111

Figura 65 - <i>Penicillium</i> sp4. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios.....	112
Figura 66 - <i>Phialophora</i> sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios.....	112
Figura 67 - Avaliação da qualidade do DNA dos fungos do convento de São Francisco do Conde-BA no LAMOL da UEFS.....	113
Figura 68 - Determinação da PCR dos fungos do convento de São Francisco de Conde-BA no LAMOL.....	113
Figura 69 - Gráfico da abundância das bactérias verificadas na biblioteca interna do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	115
Figura 70 - Gráfico da abundância das bactérias verificadas na região externa da sala de estudos do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	115
Figura 71 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e após 30 dias de tratamento (B) na área interna da biblioteca do convento de São Francisco do Conde-BA.....	116
Figura 72 - Gráfico da abundância dos fungos verificados na biblioteca interna do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	117
Figura 73 - Gráfico da abundância dos fungos verificados na região externa da sala de estudos do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas.....	117

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diagnose visual e principais características verificadas nos locais de coleta situados no exterior do convento franciscano de Cairu-BA.....	78
Quadro 2 - Diagnose visual e principais características verificadas nos locais de coleta situados no interior do convento franciscano de Cairu-BA.....	79
Quadro 3 - Dados integrados com parâmetros ambientais das áreas externas do convento franciscano de Cairu-BA .....	81
Quadro 4 - Dados integrados com parâmetros ambientais das áreas internas do convento franciscano de Cairu-BA .....	81
Quadro 5 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para fungos verificados no claustro inferior externo e parede interna da chaminé do convento franciscano de Cairu-BA.....	89
Quadro 6 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região interna do convento de São Francisco de Salvador-BA, em 29/03/2010.....	91
Quadro 7 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região externa do convento de São Francisco de Salvador-BA, em 29/03/2010.....	92
Quadro 8 - Dados integrados com parâmetros ambientais das áreas externas do convento de São Francisco de Salvador, em 29/03/2010.....	94
Quadro 9 - Dados integrados com parâmetros ambientais das áreas internas do convento de São Francisco de Salvador, em 29/03/2010.....	94
Quadro 10 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para bactérias verificadas no claustro superior (região interna e externa) do convento de São Francisco de Salvador-BA.....	102
Quadro 11 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para fungos verificados no claustro superior (região interna e externa) do convento de São Francisco de Salvador-BA.....	104



Quadro 12 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região interna do convento de franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010.....	107
Quadro 13 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região externa do convento de franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010.....	108
Quadro 14 - Dados integrados com parâmetros ambientais das áreas externas do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010.....	109
Quadro 15 - Dados integrados com parâmetros ambientais das áreas internas do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010.....	109
Quadro 16 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para bactérias verificadas na biblioteca e sala de estudos (região interna e externa) do convento de franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA.....	114
Quadro 17 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para fungos verificados na biblioteca e sala de estudos (região interna e externa) do convento franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ACC	Análise canônica de correspondência
BA	Bahia
C.A.	Certificado de Análise
CAR	Companhia de Desenvolvimento e Ação Regional
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	Timol
C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> ClO	Preventol BP
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de Cobre
DDGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAUFBA	Faculdade de Arquitetura da Universidade Federal da Bahia
FAS	Faculdade de Ciências Agrárias e da Saúde
g	Gramma
GPS	<i>Global Position System</i>
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
IPAC	Instituto do Patrimônio Artístico e Cultural
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico Artístico Nacional
Kg	Kilograma
LAPEM	Laboratório de pesquisa em microbiologia
LAVIET	Laboratório de Alternativas Viáveis a Impactos em Ecossistemas Terrestres
LD50	Dose letal para exterminar 50% da população dos organismos vivos
LUX	Unidade de iluminância
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mg	miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar

Mol	Molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTPR	Núcleo de Tecnologia da Preservação e da Restauração
O <sub>2</sub>	Gás Oxigênio
PCA	<i>Plate Count Ágar</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PETROBRAS	Petróleo Brasileiro S.A.
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de Vinila
PVPP	Polímero polivinilpolipirrolidona
RNAr	Ácido ribonucléico ribossomal
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultra Violeta
UNIME	União Metropolitana para o Desenvolvimento da Educação e Cultura
°C	Grau Celsius
μl	Micro litro
μS.cm	Microsiemens por centímetro

# SUMÁRIO

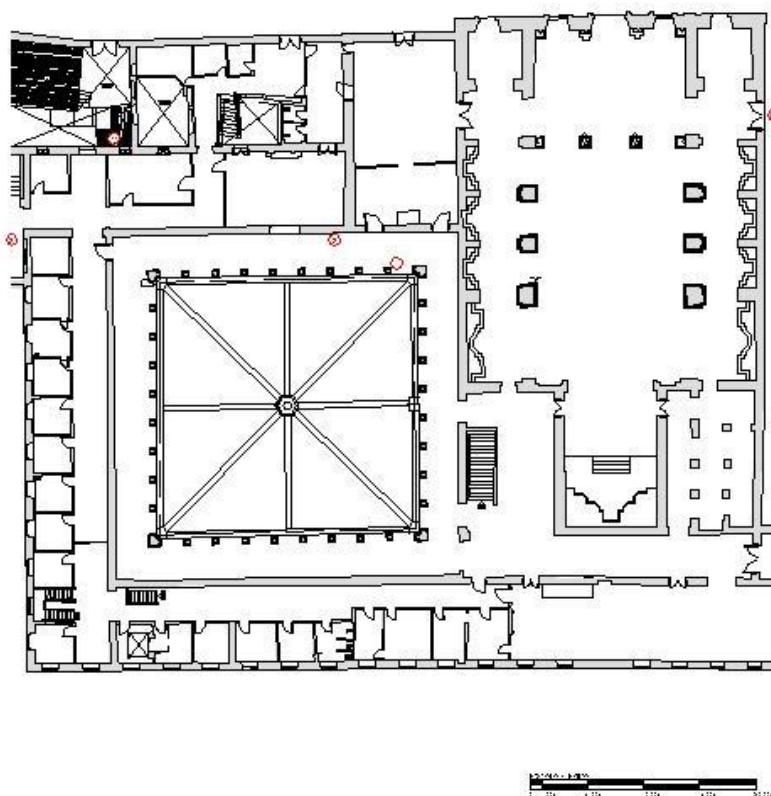
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>31</b>
4.1 BIODETERIORAÇÃO DE MONUMENTOS.....	31
4.2 PRINCIPAIS FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODETERIORAÇÃO .....	33
4.2.1 Água.....	34
4.2.2 Nutrientes.....	34
4.2.3 Carbono.....	35
...	
4.2.4 Temperatura e Umidade.....	35
4.2.5 Luminosidade.....	35
4.2.6 Outros Fatores.....	36
4.3 OS BIOFILMES.....	37
4.4 MICRO-ORGANISMOS QUE COMPÕEM O BIOFILME E SEU PAPEL NA BIODETERIORAÇÃO.....	38
4.4.1 Bactérias.....	39
4.4.2 Micro-organismos fotossintetizante.....	40
4.4.3 Fungos.....	42
4.5 TÉCNICAS EMPREGADAS PARA OS ESTUDOS ACERCA DA BIODETERIORAÇÃO .....	45
4.6 O USO DE BIOCIDAS.....	47
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>52</b>
5.1 ÀREA DE ESTUDO.....	52
5.2 DIAGNÓSTICO VISUAL, ANÁLISES AMBIENTAIS E COLETAS DAS AMOSTRA .....	56
5.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS QUANTITATIVAS.....	60
5.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA QUALITATIVA DOS FUNGOS.....	62

5.5 ANÁLISE MOLECULAR DOS FUNGOS.....	65
5.5.1 Extração e purificação do DNA.....	65
5.5.2 Amplificação do DNA.....	68
5.5.3 Sequenciamento do DNA.....	70
5.5.4 Identificação das espécies dos micro-organismos .....	71
5.6 APLICAÇÃO DOS BIOCIDAS NOS CONVENTOS .....	72
5.7 COLETAS DAS AMOSTRAS APÓS APLICAÇÃO DOS BIOCIDAS.....	75
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>78</b>
6.1 CONVENTO FRANCISCANO DE CAIRU .....	78
6.1.1 Diagnose visual dos locais das coletas .....	78
6.1.2 Influência das condições ambientais na microbiota fúngica .....	81
6.1.3 Descrição dos morfotipos isolados .....	83
6.1.4 Resultados dos fungos após aplicação dos biocidas .....	88
6.2 CONVENTO DE SÃO FRANCISCO DE SALVADOR.....	91
6.2.1 Diagnose visual dos locais das coletas .....	91
6.2.2 Influência das condições ambientais na microbiota do biofilme .....	94
6.2.3 Descrição dos morfotipos isolados .....	95
6.2.4 Identificação molecular dos fungos presentes no biofilme .....	100
6.2.5 Resultados das bactérias e fungos após aplicação dos biocidas.....	102
6.3 CONVENTO FRANCISCANO DE SÃO FRANCISCO DO CONDE .....	107
6.3.1 Diagnose visual dos locais das coletas .....	107
6.3.2 Influência das condições ambientais na microbiota fúngica .....	109
6.3.3 Descrição dos morfotipos isolados .....	110
6.3.4 Identificação molecular dos fungos presentes no biofilme .....	113
6.3.5 Resultados das bactérias e fungos após aplicação dos biocidas.....	114
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>118</b>
7.1 Convento Franciscano de Santo Antônio de Cairu .....	118
7.2 Convento de São Francisco de Salvador .....	125
7.3 Convento Franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde .....	131

<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>138</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>141</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>147</b>

## **ANEXOS**

**ANEXO A - Planta do pavimento térreo do convento de São Francisco de Salvador - 2010.**

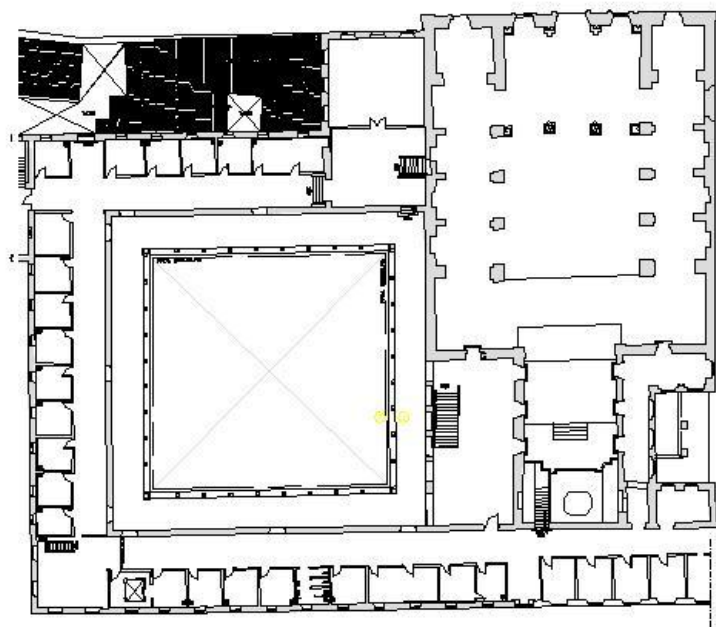


**LEGENDA:**

	ÁREA INTERNA	ÁREA EXTERNA
<p>(N) LOCAIS DE COLETA</p> <p>(N) LOCAIS DE APLICAÇÃO DOS BIOCIDAS</p>	<p>(8) PRAÇA DA ALEGRIA</p>	<p>(1) COLUNA DO CLAUSTRO</p> <p>(2) CANTARIA DO CLAUSTRO</p> <p>(9) TELHADO DE ACESSO A S. DO CAPÍTULO</p> <p>(10) PORTA DE ACESSO A 3º ORDEM</p>





**ANEXO A - Planta do primeiro pavimento do  
convento de São Francisco de Salvador - 2010.**




**LEGENDA:**

**ÁREA INTERNA / EXTERNA**

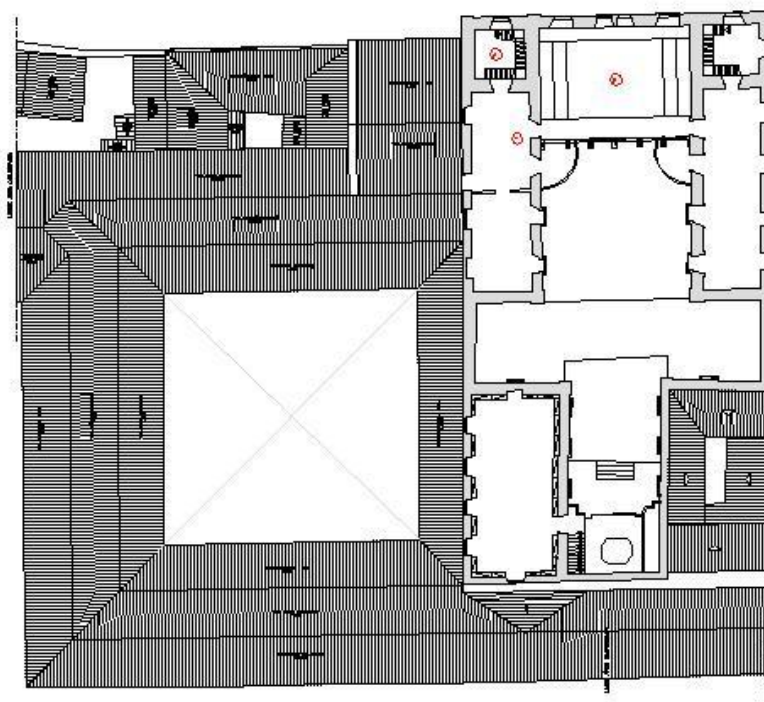
 LOCAIS DE COLETA

 LOCAIS DE APLICAÇÃO  
DOS BIOCIDAS

 CLAUSTRO SUPERIOR  
face interna

 CLAUSTRO SUPERIOR  
face externa

**ANEXO A - Planta do segundo pavimento do convento de São Francisco de Salvador - 2010.**



0 100 200 300 400 500

**LEGENDA:**

**ÁREA INTERNA**

Ⓝ LOCAIS DE COLETA

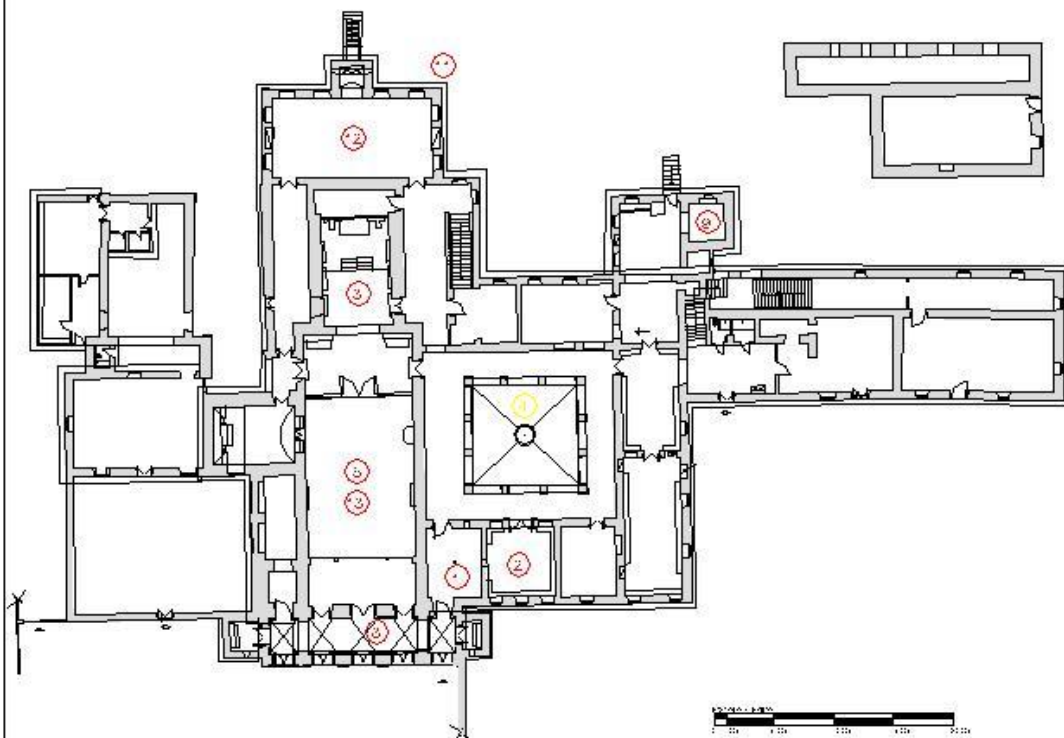
Ⓜ LOCAIS DE APLICAÇÃO  
DOS BIOCIDAS

⑤ TORRE SINEIRA

⑥ SALA DO CORO

⑦ SALÃO ANTERIOR AO CORO

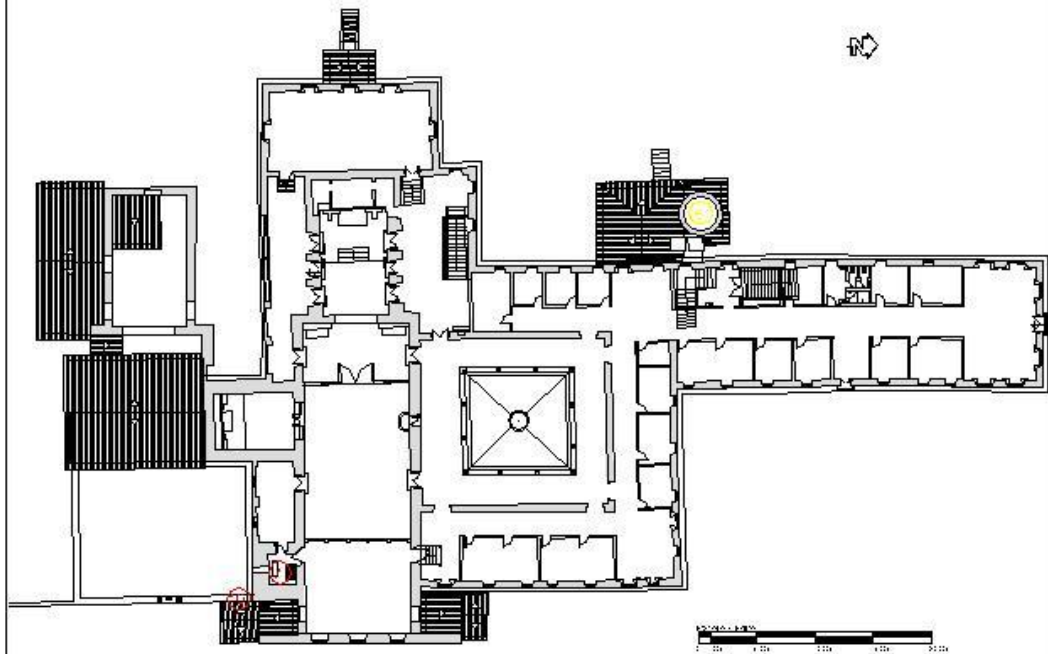
**ANEXO B** - Planta do pavimento térreo do convento de Santo Antônio de Cairu - 2010.



**LEGENDA:**

	ÁREA INTERNA	ÁREA EXTERNA
<p>(N) LOCAIS DE COLETA</p> <p>(N) LOCAIS DE APLICAÇÃO DOS BIOCIDAS</p>	<p>(1) PORTARIA</p> <p>(2) SALA DO CAPÍTULO</p> <p>(3) CAPELA-MOR</p> <p>(6) NAVE</p> <p>(12) SACRISTIA</p> <p>(13) FORRO DE MADEIRA DA NAVE</p>	<p>(4) CLAUSTRO</p> <p>(8) GALILÉ</p> <p>(9) COZINHA</p> <p>(11) PAREDE DA SACRISTIA</p>

**ANEXO B** - Planta do pavimento superior do convento de Santo Antônio de Cairu - 2010.



**LEGENDA:**

- (N) LOCAIS DE COLETA
- (N) LOCAIS DE APLICAÇÃO DOS BIOCIDAS

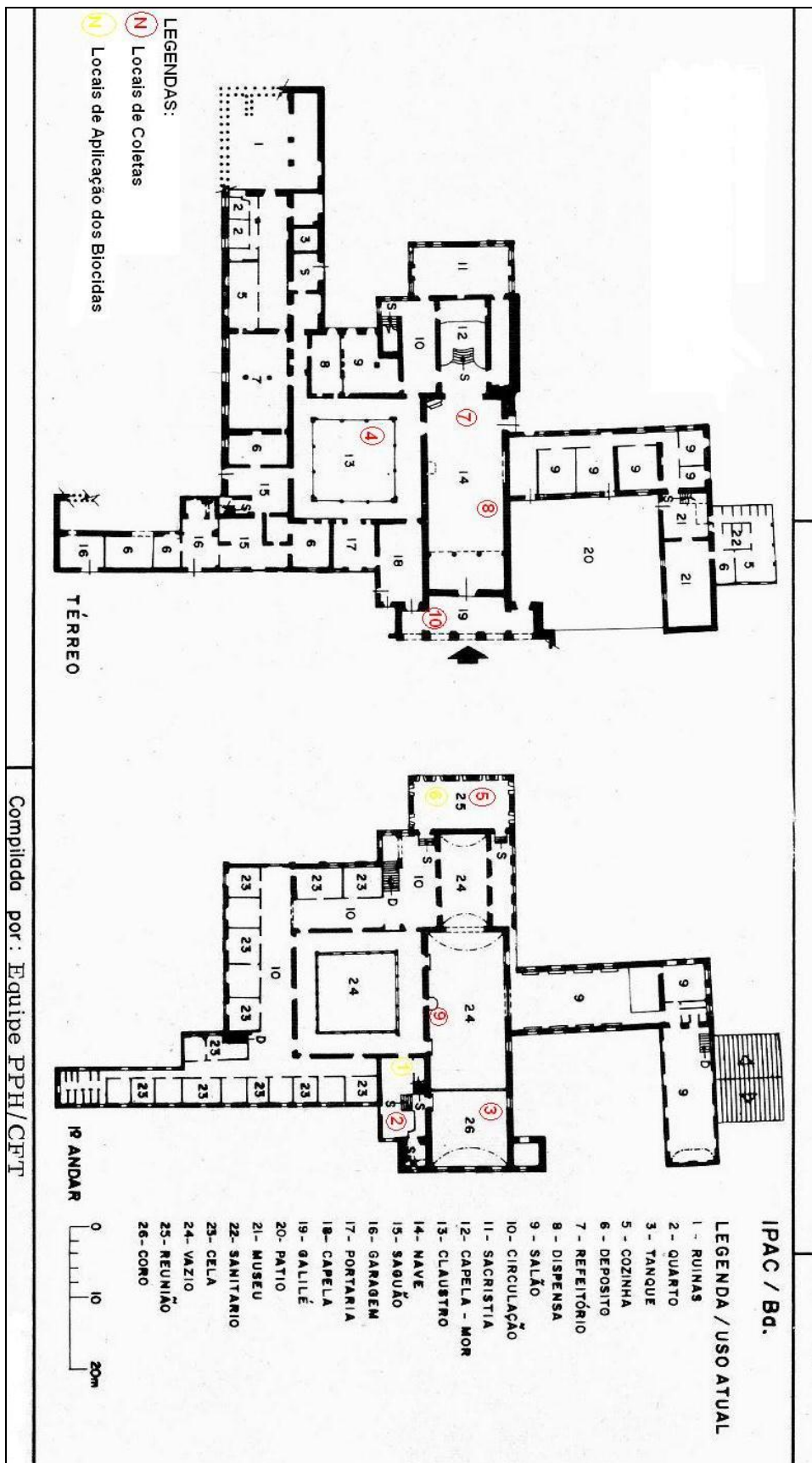
**ÁREA INTERNA**

- (5) CHAMINÉ

**ÁREA EXTERNA**

- (7) TORRE
- (10) PINÁCULOS DA TORRE

**ANEXO C- Planta do pavimento inferior e superior do convento Franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA . 1978**



## ANEXO D **Sequências no GENBANK dos fungos filamentosos do convento de São Francisco de Salvador-BA.**

Msp 1.1 = *Aspergillus aculeatus*

GAAGTAAAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCTGG  
GTCCTTCGGGGCCCAACCTCCCACCCGTGCTTACCGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTT  
CGGGCGGCCCGGGGCTGCCCCGGGACCGCGCCCGCGGAGACCCCAATGGAACACTGTCT  
GAAAGCGTGCAGTCTGAGTTCGATTGATACCAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTGGTT  
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA  
TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT  
TTCTCCCCTCCAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCCGCGCCCCCGGGGGCGGGCCCTCGAGAGAAA  
CGGCGGCACCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACCCGCTCTATGGGCCCGGCCGG  
GGCTTGCCTCGACCCCAATCTTCTCAGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCT  
AAGCATATCAATA

Msp 4.0 = *Penicillium griseofulvum* ou *Penicillium citrinum*

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGC  
CCCTCGGGGCCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCGCGC  
CCGCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTAA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAA  
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCG  
GAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGGTC  
CCCCCGCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTA  
TGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCAACCTTTAATTAT  
CTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA

Msp 5.5 = *Cunninghamella blakesleeana*

AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTTATTTATTGAGAAAGAGAGTCTTCTCTCT  
CTCTCTCTCAATTAATAAATCATCCCAGTGTGGGAAATGTCTTTCAATTAACGCTTGTGCCTGGTA  
TAGTCTAGTGCTACCACTTGAGTTTATCTTTTAGTCAATGGACTTTTAGATAGTGCTTTTTTCTTG  
GAAGATAGCACCTCTTGTAAGGGGATAAGATTTTATTTTATTATACTTTTTTTTTTAACTGAAC  
TGATAGACCATAAAATCTATGGTTGTTTTTATTATAAAAAAATTAATAAACAACCTTCAGCAATGGAT  
CTCTCGGCTTTCGTATCGATGAAGAACGCAGCAAATCGCGATATGTAATGTGATCTGCCTATAGT  
GAATCATCAAATCTTTGAACGCATCTTGCACCTTATGGCATTCCATAAGGTACGTCTGTTTCAGTA  
CCACTAATAAATCTCCCTCCTCCATCTTTGTTGATGATAGGATAAAAAAAGGAGATAAATCATT  
CTGGTTCTGGTGATTTTTGAATTTTTTTTTTATAAAAAAATCAAGAATTGCTCTCAACCTAAATATA  
AGGCTAGACTTGAAAGGTTTATTCTTTCTTGGTCCGCTTTGGTAGAATTTATTCTATGAAAGGTTTA  
TAGCCATTTATTTTTTTCAAATCTGGCCTAAATCAGGATGATGC

Msp 5.7 = *Penicillium griseofulvum* ou *Penicillium citrinum*

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGG  
CCCCTCGGGGCCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCGCGC  
CCCGCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGTTA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTA  
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC  
GGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGGTC  
CCCCCGCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGT  
ATGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACCCCAACCTTTAATTA  
TCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAA

## ANEXO E Ë Sequências no GENBANK dos fungos filamentosos do convento de São Francisco do Conde-BA

### Msp 1.2 = *Aspergillus aculeatus*

TCGTAACAAGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCTGGGTCTTCGGG  
GCCCAACCTCCCACCCGTGCTTACCGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTCGGGCGGCC  
CGGGGCCTGCCCCGGGACCGCGCCCGCGGAGACCCCAATGGAACACTGTCTGAAAGCGTG  
CAGTCTGAGTCGATTGATACCAATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGTTCCGGCATCG  
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT  
GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTCCCCTC  
CAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCCGCGCCCCCGGGGGCGGGCCTCGAGAGAAACGGCGGCAC  
CGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTACCCGCTCTATGGGCCCGGCCGGGGCTTGCCT  
CGACCCCAATCTTCTCAGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC  
AATAAACGGAGGA

### Msp 2.1 = *Penicillium griseofulvum* ou *Penicillium citrinum*

GAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGG  
GCCCTCGGGGCCAACCTCCCACCCGTGTTGCCCGAACCTATGTTGCCTCGGCGGGCCCCCG  
GCCCGCCGACGGCCCCCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGACCTATAACGAAATTAGT  
TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC  
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTC  
CGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCG  
TCCCCCGCCGGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCCGCTCCGGTCTCGAGCG  
TATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTAGTAGGCCCGGCCGCGCCAGCCGACCCCAACCTTTAATT  
ATCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

### Msp 2.2 = *Trichoderma longibrachiatum*

TCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC  
CCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGGTCGCAGCC  
CCGGATCCCATGGCGCCCCGCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTC  
CCGTGCGGGCTCTGTTTTATTTTGTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAA  
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC  
AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCG  
CGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCGGAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTC  
TCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGCCACAGCCGTAAAACACCC  
CAAATTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG  
ACGG

## 1 INTRODUÇÃO

Os monumentos históricos representam, em grande parte, a herança cultural da humanidade. São momentos sociais, políticos, econômicos e religiosos de um período materializados através da expressão do artista nas edificações históricas, sendo fundamental, portanto, a sua conservação.

A preservação dos monumentos históricos é de fundamental importância, já que representam tanto as heranças culturais da humanidade quanto os momentos políticos e sociais em que seus idealizadores viveram. Desse modo, a busca de novos subsídios para preservação desse patrimônio, torna-se imperativa (RESENDE, 2002).

Os monumentos históricos religiosos da Bahia derivam, principalmente, do imenso acervo arquitetônico do período colonial, sendo que a herança cultural deixada nesta época foram igrejas, prédios, fortificações, esculturas, pinturas, conventos, entre outros. Estas obras de arte, além do valor material, acumulam o valor imaterial, no sentido cultural e histórico, e guardam a memória de uma população.

Intervir em uma obra de arte, tanto do presente como do passado, se reveste em ato de extrema responsabilidade, que requer do restaurador não apenas um mero conhecimento técnico, mas, principalmente, um conhecimento filosófico apoiado cada vez mais na investigação científica (ARGOLO, 2005).

Para Viollet-le-Duc (2008), toda porção da obra preenche uma função e possui uma ação, e ressalta que o restaurador deve agir como o cirurgião habilidoso experimentado, que somente intervém em um órgão após ter adquirido o conhecimento completo de sua função e depois de ter previsto as consequências imediatas ou futuras de sua operação. Se for aleatório, mais vale que se abstenha. Mais vale deixar morrer o doente que matá-lo.

Assim, é preciso buscar, examinar, coletar todas as informações que nos ajudem a compreender o valor histórico, artístico, científico e sentimental de um patrimônio a ser preservado, a ser restaurado, seja ele patrimônio tombado ou não.

Os problemas causados pela falta de preservação adequada dos monumentos históricos só chegam ao conhecimento da população quando acontece uma tragédia, como um incêndio ou um desabamento. Entretanto, longe dos olhos da maioria, ameaças microscópicas rondam permanentemente o patrimônio cultural . os micro-organismos, entre eles fungos e bactérias, que, associados a fatores físicos e químicos, provocam desgastes nas rochas e minerais de casas, igrejas, teatros e outros prédios históricos, processo denominado de biodeterioração (LOPES, 2003).



A despeito da sua importância, os monumentos nem sempre receberam a atenção adequada no que se refere à manutenção, ficando expostos às condições ambientais que propiciam os danos.

O primeiro relato aos danos causados pelas patologias na construção civil está no Antigo Testamento, onde existe orientação do que fazer e que providências deveriam ser tomadas ao surgir *lepra* nas residências. A palavra *lepra* nada mais é do que uma referência a manchas, *manchas* nas casas, ou seja, à presença de sais nas paredes e, oportunamente, à possível ação de microrganismos. Uma das passagens mais interessantes diz:

O sacerdote antes de entrar para examinar a mancha, mandará que tirem para fora tudo que há na casa, a fim de que não haja contaminado nada do que houver nela. E só então entrará para visitar a casa. Examinará a mancha, e se a mancha que está nas paredes da casa estiver em cavidades esverdeadas ou avermelhadas parecendo profundas nas paredes, o sacerdote sairá da casa e, tendo passado pela soleira da porta, fechá-la-á por sete dias. (LEVITICO 14 36:38, p.158).

Em ambientes internos, como igrejas e conventos, a alta umidade e temperatura, a pouca ventilação e baixa luminosidade favorecem a biodeterioração. Nos ambientes externos, é recomendada a rotina de manutenção periódica, pois é o principal caminho para a prevenção aos ataques biológicos (CANEVA, 1991).

Para Resende (2008), a biodeterioração é considerada qualquer alteração indesejável nas propriedades e constituintes de um material causado pela ação vital de um organismo. Este processo está diretamente relacionado a fatores físicos e químicos.

A propósito, não se deve confundir Biodeterioração com Biodegradação, apesar de ambas envolverem organismos vivos. Resende (2008) define a biodegradação como a propriedade que os organismos, utilizados pelo homem, têm de transformar o material em uma forma mais útil ou aceitável. Este processo se refere somente a materiais que geralmente são de valor baixo ou mesmo negativo, como os dejetos orgânicos.

Já a deterioração é induzida pelas condições climáticas favoráveis ao fenômeno, como chuvas, ventos, temperatura, umidade, sais, poluição atmosférica, bem como pela colonização biológica dos substratos rochosos ou não, causando a biodeterioração. Este processo leva ao dano físico, químico e estético dos monumentos e, geralmente, está associado à ação de organismos, desde algas, bactérias, fungos, líquens, briófitas, insetos xilófagos, aves, roedores e plantas, enfim,

qualquer tipo de ser vivo que, de alguma forma, favoreça a deterioração de materiais, inclusive a ação do homem.

O desgaste de rochas monumentais expostas é um processo que envolve mecanismos físicos e químicos, que são considerados geralmente fatores principais e seu processo de degradação é devido à ação sinérgica da chuva, do vento e da luz solar (RESENDE, 2008). O clima e a poluição atmosférica agem diretamente nos processos biológicos de degradação das rochas. Em alguns casos, a poluição do ar favorece o crescimento dos biofilmes e, conseqüentemente, a biodeterioração (TIANO, 1998).

A ação conjunta entre fatores físico-químicos e microbiológicos potencializa a deterioração do patrimônio artístico, devido à intensificação do comprometimento das áreas afetadas do substrato que, quanto mais expostas a fatores ambientais, terão maior condição de fornecimento de nutrientes aos microrganismos e, assim, intensificam a colonização e a formação dos biofilmes no monumento.

A biodeterioração nos monumentos dá-se com a formação de biofilmes no substrato afetado. Os biofilmes são complexos sistemas biológicos constituídos por diversos grupos taxonômicos e metabólicos de microrganismos que se encontram associados à superfície ou intrínsecos, invadindo em alguns casos a totalidade do edifício (MORALES; DUQUE, 1998).

O desenvolvimento do biofilme em monumentos históricos dá-se, inicialmente, pela ação de micro-organismos fotossintetizantes que possuem grande importância ecológica como pioneiros na colonização do material rochoso, devido à sua natureza fotoautotrófica. A composição mineral, textura, porosidade e permeabilidade das rochas podem influenciar a distribuição desses organismos no monumento (MILLER; MACEDO, 2006).

Entre os principais microrganismos que compõem os biofilmes e que colonizam as superfícies dos edifícios históricos promovendo a biodeterioração dos materiais, podemos citar as bactérias, os fungos, as cianobactérias e as microalgas.

Dos microrganismos heterotróficos que compõem o biofilme, os fungos são maioria na colonização de monumentos construídos em diversos substratos, sejam estes de pedra, madeira ou telas. A microbiota fúngica suporta condições extremas como baixa disponibilidade de água e suprimentos orgânicos, condições extremas de temperatura e uma larga faixa de pH, variando do ácido ao alcalino, o que possibilita, com maior facilidade, sua colonização nos monumentos (TIANO, 1998).

As bactérias quimiolitotróficas são micro-organismos que participam do ciclo do nitrogênio. Esse processo metabólico resulta na liberação de ácidos, o que contribui efetivamente no processo de biodeterioração dos

monumentos. Já as bactérias quimiorganotróficas, assim como os fungos, obtêm energia através da oxidação de substratos orgânicos, participando também do processo de deterioração (RESENDE, 2008). As algas e cianobactérias, devido a sua capacidade fotoautotrófica, agem manchando e liberando nutrientes que podem ser utilizados por outros microrganismos presentes no substrato.

Os problemas advindos do processo de biodeterioração têm uma ocorrência ampla no mundo e alcançam níveis mais preocupantes em locais de clima tropical, como o Brasil, onde as condições de temperatura, umidade e luminosidade são extremamente favoráveis ao crescimento da maioria dos micro-organismos que atuam no processo (TIANO, 1998). Em nosso país, os efeitos ocorrem de maneira gradual e devastadora, e pouco conhecimento sobre o assunto dificulta seu combate e controle.

Um dos mais complexos problemas de conservação de monumentos é a contrapartida acerca do conhecimento biológico e a pouca informação na área a respeito da biodeterioração. As interações entre fatores ambientais que afetam os monumentos e os microrganismos não são bem compreendidos. Assim, as técnicas tradicionais da microbiologia associadas à análise molecular representam uma nova perspectiva dos estudos no avanço das pesquisas para conservação do patrimônio histórico (MILLER et al., 2008).

No Brasil, vêm sendo utilizadas técnicas moleculares para complementar os estudos acerca da biodeterioração, sendo normalmente utilizadas as técnicas tradicionais de cultivo. Estudos realizados por Lopes (2003), na Lapa, no Estado do Paraná, detectaram a presença de fungos e bactérias em monumentos, atuando na decomposição dos substratos de arenito do Teatro São João e na Casa da Cultura.

Através da Biologia Molecular, surgem novas possibilidades para a investigação e a utilização de processos mais precisos e eficazes para a identificação de micro-organismos responsáveis pelo processo de biodeterioração, seu ciclo de vida e a sucessão ecológica no substrato.

A partir da identificação da microbiota envolvida na biodeterioração dos monumentos, o combate se faz necessário e o uso de biocidas torna-se uma alternativa a ser seguida pelos profissionais da área da Conservação e do Restauro no controle da biodeterioração. No entanto, são recomendados estudos em laboratório e in loco acerca dos tipos de biocidas adequados para cada caso, pois não existe um produto químico universal para todas as situações.

Na Bahia, a região litorânea do Baixo Sul e Recôncavo, bem como em Salvador, a situação não é diferente. Os locais de clima tropical úmido apresentam condições favoráveis ao processo de biodeterioração por

fungos e bactérias, o qual pode ser verificado nas edificações dos seguintes conventos: São Francisco, de Salvador, Santo Antônio, de São Francisco do Conde e Santo Antônio, de Cairu, que, possivelmente, se encontram em avançado processo de desgaste. Nesses locais, podem ser visualizados sinais da ação dos agentes biológicos (biofilme com manchas esverdeadas e pulverulentas) nas paredes e estruturas dos respectivos monumentos religiosos.

O convento franciscano de Salvador-Ba foi fundado na Bahia em 1587. Com a invasão holandesa da Cidade do Salvador em 1624, o convento foi ocupado e degradado, principalmente nos seus retábulos originais. Só no ano de 1686, ocorreu o início da construção do atual convento e igreja. O conjunto é ainda formado pela Ordem Terceira de São Francisco e pelo cruzeiro que lhe é fronteiro. Seu interior é um exemplo do barroco setecentista, onde se destaca a talha dourada que reveste suas paredes e o forro da nave, em caixotões apainelados (IPHAN, 2009).

A construção da igreja atual e do convento foi iniciada no século XVII e finalizada apenas no século XVIII. Atualmente, passou por diversas restaurações. O cruzeiro de São Francisco articula-se com o Terreiro de Jesus, formando um dos mais interessantes espaços urbanos de Salvador, delimitando-se, em sua maior parte, por construções da metade do Século XIX, já restaurados com a revitalização do Centro Histórico de Salvador. A necessidade de restauração deste importante monumento é imperativa, visto o seu valor artístico e histórico, bem como devido aos sinais de biodeterioração e desgastes encontrados atualmente nesta edificação.

No ano de 2009, os portugueses elegeram a Igreja e Convento de São Francisco como a Sétima Maravilha do Mundo Português. Neste ano foram iniciadas pelo IPHAN obras emergenciais para resolver, parcialmente, os problemas estruturais do convento (FLEXOR; FRAGOSO, 2009).

Outro monumento é o convento franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA. Esta cidade fica localizada na Baía de Todos os Santos, no chamado Recôncavo baiano, sendo compreendida entre as falhas geológicas de Salvador e de Maragogipe. Em 1629, Gaspar Pinto dos Reis doou, ao convento de São Francisco da Cidade do Salvador, terras no local denominado Sítio. Um ano mais tarde, é iniciada a construção de uma pequena residência. A capela e o hospício ficaram prontos dez anos depois, e as obras do convento Santo Antônio são concluídas em 1649. Seu interior possui forros em abóbada abatida com pintura ilusionista na nave e na Ordem Terceira, atribuídas a José J. da Rocha (IPHAN, 2009).

O terceiro monumento é o convento franciscano de Santo Antônio em Cairu-BA. Segundo Argolo (2009), o município de Cairu localiza-se hoje na Costa do Dendê, uma das mais antigas áreas de ocupação e povoamento do território brasileiro, sendo que, em 1565, foi ordenada a vila de Cairu. Esta edificação histórica é obra do barroco brasileiro de 1654 que serviu de modelo para outros conventos no Brasil. Esse convento guarda tradições das construções monásticas medievais.

Atualmente, o convento franciscano de Cairu encontra-se em obras de restauração, com patrocínio da Petrobrás juntamente com a fiscalização do Instituto do Patrimônio Histórico Artístico Nacional (IPHAN). Segundo Santos (2007), este convento teve sua microbiota fúngica caracterizada, através de parceria estabelecida entre a empresa de restauração Studio Argolo e a União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME), através do trabalho de monografia de graduação em Ciências Biológicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os agentes físicos e biológicos e aplicar biocidas na população microbiana que formam os biofilmes, responsáveis pela biodeterioração de diferentes substratos no interior e exterior dos monumentos religiosos da Bahia, o convento de São Francisco de Salvador, o de Santo Antônio de São Francisco do Conde e o de Santo Antônio de Cairu.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

“ Realizar a diagnose visual nos diferentes substratos no interior e exterior dos locais com sinais de biodeterioração destes monumentos religiosos;

“ Determinar a abundância de bactérias e fungos presentes nas amostras dos substratos;

“ Identificar, através da Taxonomia Clássica e da Biologia Molecular, os fungos cultiváveis presentes nos diferentes substratos destes monumentos;

“ Correlacionar a presença dos micro-organismos a alguns fatores ambientais, como temperatura, umidade relativa e luminosidade do ambiente para os conventos franciscanos de Salvador e do Conde, e

temperatura e umidade (ambiente), bem como pH e condutividade (substrato) do convento franciscano de Cairu;

“ Avaliar a eficácia do biocida alternativo sugerido, a mistura 1:1 de Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) com Sulfato de Zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) no combate aos microrganismos dos biofilmes, comparando sua ação aos biocidas tradicionais usados no Restauro, Timol ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ ) e Preventol BP ( $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClO}$ ) nas concentrações 0,5 1,0 e 2,0%.

### 3 JUSTIFICATIVA

O patrimônio artístico representa a herança cultural da humanidade. Os momentos de usos sociais, políticos, econômicos e religiosos de um período materializado através da expressão do artista em edificações históricas, sendo fundamental, portanto, a sua exposição ao público. Trazê-lo a convívio cotidiano da sociedade é uma forma de apresentar a história ao povo. Entretanto, essa exposição, também ocorre, aos efeitos físicos, químicos e biológicos causa danos aos materiais dos artefatos, principalmente pela ação de microrganismos em processo conhecido, atualmente, como biodeterioração.

Os monumentos, em grande parte, são construídos de diversos materiais. Entre eles, os rochosos, a madeira, que são passíveis de biodeterioração quando expostos a fatores ambientais. A biodeterioração de monumentos, causada por microrganismos, é uma preocupação inerente ao ofício dos restauradores. Controlar o processo de biodeterioração com o mínimo impacto sobre a obra de arte e meio ambiente é um desafio aos profissionais da área da preservação (LOPES, 2003).

Os biocidas compreendem um grupo heterogêneo de agentes químicos que estão disponíveis no mercado, podem ser usados na área de Conservação e do Restauro como alternativa de combate à biodeterioração e, ainda, ser utilizados nos trabalhos desta área através de diversos estudos. Um parâmetro muito importante para a escolha e o uso desses produtos é a análise criteriosa para cada caso: a eficiência, a interferência no material a ser aplicado, a toxicidade, a baixa concentração, o alto espectro de ação e de longa duração (NIMIS, 1992).

Em busca de métodos de combate mais eficazes, de menor impacto ambiental, de não interferência no material e de baixo custo econômico, sugere-se a substituição de biocidas que vêm sendo utilizados tradicionalmente no combate aos micro-organismos presentes no biofilme dos monumentos, como o Timol ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ ) e Preventol BP ( $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClO}$ ), por uma mistura 1:1 de Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) com Sulfato de Zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ), quando aplicado em baixas concentrações.

A partir desses estudos, a utilização de métodos de controle eficazes se faz necessário propiciando, assim, a conservação destes importantes monumentos artísticos, o que também possibilitará a preservação histórica e cultural. Desta maneira pretende-se trazer uma contribuição social para as gerações do presente e do futuro no Brasil.

Este trabalho de pesquisa tem caráter inovador e interdisciplinar na área de Conservação e do Restauro de monumentos religiosos, no Brasil. Um projeto desta dimensão e relevância perpassa os limites da esfera individual para o saber coletivo em diversos campos do conhecimento, como a Biologia, a Química, Física, Arquitetura, História da Arte, História Geral e a Engenharia dos Materiais entre outros. Visa, também, contribuir com informações técnicas relevantes sobre a biodeterioração, bem como a substituição de produtos de alto custo econômico por outros de menor preço e com eficácia equivalente, além da proposta da análise da Biologia Molecular no levantamento e identificação da microbiota fúngica dos biofilmes presentes nos conventos franciscanos, agregando conhecimento e técnicas alternativas na área de Conservação e do Restauro do patrimônio histórico e cultural.

## 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1 BIODETERIORAÇÃO EM MONUMENTOS

O monumento histórico não é apenas um edifício antigo e sim o testemunho vivo de uma sociedade, a sua história marcada através da arquitetura. Estes objetos do patrimônio cultural, mesmo quando produzidos com os mais resistentes materiais, são influenciados pelos parâmetros ambientais e naturais que modificam sua estrutura e composição.

O clima assim como a poluição atmosférica influenciam os processos biológicos no evento da degradação dos materiais dos edifícios. A temperatura e umidade, bem como a salinidade e poluição do ar, principalmente com amônia contribuem para formação do biofilme. De maneira geral é extremamente complexo identificar o agente responsável pelo processo de deterioração, já que a ação química e física é influenciada ou controlada pela atividade microbiana (RESENDE, 2008).

Os materiais de construção civil como concretos, argamassas, pedras, tintas, plásticos, madeiras, materiais cerâmicos e materiais metálicos, entre outros, são suscetíveis à colonização de micro-organismos capazes de acelerar o mecanismo de envelhecimento do material até a sua deterioração.

Existem vários tipos de deteriorações causadas por organismos vivos como a deterioração física ou mecânica como exemplificado na Figura 1, onde o crescimento e o movimento dos organismos causam danos ao material construtivo. Um exemplo disso são fissuras e desabamentos causados por raízes, ratos e camundongos roendo cabos, blocos de concreto (com agregado leve), divisórias de gesso e madeira.

Figura 1 . Edificação do Engenho da Freguesia em Cabôto-BA atacada por diversos tipos de biodeteriorações  
Fonte: foto do acervo do autor.

Biodeterioração estética é aquela que ocorre na superfície apenas pela presença dos organismos ou metabólitos nas edificações, criando manchas. Um exemplo clássico de biodeterioração estética é a formação de manchas escuras causadas por micro-organismos como: algas, fungos, bactérias e cianobactérias sobre superfícies de prédios, conforme o exemplo da Figura 2. O biofilme que se forma não oferece qualquer alteração na composição química ou no desempenho do material, mas altera sua aparência (KUMAR; KUMAR, 1999; PINHEIRO, 2003).

Figura 2 . Biodeterioração estética em edificação.  
Cairu-BA  
Fonte: Foto do acervo do autor.

#### 4.2 PRINCIPAIS FATORES QUE INFLUENCIAM A BIODETERIORAÇÃO



O crescimento e desenvolvimento de micro-organismos nas construções são influenciados por diversos fatores, e entre os principais deles estão: umidade, a falta de ventilação, utilização que se dá ao cômodo ou edificação, qualidade do ar interno, condições térmicas, ar externo, variações sazonais, temperatura, microclimas internos, projetos de construção, tipos de materiais utilizados na construção, tipo de acabamentos, distribuição geográfica, materiais orgânicos, ocupação, manutenção e gerenciamento (SAAD, 2002).

Pode-se observar que, dos fatores que favorecem o crescimento de micro-organismos em uma edificação, os principais deles são a umidade e a temperatura, que podem vir a ser minimizados com projetos envolvendo maior atenção no que diz respeito à ventilação e iluminação da edificação (SAAD, 2003).

#### 4.2.1 Água

Toda forma de vida necessita de água para seu desenvolvimento. Um dos fatores fundamentais para a determinação do tipo de microrganismos e seu desenvolvimento é a interação entre a quantidade de água disponível no meio e a capacidade de absorção do material (SHIRAKAWA et al., 1998).

A construção de estruturas de proteção necessárias para evitar o acúmulo de água, impedindo o seu escoamento na superfície, pode, efetivamente, reduzir o crescimento biológico.

#### 4.2.2 Nutrientes

O material de que se constitui o substrato também tem um papel complexo e de importância na influência do crescimento microbiano. Este pode fornecer nutrientes, como é o caso dos filmes de tintas à base de água, em que a presença de plastificantes, estabilizadores à base de amônia e de éteres de celulose, pode ser fontes de nutrientes. No ambiente construído, a madeira é um material rico em fonte de nutrientes. A rugosidade e a porosidade dos materiais também podem influenciar o tempo em que a superfície permanece úmida, pois podem alterar a capacidade de acúmulo de água e a disposição de poluentes atmosféricos, o que se torna uma fonte de nutrientes (SHIRAKAWA et al., 2008).

A limpeza periódica da poeira, de esporos, das sementes, dos excrementos de pássaros, das substâncias orgânicas e de materiais de restauração inadequada, devem ser removidos, pois são fontes acessíveis de nutrientes para os micro-organismos. Além disso, a limpeza periódica como medida de conservação preventiva é a maneira

principal e às vezes única para prevenir e controlar o ataque biológico no exterior dos monumentos, em locais de clima tropical (KUMAR, 1999).

#### 4.2.3 Carbono

O carbono é um elemento importante para o crescimento microbiano, segundo Pelczar (1996), compondo a formulação química de três das maiores classes de compostos orgânicos: os carboidratos, os lipídeos e as proteínas, fornecendo, assim, energia necessária para o crescimento celular, sendo, portanto, unidade básica da composição celular.

Os materiais utilizados na construção dos monumentos são de diversas naturezas (animal, vegetal, colas, polímeros, vernizes, tintas, entre outros). Assim, podem contribuir para o risco biológico já que são uma fonte disponível de nutrientes que formam compostos orgânicos do elemento carbono (TIANO, 1998).

#### 4.2.4 Temperatura e umidade

A fim de reduzir os riscos biológicos, para os objetos orgânicos mantidos confinados em ambientes, tendo em conta que, principalmente nas regiões dos monumentos estudados, o clima, a temperatura e a umidade são por longos períodos de tempo favoráveis para o desenvolvimento dos organismos biológicos, inclusive das estruturas reprodutivas (conídios, esporos e ovos). Os objetos afrescos devem ser acondicionados em valores de temperatura variando entre 16 e 18 °C e nível de umidade relativa abaixo de 60%. Este valor de umidade pode ser fator limitante para o desenvolvimento de fungos, enquanto a temperatura influi para os ovos dos insetos (TIANO, 1998).

Segundo Oliveira (2006), após 75% de umidade relativa no ambiente, este torna-se propício ao desenvolvimento de mofo (fungos).

#### 4.2.5 Luminosidade

A colonização microbiana das rochas começa com organismos fototróficos, que constituem um biofilme visível, enriquecendo a biomassa orgânica na superfície do material rochoso. O crescimento e a atividade metabólica destas algas, cianobactérias e líquens, bem como musgos e plantas, são regulados por parâmetros tais como a luminosidade (CRISPIM et al., 2004).

Esta se torna uma condição favorável na produção de pigmentos escuros de melanina sintetizada por muitas espécies de fungos, o que representa um mecanismo de defesa, atuando e protegendo contra a

ação dos raios UV. Esta condição possibilita aos fungos a deterioração estética dos materiais que compõem os monumentos, interferindo, assim, na sua leitura artística.

#### 4.2.6 Outros fatores

Segundo Roca e outros (2009), a extensão micelial e a taxa de crescimento de fungos dependem de fatores como as características biológicas e genéticas das espécies isoladas, a capacidade metabólica de utilizar substratos diferentes, as condições microambientais (substrato e pH) e as relações ecológicas.

Fatores como pH, concentração de oxigênio e o intervalo de tempo são determinantes no desenvolvimento e na seleção da comunidade microbiológica que pode desencadear o mecanismo de biodeterioração (SAAD, 2003).

Uma prática simples e eficaz para limitar a biodeterioração dos materiais rochosos expostos a fatores ambientais é a sua manutenção. Na verdade, a simples limpeza periódica das superfícies expostas pode eliminar o efeito de sujidade devido à deposição de partículas ambientais que podem favorecer o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (TIANO, 1998).

Nas intervenções de limpeza de rochas, algumas substâncias químicas (revestimentos protetores ou consolidantes) podem ser aplicadas ao objeto, a fim de aumentar a repelência à água e à coesão. Estes produtos podem evitar ou retardar a recolonização do substrato, diminuindo sua porosidade, rugosidade e umidade, que, em condições ambientais críticas, poderiam favorecer o desenvolvimento da microbiota especializada.

### 4.3 OS BIOFILMES

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; DUQUE, 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 fenômeno natural que, muitas vezes, aparece nas formas de microfílm e/ou macrofílm visíveis na superfície. O microfílm refere-se aos micro-organismos, já o macrofílm 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).

O desenvolvimento do biofilme em monumentos históricos dá-se, inicialmente, pela ação de micro-organismos fotossintetizantes que possuem grande importância ecológica como pioneiros na colonização de pedras, devido à sua natureza fotoautotrófica. A composição mineral, textura, porosidade e permeabilidade da rocha podem influenciar a distribuição desses organismos no monumento (MILLER; MACEDO, 2006).

#### 4.4 MICRO-ORGANISMOS QUE COMPÕEM O BIOFILME E SEU PAPEL NA BIODETERIORAÇÃO

Os micro-organismos responsáveis pela biodeterioração de monumentos compõem a microbiota do solo e do ar. Entre os agentes que participam deste processo, estão as bactérias, as algas e os fungos (LOPES, 2003). Para melhor compreensão do estudo, os micro-organismos responsáveis pela biodeterioração devem ser separados em grupos. Entre esses micro-organismos, as algas e os fungos formam alterações visíveis, já as bactérias, mesmo sem efeitos visíveis, provocam degradação devido a suas reações metabólicas (TIANO, 1998).

De maneira geral, os microrganismos que compõem o biofilme, responsáveis pelo processo de biodeterioração dos monumentos históricos, são as algas, cianobactérias, bactérias e os fungos. Esses micro-organismos agem através das ações metabólicas de excreção de ácidos orgânicos e inorgânicos que, em contato com o substrato, irão agir destruindo os minerais que o compõem. Diversos estudos com as mais diferentes técnicas de cultivo e análise bioquímica vêm sendo

usados para maior compreensão sobre o processo da biodeterioração e os agentes nele envolvidos (GONZÁLES; SAIZ-JIMÉNES, 2005).

De acordo com Morales e Duque (1998), as edificações maias, no Estado de Yucatán, México, encontram-se em condições que resultam num ciclo ambiental adequado à deterioração do monumento. Sua constituição em material rochoso calcário, altamente poroso e mecanicamente instável, facilita esse processo, já que as características da rocha, como dissemos, contribuem para formação dos biofilmes. Estas condições ajudam no desenvolvimento e estabelecimento de diversos grupos microbianos de diferentes tipos metabólicos, que podem promover a biodeterioração dos substratos rochosos.

Os micro-organismos envolvidos no processo de biodeterioração se adaptam aos mais diversos substratos, devido, principalmente, à diversidade microbiana que compõe o biofilme. Substratos orgânicos, como madeira, tecido, papel e alguns tipos de tinta, são facilmente colonizados, por conta da disponibilidade de nutrientes. Já substratos inorgânicos, como arenito, a cerâmica e outros tipos de materiais rochosos, mesmo sendo mais resistentes, também são atingidos pela ação destes micro-organismos (TIANO, 1998).

Segundo Ciferri (1999), a Caverna de Lascaux em Dordogne, região da França, é talvez o exemplo mais emblemático dos micro-organismos que podem causar danos às obras de arte. Tais condições que levaram ao florescimento microbiano representam um caso extremo, pois, quando a Caverna foi aberta à visitação, devido à luz artificial intensa, os organismos autotróficos começaram a se reproduzir e, quando foi fechada à visitação e as luzes foram apagadas, a proliferação foi ainda maior.

#### 4.4.1 Bactérias

As bactérias são micro-organismos procarióticos muito diversos que, através dos seus produtos metabólicos, atuam diretamente no processo de biodeterioração. As bactérias quimiolitotróficas e quimiorganotróficas oxidam o substrato através dos ácidos inorgânicos e orgânicos produzidos em ações metabólicas. As quimiolitotróficas atuam dentro dos ciclos dos quais fazem parte, por exemplo, o ciclo do enxofre e do nitrogênio dos quais geram diversos produtos inorgânicos (RESENDE, 2008; TIANO, 1998).

As bactérias quimioautotróficas são organismos que utilizam compostos químicos inorgânicos como fonte de energia e como fonte de carbono, o dióxido de carbono (PELCZAR, 1996), sendo agentes biodeteriorantes de rochas e materiais cimentícios como o concreto e as argamassas (PINHEIRO, 2003, SAAD, 2003).

Por serem dotadas de habilidade para sobreviver em ambientes hostis, como locais de salinidade ou acidez elevadas e altas temperaturas, podem ser encontradas nos mais diversos ambientes, sendo responsáveis pela deterioração de matéria orgânica (PELCZAR, 1996).

Segundo Saad (2008), as bactérias modificam a coloração das superfícies pintadas e seu metabolismo pode causar degradação. Bactérias autotróficas e heterotróficas estão envolvidas na biodeterioração, tais como: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Achromobacter* sp, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus*, entre outras.

Bactérias, tomando-se, como exemplo, algumas espécies de bacilos, são capazes de formar paredes bacterianas muito resistentes ao calor, à radiação e até mesmo à desinfecção química (HAUNG, 1993, apud TOUMELA et al., 2000).

Os micro-organismos encontrados por diversos autores, na Europa, são os mais variados, entre as bactérias, as comumente encontradas nos monumentos em processo de biodeterioração são dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Flavobacterium*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* (RESENDE, 2008; TIANO, 1998; CIFERRI, 1999).

#### 4.4.2 Micro-organismos fotossintetizantes

As algas são micro-organismos com estrutura celular eucariótica, sendo classificadas nutricionalmente como seres fotoautotróficos, embora algumas espécies possam crescer heterotroficamente. Quando crescem fotossinteticamente, produzem o gás oxigênio (O<sub>2</sub>) e utilizam dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como a única fonte de carbono. As algas, ao contrário das plantas superiores fotossintetizantes, não necessitam de sistema vascular para transportar nutrientes, pois todas as suas células são capazes de absorver diretamente nutrientes dissolvidos (PELCZAR, 1996).

As microalgas são organismos que compõem o biofilme, sendo responsáveis pelo processo de biodeterioração. Estes organismos são eucarióticos, relativamente simples, e realizam fotossíntese, porém não possuem tecidos especializados como as plantas (TORTORA, 2006). Entre os micro-organismos procarióticos, encontram-se as cianobactérias, também conhecidas como algas azuis ou Cyanophyta. Possuem pigmentos como a clorofila a, o que permite a captação de energia em um amplo espectro de radiação, ou seja, realiza fotossíntese (OLIVEIRA, 2003).

O grupo das microalgas está associado com as cianobactérias, e as patologias envolvem alteração da coloração de rochas devido à presença de células pigmentadas, retenção de água, além de auxiliar no

crescimento de novos micro-organismos e outros organismos, facilitando sua fixação pela presença de organismos vivos ou mortos, formando um substrato rico em nutrientes. Pela penetração no interior da rocha e pela sua fixação, possibilitam a degradação do material, acarretam dissolução alcalina, quando ocorre a absorção de íons H<sup>+</sup> pela sua atividade celular, e auxiliam na destruição de silicatos do material rochoso através da liberação de polióis<sup>+</sup>(ALLSOPP, 2004).

A luminosidade e o calor criam condições propícias ao desenvolvimento microbiano de espécies fotoautotróficas. Com isso, a biodeterioração provocada por esses organismos tem demonstrado ser um dos fatores mais importantes no processo de deterioração dos monumentos históricos (CIFERRI, 1999).

Devido a sua ação fotossintética, as algas e cianobactérias podem ser consideradas os primeiros habitantes a abrir caminho na superfície de materiais rochosos. Segundo Tiano (1998), esses micro-organismos são muito sensíveis aos índices de umidade, portanto sua presença mostra que a umidade está elevada. As cianobactérias são geralmente aptas a resistir a condições adversas, devido à presença de um grosso envelope exterior e dos seus pigmentos (MILLER; MACEDO, 2006).

Os efeitos estéticos, causados particularmente pelos organismos fotoautotróficos, comprometem bastante o monumento, através de manchas esverdeadas e com aspecto úmido, que descaracteriza esteticamente o substrato afetado.

Os micro-organismos fotossintetizantes também são largamente encontrados em biofilmes nas paredes externas das edificações em regiões da América Latina, formando uma biomassa composta por algas, cianobactérias, fungos, bactérias e organismos simbióticos, como líquens. As regiões tropicais e subtropicais apresentam uma característica que proporciona maior facilidade de desenvolvimento desses organismos. A sua umidade natural dominante dispensa qualquer outra fonte de água. Em decorrência do desenvolvimento dos micro-organismos fotoautotróficos, ou seja, que produzem seus nutrientes a partir de substâncias inorgânicas e utilizando a luz como fonte de energia, as algas e cianobactérias podem causar também deteriorações físico-químicas e descoloração do substrato (GAYLARDE; GAYLARDE, 2000; ALLSOPP, 2004).

Além disso, esses organismos são facilmente encontrados em pontos da edificação que apresentam sinais de umidade, como próximos a tubulações com vazamentos ou calhas de telhados, em áreas frequentemente molhadas pela chuva e com sistema de drenagem insuficiente ou inadequado, enfim, nos locais da alvenaria em que existam fontes de luz e água (ALLSOPP, 2004).

A biodeterioração mais evidente, causada por algas e cianobactérias, está ligada à estética, causando manchas não só em rochas, como também em materiais cimentícios, na madeira e superfícies pintadas. O requisito básico para que ocorra esse tipo de biodeterioração é simplesmente haver luz suficiente para seu desenvolvimento. O aparecimento dessas manchas, de coloração variada e crescimento rápido, pode ser em tons de verde, rosa ou marrons, que dão à edificação uma aparência de desleixo (GAYLARDE; GAYLARDE, 2000, ALLSOPP, 2004).

As microalgas mais comuns nos estudos acerca da biodeterioração são *Chlamydocapsa*, *Ellipsoidea*, *Chlorella*, *Desmococcus* e *Trentepohlia* (MILLER; MACEDO, 2006). Já as cianobactérias mais comumente verificadas nos estudos são dos gêneros *Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Leptolyngbya* e *Pleurocapsa* (TIANO, 1998; MILLER; MACEDO, 2006; MILLER et al., 2008).

A importância da atividade microbiana na alteração e biodeterioração de paredes de concreto não é frequentemente levada em consideração. Segundo Gaylarde, (2005), a importância das cianobactérias como biodeterioradores é enfatizada pela utilização de técnicas tradicionais de cultivo e de métodos moleculares para identificação, sendo fundamental o conhecimento destas comunidades no biofilme.

A fim de compreender o processo da biodeterioração, Miller e outros (2008) avaliaram a comunidade microbiana, composta principalmente por *Chlorella* spp, *Stichococcus* spp e *Trebouxia* spp, além de cianobactérias como algumas pertencentes aos gêneros *Leptolyngbya* e *Pleurocapsa*, envolvidas no processo. Também estudaram a sua capacidade de colonizar rochas, através de um experimento laboratorial em um sistema de incubação em câmara, que permitiu a formação de biofilme semelhante aos que ocorrem naturalmente nos monumentos. A análise para avaliar os micro-organismos foi feita através de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

#### 4.4.3 Fungos

Na categoria dos heterotróficos, encontram-se os fungos que, com frequência, colonizam superfícies de monumentos. Esses organismos não realizam fotossíntese e, por isso, precisam retirar seu alimento do meio em que vivem. Em regiões de clima tropical, eles são os principais responsáveis pela biodeterioração, produzindo enzimas que degradam o substrato em que estão fixados e absorvem os compostos mais simples, sendo, por isso, chamados de osmotróficos.

Os fungos filamentosos são constituídos por elementos multicelulares, em forma de tubo, que podem ser cenocíticas ou septadas. Essas



estruturas, que formam o corpo de sustentação dos fungos, o micélio, que se desenvolve no interior do substrato, funcionam também na liberação de enzimas e absorção de nutrientes extracelulares (TRABULSI et al.,1999).

Além da sua capacidade de colonizar ambientes hostis e do seu potencial de biodeterioração, proveniente da liberação de produtos metabólicos, os fungos toleram larga faixa de pH e são capazes de resistir a baixos teores de umidade. Outra característica que os favorece é a produção de pigmentos escuros de melanina sintetizada por muitas espécies, e que atua protegendo-os contra a ação dos raios UV. Todos esses fatores tornam os fungos um importante agente no processo de biodeterioração.

Segundo Resende (2008), esses micro-organismos podem utilizar um largo espectro de nutrientes, e até mesmo traços da matéria orgânica podem estimular seu crescimento. As camadas mais externas das superfícies das rochas, por exemplo, podem conter cerca de mais de 2% de material orgânico como pectina, celulose, lignina, amido e proteínas, que podem ser utilizados pelos fungos como fonte de energia. As enzimas extracelulares liberadas por eles podem decompor os mais complexos compostos orgânicos. As hifas dos fungos filamentosos podem penetrar nas rochas numa profundidade de 1-4 mm e solubilizar minerais que contenham silicatos ou materiais calcários.

Os fungos são persistentes, pois resistem à dessecação severa e à diminuição da umidade. Sua parede celular é composta por quitina polissacarídea, que é dura e resistente à perda de água.

A origem desses micro-organismos está no solo, na água e no ar. Somente no ar, eles são encontrados acima de 10.000 esporos por m<sup>3</sup>. Em condições ambientais favoráveis, os fungos são capazes de crescer e influenciar fortemente o processo de biodeterioração das rochas.

Muitos autores têm relatado a presença de grandes quantidades de fungos na superfície das rochas, de monumentos e de construções em pedra de valor, chegando a valores acima de 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> UFC (unidade formadora de colônia) por grama de pedra. A maioria dos fungos encontrados nas rochas pertence a gêneros como: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Botrytis*, *Aureobasidium* e *Torula* (RESENDE, 2008).

Sterflinger e Prillinger (2001), pesquisadores do Instituto de Microbiologia Aplicada da Universidade de Bodenkultur, em Viena, na Áustria, estudaram a taxonomia e a biodiversidade de comunidades de fungos presentes em rochas originais localizadas na área rural e comparou-as com a microbiota fúngica encontrada em três monumentos da área urbana da mesma cidade. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que os gêneros *Cladosporium*, *Epicoccum* e *Phoma*

foram os mais encontrados sobre as superfícies dos monumentos, e a biodiversidade dos fungos, nas edificações históricas do ambiente urbano, foi mais elevada do que na rocha primitiva do ambiente rural. Segundo os autores, essa diferença pode ser atribuída à elevada poluição orgânica verificada na cidade.

Lopes (2003), realizando um trabalho em monumentos históricos de pedra localizados na cidade histórica de Lapa . PR, detectou a presença de fungos que atuavam na decomposição dos blocos de arenito da área externa do monumento. Segundo o autor, os fungos mais abundantes nas amostras analisadas do monumento foram o *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria alternata*.

Segundo Resende (2008), no projeto IDEAS (Investigação sobre degradação de materiais pétreos em monumentos históricos) envolvendo instituições de pesquisas brasileiras e alemãs, os resultados obtidos nos estudos acerca dos agentes biológicos e físico-químicos que influenciam no processo de biodeterioração das rochas do monumento histórico, Santuário de Bom Jesus de Matosinhos, em Congonhas-MG, revelaram valores microbiológicos quantitativos de até 7.500 UFC/g de fungos filamentosos, colonizando o substrato rochoso desta edificação. Nesse trabalho, entre as espécies fúngicas mais abundantes que ocorreram, foram: *Aspergillus ochraceus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium expansum*, *Phoma* sp, *Paecilomyces lilacinus*, *Mucor hiemalis*, *Phialophora* sp e *Acremonium* sp. Os resultados revelaram que os fungos se desenvolveram em uma larga faixa de pH (4,33 a 7,98) e estavam presentes nas rochas de forma diversa e significativa.

O desenvolvimento e a morte de várias gerações de microrganismos, junto à acumulação de material orgânico e inorgânico, enriquecem a rocha, seja natural ou artificial, e disponibiliza fatores de crescimento que permitem o desenvolvimento de micro-organismos heterotróficos. Os fungos são considerados organismos com maior potencial de destruição dos materiais rochosos, o que os coloca como organismos dominantes na colonização das rochas (TIANO, 1998).

O desenvolvimento fúngico na madeira, em especial fungos apodrecedores, exige quatro condições essenciais: teor de umidade superior a 20%; temperaturas entre 0°C e 40°C; presença de ar e um substrato adequado, no caso, a madeira (MACÁRIO, 2010).

No município de Cairu, Bahia, estudos realizados por Santos e outros (2008), utilizando técnicas tradicionais de cultivo, revelaram a diversidade de gêneros dos fungos envolvidos no processo de biodeterioração do monumento histórico do Convento franciscano Santo Antônio, de Cairu-BA. Entre os gêneros encontrados, estão *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora* e *Rhizopus*.

## 4.5 TÉCNICAS EMPREGADAS PARA OS ESTUDOS ACERCA DA BIODETERIORAÇÃO

Diversos especialistas no mundo têm-se deparado com a necessidade de compreender e pesquisar o fenômeno da biodeterioração dos monumentos. Na América Latina, por exemplo, temos iniciativas como a do programa do Cytel (Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia), que é uma rede temática. Seu objetivo é preservar, com foco na preservação e proteção do patrimônio cultural iberoamericano dos efeitos da biodeterioração ambiental. Esta rede iniciou os trabalhos em dezembro de 1999, com a participação de diversos especialistas de países como: Brasil, Argentina, Colômbia, México, Espanha e Portugal. Para se compreender a biodeterioração, é necessário, principalmente, que se conheçam os agentes microbiológicos atuantes nesse processo e a combinação de métodos de cultivo, técnicas moleculares, análise quantitativa e análise qualitativa que facilitam o estudo de comunidades microbianas naturais, incluindo os envolvidos na biodeterioração de monumentos de interesse cultural.

As novas técnicas moleculares têm sido valiosas para descobrir a diversidade microbiana envolvida na biodeterioração. Segundo González e Saiz-Jiménez (2005), os métodos microbiológicos clássicos, que são baseados em procedimentos de cultura, têm fornecido informações importantes, porém limitadas na diversidade de amostras. No entanto, as técnicas de microscopia tradicionais e a Biologia Molecular, são complementares para uma avaliação completa da comunidade microbiana. Os micro-organismos encontrados por diversos autores, na Europa, são os mais variados, e, entre as bactérias, as comumente encontradas nos monumentos em processo de biodeterioração são dos gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*, *Flavobacterium*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* (RESENDE, 2008; TIANO, 1998; CIFERRI, 1999). As microalgas mais comuns são: *Chlamydocapsa*, *Ellipsoidea*, *Chlorella*, *Desmococcus* e *Trentepohlia* (MILLER; MACEDO, 2006). Já as cianobactérias mais comumente verificadas nos estudos são dos gêneros *Gloeocapsa*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Leptolyngbya* e *Pleurocapsa* (TIANO, 1998; MILLER; MACEDO, 2006; MILLER et al., 2008).

As pesquisas moleculares no Brasil têm demonstrado um número cada vez maior de cianobactérias colonizando monumentos de pedra. Estudos realizados por Crispim e outros (2004) verificaram a existência de onze taxas de cianobactérias, e, entre estas, encontram-se *Calothrix*, *Chroococcales*, *Gloeocapsa*, *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Pleurocapsales*, *Scytonema* e *Mastigocladus*, em seis igrejas de Porto Alegre-RS, demonstrando que esses micro-

organismos compõem uma significativa parcela da biomassa responsável pela deterioração desses monumentos.

A Biologia Molecular, como novo campo de pesquisas, tem sido desenvolvida ao longo das últimas décadas para elucidar os genomas dos micro-organismos não cultiváveis, com o objetivo de compreender melhor a ecologia microbiana global. Esse método foi impulsionado pelo aumento da biotecnologia e das novas demandas pelos conhecimentos a respeito das enzimas e biomoléculas (SCHMEISSER, 2007).

Diversos autores brasileiros, quando realizam estudos moleculares, utilizam a ferramenta BLAST, disponível no E. U. National Center for Biotechnology Information (NCBI), para realização das correspondências entre as sequências encontradas, sugerindo uma padronização entre as análises (CRISPIM et al., 2004; GAYLARDE et al., 2005).

#### 4.6 O USO DE BIOCIDAS

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 de água, visam a 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; PROENÇA, 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 dos materiais rochosos. No entanto, a maioria dos biocidas, de uso corrente, foi desenvolvida para fins agrônômicos 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; SALVADORI, 1996).

No controle da biodeterioração de monumentos por fungos e bactérias, são empregadas, como foi dito, diversas substâncias químicas. As publicações científicas do País e do exterior recomendam uma diversidade de produtos adequados a esta problemática, como enzimas, biocidas (bactericidas, fungicidas e algicidas), tensoativos e sabões, taninos, fenóis e gases, como o óxido de etileno (LOPES, 2003).

Oliveira (1988) realizou pesquisas utilizando o biocida químico Preventol no controle da biodeterioração por fungos, que comprometia a camada pictórica do mural artístico de Genaro de Carvalho, localizado no Hotel da Bahia, em Salvador-BA. Os resultados do tratamento com o biocida Preventol foram satisfatórios, pois demonstrou redução no crescimento dos fungos. No entanto, o controle da umidade torna-se, também, uma medida necessária para o controle da biodeterioração, segundo recomendação do pesquisador.

Dentro desse enfoque, estudos foram realizados a fim de comprovar a eficácia da mistura 1:1 de Sulfato de Zinco com Sulfato de Cobre, como agentes biocidas no tratamento de superfícies exteriores de arenito contaminado por fungos e bactérias, como o trabalho realizado por Lopes (2003), em dois monumentos históricos no município de Lapa-PR. Nele, foi demonstrado que a mistura dos dois biocidas apresentou eficácia comprovada na redução da população microbiana e, conseqüentemente, no controle da biodeterioração.

Os estudos realizados por Resende (2008) relatam que o cobre é muito usado por profissionais da área da preservação do patrimônio histórico, por ser uma substância extremamente tóxica às células dos microorganismos, em especial devido ao sinergismo (efeito combinado) com diferentes substâncias orgânicas. Além disso, o cobre tem efeito letal sobre bactérias e fungos, mesmo em doses baixas.

França (2009) realizou ensaios em laboratório a fim de avaliar a eficácia dos biocidas Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e Sulfato de Zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) no combate aos fungos dos gêneros *Aspergillus* sp, *Phialophora* sp e *Penicillium* sp, em comparação aos biocidas Timol e Vancide, atualmente empregados na área de restauro, bem como definir a concentração mais eficaz. Para tanto, discos de micélio de 5 mm de cada gênero foram expostos e cultivados em meio de cultura, acrescido do biocida nas concentrações 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%. Utilizou-se, como critério de avaliação da eficácia do biocida, a inibição do crescimento do micélio fúngico. O resultado apresentado sugere o Sulfato de Cobre e o Sulfato de Zinco como bons agentes biocidas, e a concentração 1,0%, como a melhor a ser aplicada, por ser a menor concentração que obteve melhor eficácia.

Essa alternativa deve mostrar melhores resultados em virtude do uso sinérgico por meio de um consórcio de dois biocidas, com princípios ativos diferentes, já que as substâncias atuam em duas vias celulares diferentes no combate aos micro-organismos que degradam os monumentos. Tais procedimentos concordam com o descrito por Rodin e outros (2005), em cujo trabalho relatam que, embora os biocidas sejam amplamente utilizados para controlar a biodegradação de materiais industriais, a aplicação de determinados tipos de produtos químicos em grandes concentrações suficientes para matar os micro-organismos, não é frequente, devido ao risco de poluição ambiental. Uma maneira de resolver esse problema é usar misturas sinérgicas de biocidas, o que permite redução significativa nas concentrações dos componentes individuais.

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.

Kumar (1999) relata que, idealmente, os biocidas utilizados no campo da conservação da pedra devem ter alto LD50 (dose letal para exterminar 50% da população de ratos - mamífero). Os produtos devem ser tóxicos para alvejar os organismos vivos, mas não apresentar riscos de saúde para quem os aplica, nem introduzir outros perigos ambientais

De acordo com a Portaria nº 03 da ANVISA de 1992, com base nos valores da DL50, a referida agência de saúde pública têm atribuído várias categorias de perigo para produtos químicos tóxicos em ordem decrescente de risco humano. As substâncias são consideradas extremamente tóxicas (classe I), quando a DL50 oral está entre 0 e 20 mg/Kg. Estas são altamente tóxicas (classe II), quando a DL50 oral está entre 20 e 200 mg/Kg. A categoria medianamente tóxica (classe III) é atribuída a substâncias com um valor de DL50 oral entre 200 e até 2000 mg/Kg, e, por fim, pouco tóxica (classe IV) de DL50 oral superior a 2000 mg/Kg. Do exposto, fica evidente que, quanto maior a LD50, menor será a toxicidade da substância.

O produto Timol (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O) é um biocida à base de fenol, de coloração branca, em aspecto granulado, possui baixa solubilidade em água (0,98 g/l em 25°C), e, conforme o Certificado de Análise (C.A.) de um dos fabricantes, a Merck, no ensaio de toxicidade, este produto possui mediana toxicidade (DL de 980 mg/Kg), por via oral. Segundo Tortora (2006), os compostos fenólicos agem diretamente na estrutura celular dos fungos, rompendo a membrana plasmática e desnaturando as enzimas. O custo médio do produto no mercado brasileiro é de: R\$: 162,00 / Kg, com mais o custo em torno de R\$: 2,00 / L do álcool etílico comercial 46 INPM, o que é suficiente para a preparação de 200 L de solução alcoólica a 0,5% de Timol. Esta solução do biocida sai por um custo total de R\$: 562,00.

Segundo o C.A. do fabricante exclusivo Lanxess, o biocida usado no trabalho, Preventol BP (C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>ClO), é um produto à base de clorofenol, de coloração incolor a amarelada, de aspecto escamoso e com alta solubilidade em álcool etílico (> 3000 g/l em 20°C). Conforme o ensaio de toxicidade, este produto possui pouca toxicidade (DL50 de 5000 mg/Kg), por via oral em ratos. Ainda segundo o fabricante, o produto age em bactérias (principalmente nas grans-positivas), microalgas e fungos. O custo do produto sai em torno de: R\$ 42,00 / Kg, com mais o custo médio de R\$: 2,00 / L do álcool etílico comercial 46 INPM, o que é suficiente para a preparação de 200 L de solução alcoólica a 0,5% de Preventol BP. Esta solução do biocida sai por um custo total de R\$: 442,00.

A mistura alternativa sugerida para pulverização nos monumentos trata-se do consórcio 1:1 de Sulfato de Cobre (CuSO<sub>4</sub>) com Sulfato de Zinco (ZnSO<sub>4</sub>). Segundo Tortora (2006), os compostos metálicos à base de Cobre e Zinco agem diretamente na estrutura celular dos fungos e bactérias, rompendo a membrana plasmática e desnaturando as enzimas e proteínas.

O Sulfato de Cobre é um produto à base de Cobre, que é vendido comercialmente na forma pentahidratada (CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O), de coloração

azul, em forma de cristais, e possui alta solubilidade em água (317 g/l em 20°C). Conforme o C.A. de um dos fabricantes, a Merck, no ensaio de toxicidade, este produto possui mediana toxicidade (DL50 de 960 mg/Kg), por via oral em ratos. O preço médio deste produto hidratado no mercado brasileiro custa: R\$: 13,00 / Kg.

Já o Sulfato de Zinco é um produto à base de Zinco, sendo vendido comercialmente na forma heptahidratada ( $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ ). É de coloração branca, em forma de cristais, e possui alta solubilidade em água (965 g/l em 20°C). Conforme o C.A. de um dos fabricantes, a Merck, no ensaio de toxicidade, este produto possui mediana toxicidade (DL50 de 1260 mg/Kg), por via oral em ratos. O preço médio deste biocida no Brasil custa: R\$:6,00 / Kg.

A preparação de 1 kg da mistura 1:1 de Sulfato de Cobre pentahidratado com Sulfato de Zinco heptahidratado é suficiente para a elaboração de 60 L de solução aquosa. Esta solução do biocida alternativo sai por um custo total de R\$: 9,50.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em monumentos religiosos da Bahia, que são os conventos franciscanos localizados nos municípios de Salvador, São Francisco do Conde e Cairu, conforme Figura 3.



Figura 3 . Localização dos municípios de Salvador, São Francisco Conde e Cairu na Bahia. Escala:1/3500  
Fonte: CAR (2004).

O Convento de São Francisco de Salvador-BA (Figura 4) está localizado a 12° 58' 28.81" S 38° 30' 32.52" W, na Praça Anchieta, s/n, no Terreiro de Jesus, Distrito da Sé, no centro histórico da cidade. O conjunto é formado pela Igreja e Convento de São Francisco (Ordem 1<sup>a</sup>) e a Igreja da Ordem Terceira de São Francisco, conforme mapa do local (Figura 5). Seu sítio foi tombado pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) por seu valor histórico, arquitetônico e cultural, bem como os seus monumentos de forma individual.

A edificação do convento possui um subsolo e dois pavimentos acima do nível da rua. O pátio interior do claustro está delimitado pelas 36 colunas de pedra e seus arcos, e as galerias do pavimento inferior e superior, conforme a planta no Anexo A. As quatro alas do claustro possuem suas paredes revestidas de magníficos painéis de azulejos portugueses.

(1<sup>a</sup> ordem) Figura 4 . Fachada da Igreja de São Francisco de Salvador-BA  
Fonte: Foto do acervo do autor.

Figura 5 . Mapa da Localização geográfica do convento de São Francisco de Salvador-BA. Fonte: GOOGLE MAPS BRASIL (2010).

Segundo Santos e outros (2008), o convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA (Figura 6) apresenta-se como a primeira manifestação de uma arquitetura genuinamente brasileira, e foi construído no século XVII dentro da Escola Franciscana do Nordeste. Com uma área de 4,2 mil metros quadrados, conforme a planta no Anexo B, o conjunto arquitetônico possui dois pavimentos em torno de um claustro, além de uma construção anexa na qual há um salão e um amplo espaço em ruínas, que seria a Igreja da Ordem Terceira.

O convento franciscano Santo Antônio de Cairu-BA está em avançado estado de degradação, conforme relata Argolo (2009). Atualmente, o

monumento histórico continua sendo restaurado com o apoio da PETROBRAS (Petróleo Brasileiro S.A.), sendo fiscalizado pelo IPHAN.

Figura 6 . Convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA  
Fonte: Foto de Oliveira (2006).

O convento de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA (Figura 7) foi inaugurado em 1636 e nasceu da reivindicação dos moradores da futura Vila de São Francisco, que solicitavam a construção de um convento franciscano. O monumento, que é composto por Igreja da Primeira Ordem, convento e igreja da Ordem Terceira, localiza-se na Praça Arthur Sales, integrando o Centro Histórico da Cidade, sendo que está desenvolvido em dois pisos em torno de um claustro, conforme a planta no Anexo C, sendo um patrimônio tombado pelo IPHAN.

O convento franciscano de Santo Antônio, no município de São Francisco do Conde, possui um valioso acervo artístico que conta com peças sacras, 24 painéis de azulejos figurados com as imagens da vida de Santo Antônio, mobiliário, etc. Em frente ao conjunto, há palmeiras imperiais, dispostas paralelamente à fachada do convento, preservando a memória e a herança colonial portuguesa. No fundo do monumento, uma encosta revestida de vegetação tropical cai abruptamente sobre a baía.

Figura 7 . Fachada da igreja do convento franciscano de Santo Antônio (1ª ordem)  
de São Francisco do Conde-BA  
Fonte: Foto do acervo do autor.

## 5.2 DIAGNÓSTICO VISUAL, ANÁLISES AMBIENTAIS E COLETAS DAS AMOSTRAS

Na realização da diagnose visual, coletas e análises ambientais (temperatura, umidade e luminosidade), no dia 29/03/2010, foram previamente selecionados dez pontos de cada monumento. No convento de São Francisco de Salvador, os pontos de coletas foram distribuídos nas regiões internas (cantaria do claustro inferior, claustro superior, sala do coro, torre sineira, telhado de acesso ao capitulo e praça da alegria) e externas (claustro inferior, claustro superior, salão anterior ao coro e a portaria lateral de acesso da Ordem 1ª para a Ordem 3ª).

Já quanto ao convento franciscano Santo Antônio de São Francisco do Conde, no dia 30/03/2010, foram coletadas amostras na região interna

(coluna da nave, biblioteca, coro, painel de azulejaria da nave, sala de estudos e púlpito), na região exterior (biblioteca, claustro superior, fachadas da galilé e sala de estudos).

Essas áreas foram selecionadas em função de apresentarem sinais de biodeterioração e, conseqüentemente, comprometimento estético do local. A diagnose visual foi realizada através de registros fotográficos com câmera digital Olympus® modelo X-775 de 7.1 megapixel e anotações da localização e tipo do substrato, bem como características visuais do biofilme.

Ainda, no local, foi determinada a temperatura do substrato com o auxílio de um termômetro de infravermelho Noncontact Thermometer® modelo Raytec Minitemp MT-4.

Foi utilizado ainda, para determinar pontualmente a temperatura e umidade relativa do ambiente, o termo-higrômetro digital Minipa® de modelo MT-242, no substrato de madeira, as análises foram feitas com um xilo-higrômetro modelo MTB-13-PKF. Foi verificada pontualmente a luminosidade dos locais das coletas, com um Luxímetro Digital Minipa® modelo MLM-1011 (Figura 8).

Figura 8 . Equipamentos usados nas análises ambientais dos conventos:

Luxímetro digital, termo-higrômetro, GPS e termômetro de infravermelho  
Fonte: Foto do acervo do autor.

Nos conventos franciscanos de Salvador e de Santo Antônio de São Francisco do Conde foram realizadas coletas em duas etapas simultaneamente, que foram feitas com o auxílio de um bisturi desinfetado com álcool a 70% (Figura 9) para raspagem superficial do biofilme. Das amostras coletadas, um grupo foi encaminhado à análise microbiológica quantitativa. Dessas amostras, 20 foram identificadas e acondicionadas em placas de Petri estéreis e transportadas, em caixas isotérmicas com gelo, para o laboratório de Microbiologia da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME), em Lauro de Freitas . BA.

Figura 9 . Raspagem superficial do biofilme, realizada nos conventos de Salvador (A)

e de São Francisco do Conde-BA (B) em 29 e 30/03/2010

Fontes: Fotos do acervo do autor.

As coletas realizadas em todos os monumentos em estudo foram feitas, conforme descrito em Resende (2008).

A análise qualitativa da Biologia Molecular foi realizada em função de parceria estabelecida entre o Núcleo de Tecnologia da Preservação e da Restauração (NTPR) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA (UEFS). Assim, outro grupo de amostragem foi destinado à análise qualitativa no LAPEM. As 20 amostras também foram identificadas e acondicionadas em placas de Petri estéreis e transportadas em caixas isotérmicas com gelo para o laboratório de Microbiologia da UNIME, onde foram acondicionadas em freezer com temperatura abaixo de 0° C, até seu transporte no dia 31/03/2010 para o local da análise da Biologia Molecular.

Para o convento franciscano de Santo Antônio de Cairu, a coleta das amostras foi realizada no dia 11/09/2007 (Figura 10), onde foram executadas em 13 locais distribuídos tanto interna (sete) como internamente (seis). Assim, os locais de coleta foram: portaria, capítulo, capela-mor, nave, chaminé, sacristia e forro de madeira da nave (ambiente interno), claustro, torre, galilé, cozinha, pináculos da torre e sacristia (ambiente externo).

O diagnóstico visual consistiu em avaliar as condições de degradação do local para identificação de regiões que apresentassem manchas escuras e com pigmentos característicos de presença de fungos. Foi anotado também o tipo de substrato onde foi verificado o crescimento fúngico. Esta etapa foi registrada com o auxílio de uma câmera fotográfica digital da Sony Cyber-Shot de 4.1 mega pixels.

No momento da coleta, foram medidos parâmetros ambientais pontuais a que o material estava exposto, como temperatura e umidade do ambiente, o pH e condutividade do substrato. No convento franciscano de Santo Antônio de Cairu, não foi realizada a análise de luminosidade pontual do ambiente devido a que, na época desta etapa, não dispúnhamos do aparelho para este ensaio.

Para determinação da condutividade, foram diluídos de 1g do material rochoso ou madeira (substrato) em 5 ml de água deionizada recentemente fervida em um béquer de vidro de 100 ml. Após 60 minutos, realizou-se a leitura com o auxílio de um condutímetro . GLM 020.

O pH em água foi determinado em suspensão 1:2,5 do material rochoso ou madeira (substrato): água, sendo colocado 1 g desse material em um béquer e, em seguida, adicionados 2,5 ml de água deionizada e fervida. A amostra foi agitada e mantida em repouso por 1 hora. A leitura foi realizada usando-se potenciômetro de eletrodo combinado . WTW digital pH Meter.

As amostras foram processadas no LAVIET (Laboratório de Alternativas Viáveis a Impactos em Ecossistemas Terrestres), localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, localizada em Salvador-BA.

Figura 10 . Procedimento de coleta das amostras no interior (A) e exterior (B) do

Convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

### 5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA QUANTITATIVA

No laboratório de microbiologia da UNIME, as amostras foram pulverizadas com o auxílio de um almofariz médio e um pistilo de porcelana (esterilizados). De cada amostra, foi pesado, em capela de fluxo laminar, 1 g do material e adicionado a 10 ml de solução de tween 80, em água destilada estéril a 0,001%. Esse material foi transferido para um tubo de ensaio de vidro, de 25 ml, esterilizado e, em seguida, agitado durante uma hora (Figura 11), de acordo com a metodologia descrita por Resende (2008). Segundo a metodologia de diluição em série proposta por Wollum (1982), da suspensão agitada retirou-se, com o auxílio de uma pipeta volumétrica estéril, 1 ml e adicionou-se a 9 ml de água destilada (10-1). Dessa diluição, coletou-se 1 ml e adicionou-se a 9 ml de água destilada (10-2). Este procedimento se repetiu até a diluição 10-3.

Figura 11. Preparo de amostras (A e B) para ensaios microbiológicos

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Da última diluição, foram retiradas, com a ajuda de uma pipeta estéril, duas alíquotas de 0,1 ml da suspensão para serem semeadas em duplicata nas placas de Petri contendo os meios Agar Sabouraud Dextrose 4% e o meio de cultura PCA (Plate Count Ágar), pela técnica de esgotamento em superfície, usando a alça de Drigalsky. Esses meios de cultura são específicos para inoculação e análise quantitativa de fungos e bactérias, respectivamente, sendo que, para as amostras do convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA, utilizamos exclusivamente os meios Ágar Sabouraud Dextrose 4% e Czapec-Dox

Ágar (Figura 12) para fungos, pois apenas este grupo consistiu no objeto de estudo da nossa monografia (SANTOS, 2007).

Figura 12 . Procedimento para inoculação dos meios de cultura A e B  
Fonte: Fotos do acervo do autor.

Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa Fanem® 502 à temperatura ambiente de 25 °C a 28 °C, durante um período de 7 dias, para fungos, e temperatura de 35 °C, durante um período de 24 a 48 horas, para bactérias (MILLER et al., 2006). Após essa incubação, realizou-se a análise quantitativa com o contador de colônias Phoenix® CP-608 (Figura 13).

Figura 13 . Verificação das unidades formadoras de colônias (UFC) das Bactérias totais no laboratório de Microbiologia da UNIME  
Fonte: Fotos do acervo do autor.

#### 5.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA QUALITATIVA DOS FUNGOS

De cada placa contendo colônias mistas de fungos, foi coletado um fragmento das colônias que apresentaram crescimento típico de fungo filamentoso. Cada morfotipo foi, então, repicado, de forma asséptica, com o auxílio de uma agulha de platina estéril, para uma placa contendo meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose.

Para tanto, utilizou-se a repicagem das colônias. Este procedimento consistiu em esterilizar a agulha de platina na chama do bico de Bunsen e esfriar em tubo com água destilada esterilizada. Abriu-se a placa de forma que a tampa ficou perpendicular ao fundo. Introduziu-se a agulha de platina na placa com a cultura de fungos, tocou-se a colônia escolhida na superfície do centro da placa. Em seguida, fechou-se a placa. Flambou as bordas da placa com meio Agar Sabouraud Dextrose a ser inoculado na chama do bico de Bunsen. Abriu-se a placa de forma que a tampa ficou perpendicular ao fundo. Em seguida, introduziu-se a agulha de platina na placa, tocando a colônia coletada na superfície do centro da placa e se fechou depois a placa. Identificou-se o material e incubou-se a 25 °C a 28 °C em incubadora por sete dias (Figura 14).

Esta técnica possibilita o isolamento dos morfotipos puros e isolados em meio de cultura sólido (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2004).

Figura 14 . Cultura de fungo repicada no laboratório da UNIME

Fonte: Foto do acervo do autor.

Outra técnica empregada no cultivo dos fungos foi a de microcultivo (MENEZES, 2004). Nesta técnica, foram utilizadas placas contendo, no seu interior, um disco de papel-filtro, um suporte de lâmina (bastão de vidro ou lâmina de vidro), lâmina e lamínula. Em seguida, colocou-se em ambos os lados da lâmina dois blocos do meio Agar Sabouraud Dextrose (+- 2,0 cm<sup>2</sup>). Sobre esse material, foi feita a inoculação de fragmentos da colônia que se desejava cultivar, adicionando-se um fragmento em cada extremidade. Em seguida, o preparado foi coberto com lamínula e o papel de filtro foi umedecido. A placa foi mantida na temperatura ambiente por cerca de 5 dias (Figura 15). Quando o crescimento pareceu visualmente suficiente, a lamínula foi retirada com o auxílio de uma pinça esterilizada, cuidando-se para que não se rompesse o micélio aderido na face inferior da lamínula.

Figura 15 . Realização da técnica de microcultivo

Fonte: Foto do acervo do autor.

Para a identificação das espécies, foram observadas as características macroscópicas das colônias, como cor (verde, preta, branca), aspecto das colônias (algodonosa, pulverulenta, aveludada) e do seu verso (rugoso, liso, sem coloração), se apresentavam crescimento limitado ou se invadiam a placa. As características foram anotadas em uma planilha, visando auxiliar na identificação posterior em comparação com as pranchas.

De cada colônia, foram preparadas lâminas permanentes. A partir dessas lâminas, foi possível visualizar estruturas indispensáveis para identificação das espécies como: tipo de célula conidiogênica, conídios, conidióforos e tipo das hifas somáticas. Para o preparo das lâminas permanentes, colocou-se uma gotícula de solução da resina PVL (álcool polivinílico, ácido láctico e fenol). Retirou-se uma pequena área da cultura de fungos, e foram selecionadas estruturas (hifas, conidióforos e

conídios) com o auxílio de uma lupa binocular. Em seguida, misturou-se com a gotícula de solução da resina PVL da lâmina. A lâmina com o preparo foi coberta com uma lamínula. Depois, foi levada ao microscópico para observação com a objetiva de 10x e de 40x. O tempo de secagem das lâminas foi de 3 a 5 dias em temperatura ambiente.

A partir da literatura especializada, Barnett e Barry (1998), Carmichael e Kendrick (1981) e Ellis (1976), foram feitas identificações das morfoespécies isoladas, nos diferentes substratos do convento.

Visando manter as culturas dos fungos isolados dos conventos franciscanos em estudo para posteriores pesquisas, foi realizado o procedimento para preservação de amostras em água destilada, conforme descrito por Castellani (1967). Este procedimento visa substituir o meio de cultura por água destilada esterilizada. Essa preservação confere uma boa estabilidade da cultura, dispensando, assim, repiques sucessivos dos cultivos de fungos e assegurando a preservação das culturas fúngicas para estudos posteriores. Para tanto, foram selecionadas placas do meio sólido Agar Sabouraud Dextrose contendo a cultura de fungos a ser preservada. Essa operação foi realizada com luva e em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação do material e assegurar a biossegurança do ambiente. Foram cortados, com o auxílio de um bisturi esterilizado, dois blocos do meio de cultura contendo o fungo (aproximadamente 2,0 cm<sup>2</sup>) e, em seguida, dispensou-se em frasco de vidro contendo água destilada esterilizada (diâmetro de 1,5 a 6,5 cm de altura) com boca de rosca e tampa de borracha. Os frascos foram tampados hermeticamente e identificados, sendo acondicionados em temperatura ambiente (Figura 16).

Figura 16 . Fungos sendo preservados e água destilada (A e B)

Fonte: Fotos do arquivo do autor.

## 5.5 ANÁLISE MOLECULAR DOS FUNGOS

As análises moleculares foram realizadas no LAPEM da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA, para as amostras dos conventos



franciscanos de Salvador e de Santo Antônio de São Francisco do Conde. Após as análises microbiológicas quantitativas na UNIME, as colônias de fungos cultivados foram isoladas em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose e submetidas, em seguida, a extração do DNA no LAPEM da UEFS.

Em relação ao convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA, não foi realizada a análise de Biologia Molecular nos micro-organismos presentes nas amostras coletadas e, sim, apenas a análise qualitativa de fungos por meio da identificação via Taxonomia clássica. Isto ocorreu em função de ainda não ter sido estabelecida a parceria entre o NTPR e o LAPEM, na época do estudo.

### 5.5.1 Extração e purificação do DNA

Em uma primeira etapa, as amostras cultivadas foram retiradas do meio de cultura e maceradas com o auxílio de cadinho médio e pistilo de porcelana esterilizados (Figuras 7 e 8). Em seguida, 0,5 g (w / w) do material previamente macerado (Figura 17) foi adicionado a 5 g de uma mistura de perolas de vidro com tamanhos 425-600

µm e 150-212 µm (Sigma), e submetidos ao sistema FastPrep (MPBio) de agitação e lise celular automatizada, por 30 s, a uma velocidade 5,5 m/s. Além da mistura de pérolas de vidro, foi utilizado 0,5 mL de CTAB (pH 8,0) e 0,5 ml de álcool fenol-clorofórmio-isoamílico (25:24:1) (GRIFFTHS et al., 2000).

Figura 17 . Amostras sendo maceradas (A e B) para extração do DNA no LAPEM da UEFS

Fonte: Fotos do acervo do autor.

O tampão de extração CTAB foi modificado do método de Kowalchuk e outros (1998), utilizando-se uma mistura de volumes iguais de 10% (w / v) CTAB (Sigma, Poole, Reino Unido) em 0,7 M NaCl com tampão fosfato de potássio 240 mM, pH 8.0. Após a lise, as amostras foram centrifugadas a 16.000 rpm por 5 minutos, a 4 °C (Figura 18).

Figura 18 . Amostras (A e B) sendo centrifugadas durante a extração do DNA no LAPEM da UEFS

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Em um passo seguinte, a fase aquosa foi recuperada após a centrifugação e precipitada com 01 (um) volume de isopropanol à temperatura ambiente, por 24 h. Os pelletes contendo ácidos nucleicos foram obtidos por centrifugação a 16000 X g por 20 minutos à

temperatura ambiente (Figura 19), lavado com etanol a 70% e ressuspendido com água ultrapura autoclavada, obtendo-se um volume final de 100  $\mu$ L (ZHOU, 1996; RONDON, 2000).

Figura 19 . Amostras (A e B) após purificação do DNA no LAPEM da UEFS

Fonte: Fotos do acervo do autor.

### 5.5.2 Amplificação do DNA

Para amplificação das cópias de DNA, foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), sendo que, para a microbiota fúngica, foram usados os primers ITS5 (5qGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3q e ITS4 (5qTCCTCCGCTTATTGATATGC-3q (WHITE et al. 1990).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) simétrica foi a técnica empregada para amplificar os fragmentos-alvo. As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µl, com as seguintes concentrações finais: tampão de amplificação a 1X, dNTPs a 10 mM, MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM, iniciadores a 0,5 pMol/µl, 0,1 a 10 mg de DNA genômico, Taq DNA Polymerase a 0,02 U/µl da Invitrogen, DMSO e água ultrapura autoclavada (q.s.p. 25 µl). Os parâmetros das reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram os seguintes: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, anelamento a 53 °C por 55 segundos, e extensão a 72 °C por 1,2 minutos e a 72 °C por 7 minutos de extensão final no termociclador (Figura 20) . Controles negativos, sem DNA, foram preparados em cada uma das diversas séries de amplificação para se excluir a possibilidade de contaminação dos reagentes.

Figura 20 . Amostras sendo submetidas a diversos ciclos na análise de PCR

Fonte: Foto do acervo do autor.

Após o término da reação, 3,0 µl de cada amostra amplificada foi submetida à eletroforese em gel de agarose (Figura 21), na concentração de 1%, preparados em TAE 1x com SYBR Safe Invitrogen a 1:10.000. As amostras de DNA para a análise em gel foram preparadas com um tampão de amostra azul de bromofenol (SAMBROOCK; RUSSELL, 2001). A eletroforese foi feita em TAE 1x com 70 V, 60 mA e 60 W, por 90 minutos. A separação dos fragmentos de DNA foi visualizada através de transiluminador de luz ultravioleta e os géis fotografados no sistema de fotografia digital Lpix Image.

Figura 21 . Amostras submetidas à eletroforese no LAPEM da UEFS

Fonte: Foto do acervo do autor.

Em seguida, os produtos de PCR (Figura 22) foram purificados com kit PureLink Invitrogen, adicionando-se 4x de tampão de ligação (fornecido pelo fabricante) com isopropanol para cada volume de produto de PCR (50-100 µL) contidos em uma coluna PureLink acoplada em um tubo de 1,5 ml. O material foi centrifugado em T.A. por 1 minuto a 10.000 x g, e a coluna transferida para um novo tubo. Em seguida, foram adicionados

650  $\mu$ l de tampão de lavagem (fornecido pelo fabricante) com etanol, seguindo para uma nova centrifugação, e, após o descarte da solução filtrada, procedeu-se a outra centrifugação, em velocidade máxima por 3 minutos para total remoção do tampão. A coluna foi transferida para um tubo de 1,7 ml, adicionando-se 50  $\mu$ l de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) fornecido pelo fabricante. O material foi incubado por 1 minuto e centrifugado por 2 minutos, à velocidade máxima. A coluna foi descartada e o material recuperado, contendo os produtos de PCR purificados, armazenado a -20 °C.

Figura 22 . Produtos do PCR para sequenciamento do material fúngico extraído

Fonte: Foto do acervo do autor.

### 5.5.3 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado com os mesmos primers utilizados para amplificar as sequências eucarióticas. Os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma reação de sequenciamento com o Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 ml em um volume total de 10  $\mu$ l, sendo 3  $\mu$ l de mistura do kit de sequenciamento, 3  $\mu$ l de água ultrapura, 2,0  $\mu$ l (3,2 pmol/  $\mu$ l) de solução do iniciador, e 30 ng (2  $\mu$ l) de amplicon purificado. Após a reação de sequenciamento, os produtos da reação foram purificados através de precipitação com acetato de sódio 3 M pH 4.6 e etanol 95% resfriado, com subsequentes lavagens (mínimo de duas vezes), com etanol 70%, seguida de secagem e suspensão do sedimento em 18  $\mu$ l formamida + EDTA. As sequências foram obtidas através da eletroforese capilar em sequenciador automático (modelo 3130 xl Genetic Analyser da HITASH) (Figura 23), com duas repetições de cada fragmento, em ambos os sentidos (direto e reverso).

Figura 23 . Produtos do PCR sendo processados no sequenciador automático

Fonte: Foto do acervo do autor.

### 5.5.4 Identificação das espécies dos micro-organismos

Em posse dos produtos sequenciados, realizou-se uma pesquisa no banco de dados Blast, disponível online no NCBI, E. U. National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>], para fins de identificação de gêneros e/ou espécies dos micro-organismos presentes nas amostras dos conventos franciscanos de Salvador e de Santo Antônio, de São Francisco do Conde, na Bahia.

## 5.6 APLICAÇÃO DOS BIOCIDAS NOS CONVENTOS

Nesta etapa, foram aplicados os biocidas nas concentrações 0,5 1,0 e 2,0%, sendo uma mistura 1:1 de: Sulfato de Cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) com Sulfato de Zinco heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), previamente dissolvidos em água destilada estéril, no combate aos micro-organismos dos biofilmes, comparando a ação desses biocidas com os biocidas Timol ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ ) e Preventol BP ( $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClO}$ ), nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente, sendo estes dois últimos biocidas dissolvidos em álcool etílico a 92,8 INPM.

Todos os biocidas foram testados em campo em dois diferentes locais de cada monumento, escolhidos com base na maior ocorrência quantitativa dos micro-organismos nos substratos já analisados. Em seguida, foi demarcado com o auxílio de lápis de cera colorido nas cores amarelo (Timol), vermelho (Preventol BP) e verde (Sulfato de Cobre  $5\text{H}_2\text{O}$  com Sulfato de Zinco  $7\text{H}_2\text{O}$ ), delimitando-se cada área de aplicação em um espaço de  $100 \text{ cm}^2$ , mensurado através de uma trena, conforme metodologia de Nugari e outros (2009).

Os testes em cada substrato foram feitos nas três diferentes concentrações, para cada um dos três biocidas, totalizando nove quadrados. As aplicações foram realizadas no ambiente interno e o mesmo número para o ambiente externo, num total de 18 quadrados pulverizados, para cada monumento. Os biocidas foram aplicados com o uso de pulverizador e equipamentos de Proteção Individual (EPI) como luvas, óculos, roupas adequadas, avental de Policloreto de Vinila (PVC), máscara respiratória com filtro e sapato fechado.

Para assegurar absorção total do líquido e gerar efeito residual dos biocidas nos substratos aplicados, foi realizada uma pulverização adicional em intervalos curtos (cerca de 5 minutos), após a primeira aplicação.

No convento de São Francisco de Salvador, foi feita aplicação no dia 10/08/2010, pela tarde, na parede do claustro superior, na região interna e na face externa (Figuras 24 e 25).

Figura 24 . Biocidas aplicados (A e B) na área externa do claustro superior do convento de São Francisco de Salvador-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Figura 25 . Biocidas aplicados (A e B) na área interna do claustro superior do convento de São Francisco de Salvador-BA

Fonte:Fotos do acervo do autor.

Para o convento franciscano Santo Antônio, de São Francisco do Conde, foi realizada a aplicação no mesmo dia pela manhã, tanto na parede da Biblioteca, no interior, como na parede da sala de estudos no exterior (Figuras 26 e 27).

Figura 26 . Biocidas aplicados (A e B) na área interna da biblioteca do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Figura 27 . Biocidas aplicados (A e B) na área externa da sala de estudos do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Por fim, no dia 11/08/2010 pela manhã, foi feita a aplicação dos biocidas no convento franciscano Santo Antônio de Cairu-BA, na parede interna da chaminé da cozinha e nas colunas externas do claustro (Figuras 28 e 29).

Figura 28 . Biocidas aplicados (A e B) na área interna da chaminé da cozinha do convento franciscano de Cairu-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Figura 29 . Biocidas aplicados (A e B) na área externa do claustro inferior do convento franciscano de Cairu-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

#### 5.7 COLETAS DAS AMOSTRAS APÓS APLICAÇÃO DOS BIOCIDAS

Após um período de 30 dias foi feita nova coleta nas áreas delimitadas por quadrados pulverizados em cada monumento, para fins de verificação da abundância dos microrganismos que compõem os biofilmes após a aplicação dos biocidas. Ver 5.3.

No convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA, as coletas para nova análise microbiológica quantitativa foram realizadas no dia

07/09/2010, na área interna da parede da chaminé da cozinha (A) e na região externa da coluna do claustro inferior (B), conforme Figura 30.

Figura 30 . Coletas das amostras após 30 dias de aplicação dos biocidas na área interna da chaminé (A) e externa do claustro inferior (B) do convento franciscano de Cairu-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

No dia 08/09/2010, no período da manhã, foram realizadas as coletas dos substratos testados do convento franciscano de Santo Antônio em São Francisco do Conde-BA, na parede da biblioteca, na área interna (A) e na área externa da sala de estudos (B), conforme Figura 31.

Figura 31. Coletas das amostras após 30 dias de aplicação dos biocidas na área interna da biblioteca (A) e externa da sala de estudos (B) do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Por fim, também no dia 08/09/2010, no período da tarde, foram efetuadas as coletas dos substratos testados no convento de São Francisco de Salvador no claustro superior, na área interna (A) e externa (B), conforme Figura 32.

Figura 32 . Coletas das amostras dos substratos após 30 dias de aplicação dos biocidas na área interna (A) e externa (B) do claustro superior do convento de São Francisco de Salvador-BA

Fonte: Fotos do acervo do autor.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir da análise quantitativa das espécies de bactérias e fungos antes e após os diferentes tratamentos com os biocidas nas 3 concentrações testadas (0,5, 1,0 e 2,0%) nas áreas em estudo dos monumentos, foi elaborada uma matriz no Microsoft® Office EXCEL 2010 juntamente com os dados de abundância dos micro-organismos. Em seguida, os dados foram tratados estatisticamente no programa STATISTICA® versão 7.0 (Statsoft, 2004). Neste foi realizada uma análise de variância de múltipla entrada, buscando avaliar o melhor tratamento entre os biocidas testados no controle das bactérias e fungos presentes nos biofilmes dos monumentos estudados.

Apenas para o Convento de São Francisco de Cairu foi realizada a integração multivariada entre as variáveis ambientais (temperatura, umidade relativa, condutividade e pH) e as espécies de fungos, processada através da análise canônica de correspondência (ACC). Esta técnica é altamente empregada em ecologia (VALENTIN, 2000) e objetiva a integração dos dados possibilitando a visualização de padrões. Para a realização da mesma foi utilizado o pacote estatístico CANOCO® na versão 4.5. Nos conventos de São Francisco de Salvador e de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA, a análise multivariada não foi realizada, devido à falta de verificação das espécies dos fungos (presença e ausência) nos substratos analisados, o que nos impediu a integração com os dados ambientais.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CONVENTO FRANCISCANO DE CAIRU



### 6.1.1 Diagnose visual dos locais das coletas

Quadro 1 - Diagnose visual e principais características verificadas nos locais de coleta situados no exterior do convento franciscano de Cairú-BA

PONTO	LOCALIZAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	OBSERVADAS EM CAMPO	REGISTRO FOTOGRÁFICO
-------	-------------	-----------------	---------------------	----------------------

4	Claustro	Presença de manchas escuras, parede de reboco com pintura de cal, em degradação intensa. Sinais de umidade.		
---	----------	---	--	--

7	Torre da igreja	Presença de manchas escuras e verdes, pulverulenta, a parede de elemento em cantaria, em degradação intensa. Sinais de chuva, salinidade, umidade e vento.		
---	-----------------	--	--	--

8	Galilé	Presença de manchas escuras e pulverulenta, contorno de calcário, em degradação intensa. Sinais chuva, umidade e vento.		
---	--------	---	--	--

9	Cozinha	Presença de manchas escuras e verdes. Aspecto pulverulento, parede de reboco e com pintura de cal, em degradação intensa. Sinais chuva, salinidade, umidade e vento.		
---	---------	--	--	--

Continuação...Quadro 1 - Diagnose visual e principais características verificadas nos locais de coleta situados no exterior do convento franciscano de Cairú-BA

PONTO	LOCALIZAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	OBSERVADAS EM CAMPO	REGISTRO FOTOGRÁFICO
-------	-------------	-----------------	---------------------	----------------------

10	Pináculos da torre	Presença de manchas escuras e verdes, aspecto pulverulento e aveludado, elemento de cantaria, em degradação intensa. Verificado sinais de chuva, salinidade, umidade e vento.		
----	--------------------	---	--	--

11	Sacristia no exterior	Presença de manchas escuras e pulverulenta, parede revestida com argamassa e com pintura de cal, em degradação intensa. Verificado sinais de chuva, umidade e vento.		
----	-----------------------	--	--	--

Quadro 2 - Diagnose visual e principais características verificadas nos locais de coleta situados no interior do convento franciscano de Cairú-BA

PONTO LOCALIZAÇÃO CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS EM  
CAMPO REGISTRO FOTOGRÁFICO

1 Portaria Presença de manchas marrons e verdes, parede revestida com argamassa e com pintura de cal, em degradação intensa. Sinais de umidade ascendente.

2 Capítulo Presença de manchas escuras e verdes, parede revestida de argamassa e com pintura de cal, em degradação moderada. Sinais de umidade e vento.

Continuação...Quadro 2 - Diagnose visual e principais características verificadas nos locais de coleta situados no interior do convento franciscano de Cairú-BA

3 Capela mor Presença de manchas escuras e verdes, parede revestida com argamassa e com pintura de cal, em degradação moderada. Sinais de umidade e vento.

6 Chaminé Presença de manchas escuras, verdes e vermelha, parede revestida com argamassa e com pintura vermelha. Sinais de poeira, gordura, calor e umidade.

5 Nave Presença de manchas escuras e marrons, parede revestida de argamassa. Sinais de poeira.

12 Sacristia no interior Presença de manchas escuras, verdes e pulverulenta, parede com revestimento de argamassa e com pintura de cal, em degradação intensa. Sinais de chuva, umidade e vento.

13 Forro da nave no interior Presença de manchas escuras e vermelha, aspecto algodinoso, forro de madeira com pintura barroca, em degradação intensa. Sinais de poeira.

### 6.1.2 Influência das condições ambientais na microbiota fúngica

Quadro 3 - Dados integrados com os parâmetros ambientais das áreas externas do convento franciscano de Cairu-BA

Local	Substrato	Morfotipos	Temperatura (°C)	Umidade relativa %
pH	Conductividade (µS.cm)			
Claustro	Parede de reboco	Aspergillus sp1, Paecilomyces sp2	28 98	9,00 114
Torre da Igreja	Parede de elemento em cantaria	Aspergillus sp1 e Aspergillus sp2	30 80	7,66 776
Galilé	Contorno de calcário	Aspergillus sp1, Aspergillus sp2 e Phialophora sp	28 98	7,20 1588
Parede da cozinha	Parede de reboco	Penicillium sp	30 80	8,90 195
Pináculos da torre	Elemento de cantaria	Aspergillus sp1, aspergillus sp 2, Phialophora sp, Paecilomyces sp1, Penicilium sp e Phialophora sp	30 80	8,53 1779
Sacristia	Parede revestida de argamassa	Aspergillus sp1, Aspergillus sp2 e Paecilomyces sp2	30 82	10,723410

Quadro 4 - Dados integrados com os parâmetros ambientais das áreas internas do convento franciscano de Cairu-BA

Local	Substrato	Morfotipos	Temperatura (°C)	Umidade relativa %
pH	Conductividade (µS.cm)			

Portaria	Parede revestida com argamassa	Phialophora sp	28	98	10,61	1260
Sala do Capitulo	Parede revestida de argamassa	Aspergillus sp1 e Phialophora sp	29	100	7,80	1576
Capela mor	Parede revestida de argamassa	Paecilomyces sp1 e Paecilomyces sp2	26	100	7,03	729
Nave da Igreja	Parede revestida de argamassa	Aspergillus sp1, Aspergillus sp2, Paecilomyces sp1, Paecilomyces sp 2, Phialophora sp, Rhizopus sp e Indeterminado	28	100	8,11	729
Chaminé	Parede revestida de argamassa	Aspergillus sp 1, Aspergillus sp 2 e Rhizopus sp	28	99	8,07	5930
Sacristia	Parede com revestimento de argamassa	Aspergillus sp1 e Phialophora sp	28	96	7,89	1159
Forro da nave	madeira	Aspergillus sp1, aspergillus sp 2, Phialophora sp, Paecilomyces sp1, Paecilomyces sp 2, Penicilium sp, Phialophora sp, Rhizopus sp e Indeterminado	28	96	7,20	720

Figura 33 - Gráfico da análise canônica de correspondência realizada entre as variáveis ambientais e os gêneros de fungos identificados no convento franciscano de Cairu-BA  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa CANOCO® (VALENTIN, 2000).

Figura 34 - Gráfico da análise canônica realizada entre os locais de coleta e tipos de substrato e os gêneros de fungos identificados do convento franciscano de Cairu-BA  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa CANOCO® (VALENTIN, 2000).

### 6.1.3 Descrição dos morfotipos isolados

Segue abaixo as principais características macroscópicas e microscópicas dos fungos isolados e identificados por métodos tradicionais, conforme Figuras 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 e 42.

Gênero: *Aspergillus* sp1

No aspecto macroscópico (Figura 35 A), as colônias são de cor preta com borda amarela, de aspecto aveludado e com verso estriado. O

crescimento da colônia invade a placa e a cor do verso da colônia se difunde.

Em relação ao aspecto microscópico (Figura 35 B e C) o fungo é filamentoso e com hifa hialina, e septada. O conidióforo é macronematoso, sendo este septado e ereto com vesícula no ápice contendo métulas e fialídes. Os conídios são arredondados em cadeias, sendo estes simples, seco, negros e verrugosos. A célula conidiogênica blástica, enteroblástica e fialídica em forma lagineforme, também terminal, evidente e determinada e de pigmentação negra.

Figura 35 - *Aspergillus* sp1. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Aspergillus* sp2

As colônias no aspecto macroscópico (Figura 36 A) são de coloração preta e de aspecto pulverulenta com verso liso. O crescimento invade a placa e a cor do verso da colônia se difunde.

Em relação ao aspecto microscópico (Figura 36 B e C), o fungo é filamentoso, possui a hifa hialina, septada. O conidióforo é macronematoso, septado, ereto com vesícula no ápice, sendo que este possui métulas e fialídes e conídio. Os conídios arredondados, em cadeias, sendo estes simples, seco, negros e verrugosos. A célula conidiogênica é blástica, enteroblástica, fialídica em forma lagineforme, terminal, evidente e determinada e em pigmentação negra.

Figura 36 - *Aspergillus* sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Phialophora* sp

No aspecto macroscópico (Figura 37 A) a colônia é de coloração verde e com traços branco e verso liso. O crescimento da colônia invade a placa, sendo esta de aspecto aveludado e a cor do verso da colônia se difunde.

Segundo a avaliação microscópica (Figura 37 B) trata-se de um fungo filamentoso com hifa hialina e septada. O conidióforo é semi-macronematoso, reto, septado e liso, sendo que no seu ápice contem uma fialide lageniforme. Os conídios são solitários e em cadeia, ovóides, lisos, oliváceos e secos. A célula conidiogênica é blástica,

enteroblástica, fialídica e terminal, sendo que esta possui colaretes bem evidentes.

Figura 37 - *Phialophora* sp . A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Paecilomyces* sp1

No aspecto macroscópico (Figura 38 A) as colônias deste fungo são de coloração marrom escura e com o verso liso. O crescimento da colônia invade a placa, sendo esta de aspecto aveludado e a cor do verso da colônia se difunde.

Em relação às características macroscópicas (Figura 38 B), o fungo é filamentoso com hifa de cor castanha e septada. O conidióforo é macronematosos, reto, septado, liso e com a pigmentação castanha. Os conídios são ovóides, solitários e em cadeias, sendo estes simples, secos e lisos. A célula conidiogênica é blástica, enteroblástica, fialídica e tem forma lagineforme, terminal, evidente e determinada, sendo que possui a pigmentação castanha.

Figura 38 - *Paecilomyces* sp1. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Paecilomyces* sp2

A partir da avaliação macroscópica (Figura 39 A), a colônia é de cor marrom creme e com verso liso, o crescimento da colônia invade a placa, sendo esta de aspecto aveludado e a cor do verso da colônia se difunde.

O aspecto microscópico (Figura 39 B) demonstra que é um fungo filamentoso com hifa de coloração castanha, sendo esta septada. O conidióforo é macronematoso, reto, septado, liso e com pigmentação castanha. Os conídios são ovóides, solitários e em cadeias, também estes, são simples, seco e liso. A célula conidiogênica é blástica, enteroblástica e fialídica, sendo que possui a forma lagineforme, terminal, evidente e determinada, a pigmentação desta é castanha.

Figura 39 - *Paecilomyces* sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Penicillium* sp1

No aspecto macroscópico (Figura 40 A), a colônia é marrom de pigmentação creme e com verso liso, o crescimento desta invade a placa e seu aspecto é aveludado, sendo que a cor do verso da colônia se difunde.

Trata-se de fungo filamentoso e, no seu aspecto microscópico (Figura 40 B) possui as hifas de coloração castanhas e estrutura septada. O conidióforo é macronematoso, reto, septado, liso e com métulas, sendo este de cor castanha. Os conídios são de forma ovóides, solitários e em cadeias, sendo estes simples, secos e lisos. A célula conidiogênica é blástica, enteroblástica, fialídica, sendo que possui a forma lagineforme, terminal, evidente e determinada, sendo a sua pigmentação, castanha.

Figura 40 - *Penicillium* sp. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Rhizopus* sp

Segundo o aspecto macroscópico (Figura 41 A), a colônia é de cor branca e com verso rugoso, sendo que o crescimento desta invade a placa e o seu aspecto é algodonoso, e, com o decorrer do tempo (após 3 dias do crescimento), apresentou traços de cor amarelada no meio da colônia.

Em relação ao aspecto microscópico (Figura 41 B e C), trata-se de um fungo filamentoso com hifa hialina, cenocítica, e de elevado diâmetro. O esporangioforo é ereto. Já o esporângio é redondo, sendo que no seu ápice contem uma columela, e na base deste destaca-se a presença de rizoídes.

Figura 41 - *Rhizopus* sp. A . Aspecto macroscópico da colônia. B . Esporangióforo e esporangiósporos. C . Hifas não septadas  
Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: indeterminado

Nas características macroscópicas (Figura 42 A), a colônia é de cor branca com verso liso. O crescimento da colônia invade a placa, sendo esta de aspecto algodinoso.

Em relação ao aspecto microscópico (Figura 42 B) demonstra na colônia do fungo filamentoso, a presença de hifa hialina e com elevado diâmetro, sendo esta cenocítica. Nota-se a ausência de conidióforo e conídios, o que caracteriza pertencer ao subfilo Mucoromycotina.

Figura 42 - Indeterminado. A . Aspecto macroscópico da colônia. B . Aspecto microscópico  
Fonte: Fotos do acervo do autor.

#### 6.1.4 Resultados dos fungos após aplicação dos biocidas

Os resultados obtidos a partir da avaliação do efeito dos 3 biocidas testados Preventol BP, Timol e a mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco sobre os fungos presentes no biofilme dos ambientes interno (parede da chaminé da cozinha) e externo (colunas do claustro inferior) do convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA, encontram-se a seguir.

Quadro 5 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para fungos verificados no claustro inferior externo e parede interna da chaminé do convento franciscano de Cairu-BA

Fonte: Quadro elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004)

SS MS F p



{1}Local	549330	549330	161.208	0.000000
{2}Biocida	1133 567		0.1660.847125	
{3}Concentração	1027 513		0.1510.860438	
{4}Tempo	14866304	14866304	4362.719	0.000000
Local*Biocida	1336 668		0.1960.822428	
Local*Concentração	926 463		0.1360.873157	
Biocida*Concentração	1723 431		0.1260.972445	
Local*Tempo	529955	529955	155.523	0.000000
Biocida*Tempo	701 350		0.1030.902423	
Concentração*Tempo	759 380		0.1110.894743	
Local*Biocida*Concentração			1646 411	0.1210.974658
Local*Biocida*Tempo	584 292		0.0860.917916	
Local*Concentração*Tempo	926 463		0.1360.873157	
Biocida*Concentração*Tempo			1868 467	0.1370.968064
1*2*3*4	2047 512		0.1500.962338	
Error	245346	3408		

Figura 43 - Gráfico da abundância dos fungos verificados no claustro inferior externo do convento de São Francisco de Cairu-BA, antes e depois da aplicação do biocidas  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 44 -Gráfico da abundância dos fungos verificados na chaminé da cozinha (interna) do convento de São Francisco de Cairu-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 45 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e após 30 dias de tratamento (B) na área externa do claustro convento de Santo Antônio de Cairu-BA  
 Fonte: Foto do acervo do autor.

## 6.2 CONVENTO DE SÃO FRANCISCO DE SALVADOR

### 6.2.1 Diagnose visual dos locais das coletas

Foi realizada, inicialmente, no convento de São Francisco de Salvador-BA a diagnose visual, conforme o Quadro 6, em 29/03/2010, demonstrando pontos comprometidos pela presença do biofilme, em diversos tipos de substrato, no interior do convento.

Quadro 6 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região interna do convento de São Francisco de Salvador-BA, em 29/03/2010

Pontos Fotográfico	Localização	Características Visuais	Registro
--------------------	-------------	-------------------------	----------

02

Cantaria do claustro inferior

Área interna, biofilme esverdeado pulverulento. Cantaria em calcário.

03

Claustro superior

Área interna. Biofilme preto com, aspecto pulverulento. Construído em arenito.

05

Torre sineira

Área interna, biofilme esverdeado pulverulento. Parede revestida de argamassa e com pintura de cal e apresenta sinais de umidade.

06

Sala do coro

Área interna, biofilme esverdeado, pulverulento. Parede revestida de argamassa e com pintura de cal.

08

Braça da alegria+

Área interna, biofilme esverdeado com aspecto pulverulento. Parede revestida de argamassa

09

Telhado de acesso a sala do capítulo

Biofilme preto com pontos esverdeados, aspecto pulverulento. As telhas são de material cerâmico.

O Quadro 7 traz a diagnose visual realizada nos pontos de amostragem verificados na parte externa do biofilme em diversos tipos de substrato.

Quadro 7 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região externa do convento de São Francisco de Salvador-BA, em 29/03/2010

Pontos	Localização	Características Visuais	Registro
--------	-------------	-------------------------	----------

Fotográfico

01 Claustro inferior  
Área externa, biofilme de aspecto verde escuro. Capitel e abáco construídos em calcário. Encontram-se expostos as variações ambientais.

04 Claustro superior

Área externa. Biofilme preto com, aspecto pulverulento. Peitoril da varanda construído em arenito.

Continuação... Quadro 7 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região externa do convento de São Francisco de Salvador-BA, em 29/03/2010

07 Salão anterior ao coro

Área interna, biofilme esverdeado, pulverulento. Parede revestida de argamassa

10 Porta lateral da Igreja da Ordem 1a Área externa, biofilme verde escuro. Porta de madeira não identificada com pintura a óleo.

## 6.2.2 Influência das condições ambientais na formação do biofilme

Nos Quadros 8 e 9, estão apresentados os parâmetros ambientais integrados, verificados nos locais de coleta do convento de São Francisco de Salvador-BA.

Quadro 8 - Dados integrados com os parâmetros ambientais das áreas externas

do convento de São Francisco de Salvador-BA

Local	Substrato	Morfotipos	Temperatura (°C)	Luminosidade (Lux)	Umidade relativa (%)
Cantaria do claustro	Calcário	-	33	60	4800
Claustro superior	Arenito	Aspergillus aculeatus (1.1)	30	2860	51
Salão anterior ao coro	Parede revestida de argamassa	-	31	3620	58
Porta lateral Ordem 1a	Madeira	-	30	57	1070

Quadro 9 - Dados integrados com os parâmetros ambientais das áreas internas

do convento de São Francisco de Salvador-BA

Local	Substrato	Morfotipos	Temperatura (°C)	Luminosidade (Lux)	Umidade relativa (%)
Cantaria do claustro	Calcário	-	29	52	610
Claustro superior	Arenito	Cunninghamella blakesleeana (5.5)	29	54	80
Torre sineira	Parede revestida de argamassa	-	28	53	252
Sala do coro.	Parede revestida de argamassa	-	29	60	115
Praça da alegria	Parede revestida de argamassa	-	29	56	165
Telhado de acesso a sala do capítulo	Cerâmica	-	28	57	165

Temos a seguir (Figuras 46 e 47), a abundância na distribuição de bactérias totais e fungos filamentosos nos substratos do convento de São Francisco de Salvador-BA.

Figura 46 - Gráfico da abundância de bactérias (UFC/g) por locais de coleta do convento de São Franciscano de Salvador-BA

Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa Microsoft® Office EXCEL 2010.

Figura 47 - Gráfico da abundância de fungos (UFC/g) por locais de coleta do convento de São Francisco de Salvador-BA

Fonte: Gráfico elaborado a partir do Microsoft® Office EXCEL 2010.

### 6.2.3 Descrição dos morfotipos isolados

Descrição macroscópica e microscópica dos morfotipos fúngicos encontrados, isolados e identificados por métodos tradicionais nos substratos de arenito do convento de São Francisco de Salvador, e são dos gêneros: *Aspergillus* sp4, *Aspergillus* sp5 (claustro superior externo) e *Aspergillus* sp3, *Penicillium* sp2 e *Penicillium* sp3 (claustro superior interno), conforme as Figuras 48, 49 e 50, 51 e 52.

Gênero: *Aspergillus* sp3

Na avaliação macroscópica (Figura 48 A), as colônias são de cor preta e de aspecto aveludado, com borda amarela e verso estriado. O crescimento invade a placa e a cor do verso da colônia se difunde.

Em relação ao aspecto microscópico, (Figura 48 B e C), trata-se de fungo filamentoso com hifa hialina e septada. O conidióforo é macronematoso, septado, ereto com vesícula no ápice contendo métulas, fialídes e conídios. Os conídios são arredondados e em cadeias, são simples, secos, negros e verrugosos. A célula conidiogênica blástica, enteroblástica, fialídica e em forma lagineforme, terminal, evidente e determinada e de pigmentação negra.

Gênero: *Aspergillus* sp4

O aspecto macroscópico (Figura 49 A) revelou que as colônias são de coloração preta e de aspecto pulverulento com verso liso. O crescimento invade a placa e a cor do verso da colônia se difunde.

No que se refere ao aspecto microscópico (Figura 49 B e C), o fungo filamentoso possui hifa hialina e septada. O conidióforo é macronematoso, septado, ereto com vesícula no ápice contendo métulas, fialídes e conídios. Os conídios são arredondados em cadeias,

simples, são secos, negros e verrugosos. A célula conidiogênica é blástica, é enteroblástica, fialídica em forma lagineforme, terminal, evidente e determinada, e de pigmentação negra.

Gênero: *Aspergillus* sp5

De acordo a característica macroscópica (Figura 50 A), as colônias são de coloração verde com bordas brancas e de aspecto aveludado com verso liso, crescimento é limitado e a cor do verso da colônia se difunde. No aspecto microscópico (Figura 50 B e C), o fungo é filamentososo com hifa hialina e septada. O conidióforo é macronematoso, septado, ereto com vesícula no ápice contendo métulas, fialídes e conídios. Os conídios são arredondados em cadeias, simples, são secos, negros e verrugosos. A célula conidiogênica blástica, enteroblástica, fialídica em forma lagineforme, terminal, evidente e determinada.

Gênero: *Penicillium* sp2

Segundo, o aspecto macroscópico (Figura 51 A), demonstra que a colônia é de cor verde com bordas brancas, o verso é liso. O crescimento é limitado e de aspecto aveludado e a cor do verso da colônia se difunde.

No aspecto microscópico (Figura 51 B e C), o fungo é filamentososo com hifa verde e septada. O conidióforo é macronematoso, reto, septado e liso com métulas e de pigmentação verde. Os conídios são ovóides, solitários e em cadeias, são simples, secos e lisos. A célula conidiogênica é blástica, enteroblástica, fialídica tem forma lagineforme, terminal, evidente e determinada com pigmentação verde.

Gênero: *Penicillium* sp3



Fonte: Foto do acervo do autor.

M 1.1 1.1 1.2 1.2 2.2 4.0 2.1 5.7 5.7 5.5

Figura 55 - Determinação da PCR dos fungos do convento

franciscano de Salvador . BA

Fonte: Foto do acervo do autor.

A partir dos resultados dos produtos do sequenciamento do DNA das amostras dos fungos, presentes na área externa do claustro superior (arenito), foram encontradas no banco de dados do blast, as espécies: *Aspergillus aculeatus* (1.1) e *Penicillium griseofulvum* ou *Penicillium citrinum* (4.0). Já na área interna desse claustro, foram localizadas as espécies: *Cunninghamella blakesleeana* (5.5) e *Penicillium griseofulvum* ou *Penicillium citrinum* (5.7), conforme, as sequências do GENBANK, descritas no Anexo D.

6.2.5 Resultados das bactérias e fungos após aplicação dos biocidas

Quadro 10 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para bactérias verificadas no claustro superior (região interna e externa) do convento de São Francisco de Salvador-BA

Fonte: Quadro elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004)

	SS	MS	F	p		
{1}Local	1637	1637	0.1149		0.735571	
{2}Biocida	21162		10581	0.7429		0.479358
{3}Concentração	24848		12424	0.8723		0.422378
{4}Tempo	5830870		5830870	409.3672		0.000000
Local*Biocida	3111	1556	0.1092		0.896687	
Local*Concentração	1416	708	0.0497		0.951552	
Biocida*Concentração	19778		4945	0.3471		0.845185
Local*Tempo	13411		13411	0.9416		0.335125
Biocida*Tempo	21162		10581	0.7429		0.479358
Concentração*Tempo	24848		12424	0.8723		0.422378
Local*Biocida*Concentração			3289	822	0.0577	0.993680
Local*Biocida*Tempo	3111	1556	0.1092		0.896687	
Local*Concentração*Tempo	1416	708	0.0497		0.951552	
Biocida*Concentração*Tempo			19778	4945	0.3471	0.845185
1*2*3*4	3289	822	0.0577		0.993680	
Error	1025540		14244			



Figura 56 - Gráfico da abundância das bactérias verificadas no claustro superior (região interna) do convento de São Francisco de Salvador-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 57- Gráfico da abundância as bactérias verificadas no claustro superior (região externa) do convento de São Francisco de Salvador-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 58 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e após 30 dias de tratamento (B) na área interna do claustro superior do convento franciscano de Salvador-BA  
 Fonte: Fotos do acervo do autor.

Quadro 11 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para fungos filamentosos verificados no claustro superior (região interna e externa) do convento de São Francisco de Salvado-BA  
 Fonte: Quadro elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004)

	SS	MS	F	p
{1}Local	42.18750	42.18750	120.6954	0.000000
{2}Biocida	0.51852	0.25926	0.7417	0.479897
{3}Concentração	0.07407	0.03704	0.1060	0.899600
{4}Tempo	69.28009	69.28009	198.2053	0.000000
Local*Biocida	0.22222	0.11111	0.3179	0.728706
Local*Concentração	0.22222	0.11111	0.3179	0.728706
Biocida*Concentração	0.81481	0.20370	0.5828	0.676086
Local*Tempo	42.18750	42.18750	120.6954	0.000000
Biocida*Tempo	0.51852	0.25926	0.7417	0.479897
Concentração*Tempo	0.07407	0.03704	0.1060	0.899600
Local*Biocida*Concentração	0.22222	0.11111	0.3179	0.728706
Local*Biocida*Tempo	0.22222	0.11111	0.3179	0.728706

Local*Concentração*Tempo	0.22222	0.11111	0.3179	0.728706
Biocida*Concentração*Tempo	0.81481	0.20370	0.5828	
	0.676086			
1*2*3*4	0.22222	0.05556	0.1589	0.958320
Error	25.16667	0.34954		

Figura 59 - Gráfico da abundância dos fungos verificados no claustro superior (região interna) do convento de São Franciscano de Salvador-BA antes e depois da aplicação dos biocidas  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 60 - Gráfico da abundância dos fungos verificados no claustro superior (região externa) do convento de São Francisco de Salvador-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas  
 Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 61 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e após 30 dias de tratamento (B) na área externa do claustro superior do convento franciscano de Salvador-BA  
 Fonte: Fotos do acervo do autor.

## 6.3 CONVENTO FRANCISCANO DE SÃO FRANCISCO DO CONDE

### 6.3.1 Diagnose visual dos locais das coletas

No convento franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA foi realizada inicialmente a diagnose visual, conforme o Quadro 12, em 30/03/2010, demonstra pontos comprometidos pela presença do biofilme em diversos tipos de substrato no interior do convento.

Quadro 12 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região interna do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010

Pontos Fotográfico	Localização	Características Visuais	Registro
--------------------	-------------	-------------------------	----------

07

Coluna da nave

Presença de biofilme verde, fuste de coluna com pintura de cal, em grau de degradação intensa.

01

Biblioteca

Presença de manchas escuras e verdes, pulverulenta, parede revestida de argamassa e com pintura de cal, em grau de degradação intensa.

03

Coro Presença de biofilme com manchas verdes e pulverulentas, parede revestida de argamassa, em degradação intensa.

08

Painel de azulejaria da nave

Presença de biofilme verde nas lacunas. Aspecto aveludado, parede com painel de azulejaria portuguesa, em grau de degradação intensa.

Continuação... Quadro 12 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região interna do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010

05

Sala de estudos

Presença de biofilme verde escuro. Aspecto pulverulento, parede revestida de argamassa e com pintura de cal, em degradação intensa.

09

Púlpito

Área interna com aspecto pulverulento, sendo substrato de madeira, em degradação média.

O Quadro 13 traz a diagnose visual realizada nos pontos amostrais do exterior do convento de Santo Antônio, de São Francisco do Conde-BA.

Quadro 13 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região externa do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010

Pontos Fotográfico	Localização	Características Visuais	Registro
-----------------------	-------------	-------------------------	----------

02	Biblioteca	Presença de manchas escuras e verdes, pulverulenta, parede revestida de argamassa e com pintura de cal, em degradação intensa.	
----	------------	--	--

04	Claustro superior	Presença de biofilme com manchas verdes e pulverulentas, parede revestida de argamassa e com pintura de cal, em degradação intensa.	
----	-------------------	---	--

10	Fachada da galilé	Presença de biofilme com manchas escuras e pulverulentas, elemento de calcário, em degradação intensa.	
----	-------------------	--	--

Continuação... Quadro 13 - Aspectos visuais verificados nos locais de coleta na região externa do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010

06	Sala de estudos	Presença de biofilme escuro. Aspecto pulverulento, parede revestida em argamassa, em degradação intensa e presença de fissuras.	
----	-----------------	---	--

6.3.2 Influência das condições ambientais na formação do biofilme

No Quadro 14, estão apresentados os parâmetros ambientais integrados, verificados nos locais de coleta do convento de São Francisco do Conde.

Quadro 14 - Dados integrados com parâmetros ambientais nas áreas externas do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010

Local	Substrato	Morfotipos	Temperatura (°C)	Umidade relativa %
		Luminosidade (Lux)		
Biblioteca	Parede revestida de argamassa	-	33 65	11950
Claustro superior	Parede revestida de argamassa	-	31 63	
		6900		
Sala de estudos (1.2)	Parede revestida de argamassa	Aspergillus aculeatus	30 73	7100
Fachada da galilé	Calcário	-	38 77	96800

Quadro 15 - Dados integrados com parâmetros ambientais nas áreas internas do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA, em 30/03/2010

Local	Substrato	Morfotipos	Temperatura (°C)	Umidade relativa %
		Luminosidade (Lux)		
Biblioteca	Parede revestida de argamassa	Trichoderma longibrachiatum (2.2)	28 59	328
Coro	Parede revestida de argamassa	-	29 64	100
Sala de estudos	Parede revestida de argamassa	-	28 53	110
Coluna da nave	Pintura de cal	-	28 68	38
Painel de azulejaria da nave	Azulejo	-	28 70	42
Púlpito	Madeira	-	29 73	86

Figura 62 - Gráfico da abundância de fungos (UFC/g) por locais de coleta do

convento franciscano de São Francisco do Conde-BA

Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa Microsoft® Office EXCEL 2010.

Figura 63 - Gráfico da abundância de bactérias (UFC/g) por locais de coleta

do convento franciscano de São Francisco do Conde-BA

Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa Microsoft® Office EXCEL 2010.

### 6.3.3 Descrição dos morfotipos isolados

A seguir temos a descrição macroscópica e microscópica dos morfotipos fúngicos encontrados, isolados e identificados por métodos tradicionais, dos substratos de argamassa do convento franciscano, de Santo

Antonio de São Francisco do Conde-BA, e pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp6 (parede externa da sala de estudos), *Phialophora* sp2 e *Penicillium* sp4 (parede interna da biblioteca), conforme Figuras 61, 62 e 63.

Gênero: *Aspergillus* sp6

De acordo dos aspectos macroscópicos (Figura 61 A), as colônias são pretas e de aspecto pulverulenta com verso liso. O crescimento invade a placa, a cor do verso da colônia se difunde.

No aspecto microscópico (Figura 61 B), o fungo é filamentoso, com hifa hialina, septada. O conidióforo é macronematoso, septado, ereto e com vesícula no ápice contendo métulas, fialídes e conídios. Os conídios são arredondados em cadeias, simples, seco, negros e verrugosos. A célula conidiogênica é blástica, enteroblástica, fialídica e em forma lagineforme. Também é terminal, evidente e determinada e de pigmentação negra.

Figura 64 - *Aspergillus* sp6. A . Aspecto macroscópico da colônia. B e C - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Penicillium* sp4

O aspecto macroscópico (Figura 62 A) demonstra que a colônia é marrom de cloração creme, com verso liso. O crescimento invade a placa, a colônia possui o aspecto aveludado, a cor do verso da colônia se difunde.

Em relação ao aspecto microscópico (Figura 62 B), o fungo é filamentoso e com hifa, em que, a coloração é castanha e de formato septado. O conidióforo é macronematoso, reto, septado, liso e com métulas e pigmentação castanha. Os conídios ovóides, solitários e em cadeias, simples, secos e lisos. A célula conidiogênica é blástica, enteroblástica, fialídica e em forma lagineforme, também, é terminal, evidente e determinada e de pigmentação castanha.

Figura 65 - *Penicillium* sp4. A . Aspecto macroscópico da colônia. B - Conidióforo e conídios

Fonte: Fotos do acervo do autor.

Gênero: *Phialophora* sp2

Segundo a avaliação macroscópica (Figura 63 A), a colônia é verde e com traços brancos, o verso é liso. O crescimento invade a placa e de aspecto aveludado, a cor do verso da colônia se difunde.

No aspecto microscópico (Figura 63 B), o fungo é filamentososo com hifa hialina e septada. O conidióforo é semi-macronematoso, reto, septado, liso, o ápice contém uma fialide lageniforme. Os conídios são solitários e em cadeia, ovoídes lisos, oliváceos e secos. A célula conidiogênica é: blástica, enteroblástica, fialídica, terminal, e com colaretes bem evidentes.

Figura 66 - *Phialophora* sp2. A . Aspecto macroscópico da colônia. B . Conidióforo e conídios. Fonte: Fotos do acervo do autor.

#### 6.3.4 Identificação molecular dos fungos presentes no biofilme

Para avaliar a qualidade da extração, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose do DNA dos fungos (1.2, 1.2, 1.2, 2.1, 2.2), do convento de São Francisco do Conde, conforme, ilustrado na Figura 67.

1.1 1.1 1.2 1.2 1.2 2.1 2.2 4.0 4.0 5.5 5.5

5.7 5.7 M

Figura 67 . Avaliação da qualidade do DNA dos fungos do convento de São Francisco de Conde-BA no LAMOL da UEFS

Fonte: Foto do acervo do autor.

A seguir temos os resultados da PCR das amostras dos fungos do convento de São Francisco de Salvador, conforme ilustrado na Figura 68.

1.1 1.1 1.2 1.2 1.2 2.1 2.2 4.0 4.0 5.5 5.5

5.7 5.7 M

Figura 68 - Determinação da PCR dos fungos do convento de São Francisco do Conde-BA no LAMOL

Fonte: Foto do acervo do autor.

Após os resultados dos produtos do sequenciamento do DNA das amostras dos fungos filamentosos, presente no substrato da área externa da sala de estudos, foi localizada a espécie *Aspergillus aculeatus* (1.2) no banco de dados do blast. Já na parede interna da biblioteca (argamassa) pertencem às espécies: *Trichoderma longibrachiatum* (2.2) e *Penicillium griseofulvum* ou *Penicillium citrinum* (2.1), conforme, as sequências do GENBANK, descritas no Anexo E.

#### 6.3.5 Resultados das bactérias e fungos após aplicação dos biocidas

Segue abaixo os resultados da microbiota de bactérias e fungos, na área interna da biblioteca e área externa da sala de estudos, após os tratamentos com os diferentes biocidas.

Quadro 16 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para bactérias verificadas na biblioteca e sala de estudos (região interna e externa) do convento de franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA

Fonte: Quadro elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004)

	SS	MS	F	p		
{1}Local	270100		270100	23.5217	0.000007	
{2}Biocida	21	11	0.0009	0.999066		
{3}Concentração	25	13	0.0011	0.998897		
{4}Tempo	4822204	4822204	419.9415	0.000000		
Local*Biocida	21	11	0.0009	0.999066		
Local*Concentração	25	13	0.0011	0.998897		
Biocida*Concentração	43	11	0.0009	0.999998		
Local*Tempo	262552	262552	22.8643	0.000009		
Biocida*Tempo	24	12	0.0010	0.998953		
Concentração*Tempo	28	14	0.0012	0.998774		
Local*Biocida*Concentração	43	11	0.0009	0.999998		
Local*Biocida*Tempo	24	12	0.0010	0.998953		
Local*Concentração*Tempo	28	14	0.0012	0.998774		
Biocida*Concentração*Tempo	48	12	0.0010	0.999998		
1*2*3*4	48	12	0.0010	0.999998		
Error	826779	11483				

Figura 69 - Gráfico da abundância das bactérias verificadas na biblioteca

Interna do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da

aplicação dos biocidas

Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 70 - Gráfico da abundância das bactérias verificadas na região externa da sala

de estudos do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas



Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 71 - Comparação do substrato antes da aplicação do Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco (A) e após 30 dias de tratamento (B) na área interna da biblioteca do convento de São Francisco do Conde-BA  
 Fonte: Fotos do acervo do autor.

Quadro 17 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para fungos verificados na biblioteca e sala de estudos (região interna e externa) do convento franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA  
 Fonte: Quadro elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004)

	SS	MS	F	p
{1}Local	0.14815	0.14815	4.0000	0.049273
{2}Biocida	0.51852	0.25926	7.0000	0.001667
{3}Concentração	0.51852	0.25926	7.0000	0.001667
{4}Tempo	19.59259	19.59259	529.0000	0.000000
Local*Biocida	0.07407	0.03704	1.0000	0.372931
Local*Concentração	0.07407	0.03704	1.0000	0.372931
Biocida*Concentração	0.37037	0.09259	2.5000	0.049921
Local*Tempo	0.14815	0.14815	4.0000	0.049273
Biocida*Tempo	0.51852	0.25926	7.0000	0.001667
Concentração*Tempo	0.51852	0.25926	7.0000	0.001667
Local*Biocida*Concentração	0.37037	0.09259	2.5000	0.049921
Local*Biocida*Tempo	0.07407	0.03704	1.0000	0.372931
Local*Concentração*Tempo	0.07407	0.03704	1.0000	0.372931
Biocida*Concentração*Tempo	0.37037	0.09259	2.5000	0.049921
1*2*3*4	0.37037	0.09259	2.5000	0.049921
Error	2.66667	0.03704		

Figura 72 - Gráfico da abundância dos fungos verificados na biblioteca interna do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas

Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

Figura 73 - Gráfico da abundância dos fungos verificados na região externa da sala de estudos do convento de São Francisco do Conde-BA, antes e depois da aplicação dos biocidas

Fonte: Gráfico elaborado a partir do programa STATISTICA® (Statsoft, 2004).

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 CONVENTO FRANCISCANO DE SANTO ANTÔNIO DE CAIRU

Nos Quadros 1 e 2, pode-se verificar o aspecto dos pontos de coleta do interior do convento, percebendo-se a presença de fungos, demonstrada pelo aparecimento de manchas escuras de aspecto pulverulento.

Os pontos de coleta observados no exterior do convento demonstram, em geral, a presença de manchas escuras, de aspecto pulverulento e, às vezes, tomando toda estrutura rochosa, como foi visto na galilé. O substrato que predomina é o revestimento em argamassa, cujos registros fotográficos da tabela evidenciam estado de degradação do material. Também foi verificado que os pináculos da torre apresentaram manchas verdes e de aspecto pulverulento na superfície do substrato rochoso. No trabalho de Lopes (2003) sobre biodeterioração do monumento histórico do Teatro São João, edificado com arenito no século XIX, em Lapa-PR, o diagnóstico visual também foi o ponto de partida da pesquisa, sendo que a presença de manchas escuras, pulverulentas, foi estudada e caracterizada na área externa da edificação pétrea. Isso sugeriu a presença de fungos e a biodegradação por estes na superfície do monumento.

Na área externa do convento, a incidência dos fatores ambientais pode estar influenciando o processo de biodeterioração, já que se trata de um município de clima tropical úmido, de alta pluviosidade, com elevada umidade relativa, além de localizado em uma região de estuário. Estas condições têm contribuído para a proliferação dos fungos, como foi evidenciado através de manchas escuras de aspecto aveludado, ocupando até o local mais alto do convento, a torre. O que concorda com Tiano (1998), que relata ter o processo de biodeterioração uma difusão ampla no mundo e alcançar os níveis mais preocupantes nos climas tropicais. Nessas condições climáticas, as circunstâncias ambientais são extremamente favoráveis ao crescimento, da maioria dos organismos nas rochas monumentais expostas, o que, em conjunto

com a ação da chuva, do vento e da luz, propicia a alteração dos edifícios.

No substrato de madeira, que compõe o forro da nave cuja estrutura agrega um conjunto de pinturas barrocas do teto, os fungos apresentam-se com crescimento algodonoso e de coloração branca e se constituem nos principais responsáveis pela danificação do material.

Nos demais substratos, revestidos de argamassa e com pintura de cal, verificou-se o crescimento de fungos, caracterizado por manchas verdes, principalmente na portaria do convento, cuja ação aparente e sinais de umidade ascendente do solo são evidentes. O grau de degradação no interior se apresentou de moderado a intenso, o que diferiu do exterior, no qual predominou este último, pois os níveis de exposição aos fatores ambientais são mais propícios, o que favorece a microbiota fúngica.

A produção e a liberação de substâncias metabólicas das colônias de fungos provocam danos estéticos e estruturais aos materiais que compõem os monumentos históricos, o que foi visto através das manchas escuras e das fissuras, conforme os substratos do exterior do convento, claustro, galilé, parede da cozinha, entre outros.

As formações de pontos marrons ou pretos também podem ser derivadas da oxidação dos restos dos componentes do substrato rochoso devido à colonização dos micro-organismos.

Conforme o esperado, a temperatura foi maior no exterior do convento (Quadro 3), entretanto, em ambos os ambientes, a temperatura é favorável à proliferação de fungos. De acordo com Barnett e Hunter (1998), a faixa de temperatura média para a fisiologia dos fungos filamentosos é 25 a 30°C, embora haja muitas variações no grupo, como, por exemplo, o *Aspergillus* sp, que pode tolerar uma larga faixa 20 a 50°C, o que facilmente assegura sua sobrevivência no ambiente. Isso demonstra a sua dominância nas áreas externas do convento. Outra característica que favorece a presença dos fungos nas áreas externas é a produção de pigmentos escuros de melanina, sintetizada por muitas espécies e que atua protegendo-os contra a ação dos raios UV.

Os pontos de amostragem localizados no interior do convento, conforme o Quadro 4, apresentaram altos valores de umidade, variando de 96 a 100 %, o que indica ser o local muito úmido, sofrendo influência da pouca luz solar e conseqüente menor temperatura (26 a 29°C), em relação ao exterior. Essa condição favorece, sobremaneira, a proliferação de fungos, já que estes se desenvolvem melhor em ambientes úmidos, embora tolerem bem, em função da espessa parede celular, ambientes secos. Tortora (2006) relata que os fungos podem

crescer em substâncias de baixo grau de umidade, geralmente tão baixo que impede o crescimento até de bactérias.

A temperatura e a umidade relativa, tanto no interior como no exterior, estão numa faixa ideal e favorecem a biodeterioração por fungos nos materiais rochosos e madeira, presentes na edificação do convento.

Esses locais são basicamente constituídos do mesmo material na sua construção, com revestimento de argamassa e com exceção do forro de madeira com pintura de teto da nave no interior. Assim, as variações nesses ambientes se dão pela presença de tinta, sais e material particulado na sua superfície (poeira), que tornam o ambiente uma fonte de nutrientes (minerais) e carbono. Esses nutrientes possibilitam o metabolismo e o crescimento dos fungos, pois estes micro-organismos produzem exoenzimas capazes de digerir e absorver esses materiais. De acordo com Marguilis e Schwartz (2001), os fungos são heterotróficos e, frequentemente, absorvem os diversos materiais, pois excretam enzimas poderosas que decompõem o seu alimento em moléculas menores que, em seguida, são transportadas para o interior da célula pela membrana fúngica localizada nas hifas.

Apesar da baixa explicabilidade verificada nos gráficos das Figuras 33 e 34, os eixos foram significativos, conforme o teste de Montecarlo realizado no programa CANOCO®.

No forro de madeira da nave (pintura de teto), localizado no interior do convento, os valores de temperatura e umidade foram favoráveis a biodeterioração por fungos. Neste local, foi verificada a maior diversidade de morfotipos, conforme pode ser observada no gráfico da Figura 33, a presença dos gêneros: *Aspergillus* sp2, *Paecilomyces* sp1, *Paecilomyces* sp2, *Penicilium* sp, *Phialophora* sp, *Rhizopus* sp e Indeterminado sp foi significativa, em relação aos outros pontos do interior do convento, sugerindo a preferência dos fungos por este tipo de substrato. Este fato é também descrito por Tiano (1998), que relata que os componentes orgânicos nas pinturas representam uma fonte de nutrição disponível para os fungos, favorecendo seu crescimento, tanto em termos de densidade quanto em diversidade. Entretanto, segundo o autor, o ataque biológico ocorre somente quando há condições ambientais favoráveis, e tais circunstâncias são encontradas, frequentemente, em quartos de museus, igrejas antigas ou nos depósitos, sem nenhum controle da umidade e da temperatura.

Os micro-organismos que atacam pinturas incluem diversas espécies de fungos, pois a variedade de componentes orgânicos desses trabalhos de arte pode representar uma fonte do carbono para, praticamente, todas as espécies. Além disso, os fungos apresentam tolerância grande para diferentes circunstâncias ambientais.

Nos pináculos da torre, como nos demais pontos localizados no exterior, a condutividade no substrato foi alta. A localização dessas áreas favorece a influência do spray marinho proveniente do estuário, tornando assim o ambiente úmido e com significativa salinidade, possibilitando o crescimento de fungos como *Aspergillus* sp1, *Aspergillus* sp2, *Paecilomyces* sp1, *Penicilium* sp1 e *Phialophora* sp1. Conforme relata Tortora (2006), a maioria dos fungos é resistente à pressão osmótica e consegue crescer em ambientes com altas concentrações de sal.

No eixo I do gráfico da Figura 33, a análise foi relacionada ao aumento da condutividade dos substratos das áreas e separou, no lado esquerdo, os morfotipos que foram encontrados nos locais com os maiores teores de sais. Como se pode notar, os morfotipos de *Aspergillus* associaram-se positivamente a esse parâmetro.

Já o eixo II do gráfico da Figura 33 separou os locais com maior temperatura, dos locais com maior umidade. Como esperado, a temperatura e a umidade se correlacionaram de forma inversa, quando uma aumenta, a outra diminui. O morfotipo que estava relacionado de forma positiva à temperatura foi o *Penicillium*. Enquanto o *Rhizopus* sp e o Indeterminado sp e o *Paecilomyces* sp. e o *Phialophora* estiveram associados ao aumento da umidade. Entretanto, no trabalho de Nuhoglu (2006), foi relatada a presença da espécie *Penicillium frequentans* associada à biodeterioração em monumento histórico construído de material rochoso, na região de Erzurum, na Turquia, mesmo em baixas condições de temperatura (abaixo de 0°). Segundo esse autor, o fungo citado se adaptou e desenvolveu em condições climáticas extremas.

Desse modo, pode-se sugerir que, bem como em outros trabalhos citados na literatura, a biodeterioração está intimamente relacionada com as condições ambientais. Os fatores ambientais presentes no local do convento seguramente influenciam no crescimento desses fungos nas superfícies do monumento, pois a temperatura e a umidade são parâmetros ambientais que, como se sabe, podem atuar favorecendo ou não a presença desses organismos.

May e outros, citados por Resende (2008), relatam que a separação entre os fatores ambientais e biológicos (biótica) é praticamente impossível, uma vez que cada processo, químico ou físico, é influenciado ou controlado pela atividade microbiana. Assim, os processos de biodeterioração e outros processos ambientais de deterioração estão intimamente relacionados, uma vez que a presença de um pode tornar o outro mais efetivo.

Os fungos que foram isolados no interior e exterior do convento franciscano de Santo Antônio, de Cairu-BA, pertencem aos gêneros:

Aspergillus sp1, Aspergillus sp 2, Paecilomyces sp1, Paecilomyces sp2, Penicillium sp, Phialophora sp, Rhizopus sp e um indeterminado sp.

O morfotipo indeterminado não esporulou, ou seja, não produziu os conidióforos e conídios reprodutivos, e estas estruturas são fundamentais para identificação do gênero. Trabulsi e outros (1999) ressaltam que as estruturas de reprodução dos fungos se conduzem através do micélio reprodutivo, assim, o modo de reprodução dos fungos é de fundamental importância na sua caracterização morfológica e taxonômica, uma vez que distintos tipos de reprodução resultarão em diferentes tipos morfológicos e de espécies.

A relação entre os morfotipos encontrados e os locais de coleta e substrato pode ser visualizada no gráfico da Figura 34.

No gráfico especificado, pode-se observar que a ocorrência do Penicillium sp. esteve mais associada à parede interna da cozinha, o morfotipo Rhizopus sp à madeira e o Phialophora sp à portaria, à sala do capítulo e à sacristia, no interior. Para os demais morfotipos, parece não haver preferência por local, ocorrendo em diferentes locais do convento.

Conforme, o gráfico da Figura 34, parece haver também uma relação do tipo de substrato com a presença de Penicillium sp e Phialophora sp, que se apresentaram associados ao substrato de pintura de cal, enquanto os morfotipos Rhizopus sp e Indeterminado sp estiveram associados ao substrato de madeira.

O gênero que mais dominou a superfície dos substratos com revestimento de argamassa foi o Aspergillus sp (Figura 34). No estudo de Lopes (2003), também foi relatada esta ocorrência. Esse autor detectou a presença de fungos que atuavam na decomposição dos blocos de arenito da área externa do monumento. Segundo o autor, os fungos mais abundantes nas amostras analisadas do monumento foram o Aspergillus fumigatus e o Alternaria alternata. Esse mesmo autor observa que o Aspergillus fumigatus também havia sido encontrado na Catedral de San Francisco de Asis, na cidade de Ayavire, no Peru, em estudo sobre biodeterioração feito entre 1998 e 2002.

De acordo com o Quadro 5, a análise de variância demonstrou uma diferença significativa na probabilidade ( $P < 0,05$ ) para o local, o tempo e a interação do local com o tempo em relação aos dados dos fungos no claustro superior externo e na parede interna da chaminé da cozinha.

O gráfico da Figura 43 traz os resultados dos fungos antes da aplicação dos biocidas de 900 UFC/g nas colunas externas do claustro inferior. Após 30 dias da aplicação dos biocidas, a nova análise microbiológica revelou que, com a concentração de 1,0 % de Timol, o resultado foi de 18 UFC/g, e o Preventol BP apresentou, na concentração 0,5%, o valor de 5 UFC/g. A mistura 1: 1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco a

2% e o Preventol BP a 1,0% apresentaram o menor resultado (0 UFC/g) dos tratamentos na área externa do claustro inferior.

Segundo o gráfico da Figura 43, os tratamentos nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%, independente do biocida, reduziram significativamente os fungos; no substrato do claustro inferior, na área externo, do convento de Cairu, o que variou foi o fator tempo inicial e final (30 dias) após os tratamentos.

De acordo com o gráfico da Figura 43, percebe-se que o biocida contendo a mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco na concentração de 0,5, 1,0 e 2,0%, aplicado na região externa do claustro inferior, apresentou uma redução dos fungos. Após a aplicação desses compostos metálicos, a ação toxica da mistura também foi significativa. Segundo Gaylard (1996), compostos metálicos solúveis são estáveis e altamente tóxicos. Essas propriedades levam a danos ambientais. Compostos inorgânicos simples de cobre são de baixa toxicidade para a maioria dos organismos superiores, mas são biocidas eficazes contra a maioria das algas, muitos fungos e algumas bactérias.

Foi observado, conforme, o gráfico da Figura 43, que o tratamento com os biocidas, nas concentrações testadas, apresentou redução significativa na população de fungos e pode-se notar, visualmente, a diminuição das manchas pulverulentas do substrato após o tratamento na área externa do claustro inferior (Figura 45).

No gráfico da Figura 44, verifica-se que a população de fungos, antes da aplicação dos biocidas, foi de 607 UFC/g na parede interna da chaminé da cozinha. Após os tratamentos, a nova análise microbiológica revelou que os três biocidas testados nas três concentrações (0,5, 1,0 e 2,0%) apresentaram uma redução significativa equivalente na população de fungos, ou seja, abaixo de 4 UFC/g de substrato analisado. No entanto, é preciso observar os aspectos ambientais em relação à redução da microbiota nas superfícies internas dos monumentos. De acordo com Kumar (1999), a eficácia dos tratamentos depende certamente dos métodos e produtos escolhidos, mas um novo crescimento torna-se inevitável se as condições ambientais que o favorecem não forem modificadas.

Segundo o gráfico da Figura 44, observa-se que a concentração de 0,5, 1,0 e 2,0% dos biocidas testados obteve resultados animadores na redução da população dos fungos presentes no biofilme da parede interna da chaminé da cozinha, sendo que, mesmo com os biocidas em baixa concentração (0,5 %), o desempenho também foi significativo. Este resultado concorda com Fazenda (1995), para o qual, a dosagem necessária para a eliminação dos agentes biológicos deve ser levada em consideração para a análise do rendimento do biocida. 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.

Nas suas pesquisas, França (2009) realizou ensaios em laboratório, a fim de avaliar a eficácia dos biocidas Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e Sulfato de Zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) no combate aos fungos dos gêneros *Aspergillus* sp, *Phialophora* sp e *Penicillium* sp, em comparação aos biocidas Timol e Vancide, atualmente empregados na área de Restauro, bem como supradefinir a concentração mais eficaz, os sais inorgânicos, a base de Cobre e Zinco. Os biocidas testados demonstraram excelente eficácia no controle dos fungos.

## 7.2 CONVENTO DE SÃO FRANCISCO DE SALVADOR

Os pontos de coleta, verificados no interior do convento (Quadro 6), apresentam, em geral, um biofilme de aspecto esverdeado e pulverulento, algumas vezes, como o observado no telhado de cerâmica, ponto 09, ou bastante compactado, como visto no claustro superior de arenito, pontos 03 e 04. O aspecto esverdeado sugere a presença de cianobactérias e microalgas. Segundo Miller e Macedo (2006), esses biofilmes verdes não só afetam drasticamente a estética da Igreja, como também promovem a deterioração do substrato, devido a sua natureza fotossintética e retenção de água.

O convento está localizado em município de clima tropical úmido, com índices elevados de temperatura, luminosidade e umidade relativa, fatores que propiciam o crescimento de alguns micro-organismos. Esta condição concorda com Pietrini (2008), relatando que, em geral, altos valores de umidade relativa, juntamente com certas condições de luz, e a entrada de nutrientes parecem ser os fatores mais importantes que permitem o crescimento biológico.

As condições ambientais verificadas no convento apresentam características já esperadas, como índices de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) maiores nos pontos externos do convento, isto é, nos pontos 01, 04 e 07 (claustro inferior, claustro superior e salão anterior ao coro). Conforme o Quadro 8, a temperatura atingiu 33, 30 e 31  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, entretanto a temperatura mostrou-se favorável ao crescimento de micro-organismos em ambos os ambientes.

O índice de umidade relativa (%) do ar mostrou-se sempre acima dos 50%, em todos os pontos verificados (Quadros 8 e 9), tendo atingido os



60% nos pontos 01 (coluna do claustro) e 06 (sala do coro), o que é suficiente para promover o crescimento de micro-organismos. Durante o dia, a irradiação de luz é principalmente de origem natural, mesmo dentro do convento, já que existem diversas janelas. A irradiação solar apresentou valores mais baixos nos pontos internos, sendo 80 Lux no ponto 03, e valores altos nos pontos externos, chegando a atingir 4800 Lux, no ponto 01.

Segundo Miller e Macedo (2006), o estabelecimento de micro-organismos fotoautotróficos em monumentos, também é regulado pela sua capacidade de aderência, flexibilidade metabólica e tolerância às condições de luminosidade, porém, quanto maior a disponibilidade de luz, maior a presença.

No gráfico da Figura 46, pode-se observar que houve a presença de UFC de bactérias totais em todos os pontos coletados, isso devido às condições ambientais, com temperatura variando entre 29 °C nos pontos 06 e 08 (sala do coro e praça da alegria) e 33 °C no ponto 01, umidade relativa elevada (60%) e disponibilidade de luz solar. Tais fatores, como se disse, favorecerem o crescimento desses micro-organismos.

Já no ponto 10 (porta lateral da igreja da I ordem), representado no gráfico da Figura 46, em substrato de madeira, a abundância de UFC de bactérias totais foi significativamente menor que nos outros pontos. Comparando-o ao ponto 10 do gráfico da Figura 47, existe um crescimento inversamente proporcional entre bactérias e fungos, sugerindo que o crescimento fúngico possa ter inibido o crescimento bacteriano neste ponto. Segundo Tiano (1998), em madeiras, quando o índice de umidade relativa está acima de 20%, esta fica suscetível ao ataque microbiano, operado principalmente por fungos, que, através da produção de exoenzimas, comprometem a integridade da madeira.

O gráfico da Figura 47 não apresenta semelhança com a distribuição verificada para bactérias, sendo marcado por pontos com crescimento mínimo e outros mostrando crescimento mais intenso. Os pontos 4, 7 e 10 apresentam grande crescimento de fungos, localizados externamente ao convento, ou seja, pontos que sofrem maior variação ambiental de temperatura e umidade. Em estudos realizados por Santos e outros (2008), esses autores observaram o estabelecimento e a dominância de fungos nas áreas externas do monumento histórico do convento franciscano de Cairu-BA, onde há incidência solar direta, comprovando a resistência destes micro-organismos a altos índices de temperatura.

No ponto 01 do gráfico da Figura 47, foi verificado o crescimento mínimo de fungos. Este local apresenta os maiores índices de temperatura (33 °C), umidade (60%) e luminosidade (4800 Lux), características estas que, segundo Miller e Macedo (2006), são fatores principais que possibilitam também o crescimento de micro-organismos

fotoautotróficos. Ainda para elas, micro-organismos fotossintéticos são habitantes comuns de monumentos, e seu crescimento representa um atributo significativo de matéria orgânica para o substrato.

As regiões externas do convento, como o claustro superior externo, o salão anterior ao coro, a porta lateral da igreja da Ordem 1a, apresentaram maior abundância de fungos, o que pode potencializar a degradação do monumento. Em estudos realizados na Itália, comparando a poluição atmosférica ao crescimento microbiológico por Moroni e Pitzurra (2008), foram encontradas espécies de fungos dos gêneros *Cladosporium* e *Penicillium*. Suas pesquisas ainda enfatizam a relação sinérgica e os efeitos dos contaminantes microbianos e dos poluentes atmosféricos na deterioração dos materiais expostos.

Devido ao fato de o convento de São Francisco de Salvador encontrar-se em região litorânea, e com clima tropical úmido, a presença de fungos é comum, principalmente os do gênero *Aspergillus*. Segundo Khandelwal (2003), em regiões de clima tropical, os fungos são os principais responsáveis pela biodeterioração e isto pode ser resolvido de forma importante, com o diagnóstico qualitativo e quantitativo dos organismos, seguido de medidas de controle adequadas. Os gêneros mais comuns verificados por eles são *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Curvularia*.

No convento de São Francisco, muitos espaços receberam pintura à base de cal e água, para minimizar o aspecto danificado provocado pela biodeterioração, porém, segundo Saad (2008), alguns fungos estão envolvidos na deterioração de superfícies pintadas, entre eles, encontram-se espécies dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma* entre outros. Esses micro-organismos podem excretar ácidos orgânicos e inorgânicos, podendo solubilizar os componentes do substrato.

Os morfotipos de fungos isolados por métodos tradicionais foram os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Os fungos, como foi dito, desempenham papel importante no intemperismo de rochas e também na biodeterioração de monumentos (MILLER et al., 2008).

Na identificação molecular, conforme as Figuras 53, 54 e 55, verificou-se que os fungos filamentosos pertencem às espécies: *Aspergillus aculeatus* e *Cunninghamella blakesleeana*. Para as amostras 4.0 e 5.7, com as sequências obtidas ainda não há como determinar com precisão qual a espécie relacionada, uma vez que pode ser tanto o *Penicillium griseofulvum* como o *Penicillium citrinum*. Assim, estaremos realizando novos testes moleculares com primers específicos do gênero *Penicillium*, a fim de obter a identificação precisa da espécie.

A espécie de fungo *Penicillium citrinum* possivelmente encontrada no claustro superior de arenito (interior e exterior), pode ter sido promovida

pela dispersão aérea, pois os materiais que formam o acervo do convento são substratos de diversas matrizes celulósicas como: o papel, a madeira e o tecido e, que é fonte de nutrientes disponível e favorável a colonização deste fungo. O que concorda com, Khandelwal (2003), onde relata que o *Penicillium citrinum* é uma espécie de fungo que ocorre colonizando diversos materiais de origem celulósica como: manuscritos de papel, madeira e tecido.

Dentre os fungos filamentosos encontrados, através das técnicas moleculares, na área interna do claustro superior, tivemos a ocorrência da espécie *Cunninghamella blakesleeana* que pertence ao filo Zygomycota, o que demonstra a diversidade de fungos neste ambiente, podendo, assim, favorecer a biodeterioração do substrato de arenito.

No Quadro 10, a análise de variância demonstrou uma diferença significativa na probabilidade ( $P < 0,05$ ) apenas para o fator tempo inicial e final (30 dias após os tratamentos com os biocidas), em relação aos dados das bactérias nos seguintes locais: claustro superior externo e interno.

Ao analisar os gráficos das Figuras 56 e 57, observamos que a concentração de 0,5% apresentou bom desempenho na redução da população de bactérias, independentemente do biocida e do local testado. Apesar da dosagem reduzida, foi tão eficaz quanto as de 1,0 e 2,0% em inibir o crescimento desses micro-organismos após os tratamentos.

Segundo os gráficos das Figuras 56 e 57, a mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%, apresentou uma redução também eficaz na microbiota de bactérias, no claustro superior. No trabalho realizado por Lopes (2003), em dois monumentos históricos de arenito, no município de Lapa-PR, a mistura dos dois biocidas numa concentração de 2,5%, mesmo a concentração sendo superior ao aplicado em nosso estudo, apresentou apenas a redução de 58% da população bacteriana.

Pelos resultados apresentados no gráfico da Figura 57 verifica-se que a população de bactérias antes da aplicação dos biocidas foi de 522 UFC/g, na parede externa do claustro superior. Após o tratamento, indicou que com a concentração de 0,5 % de Timol, o resultado foi de 165 UFC/g. No entanto, a mistura 1:1 de biocidas Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco na concentração de 0,5% demonstrou o resultado mais baixo (0 UFC/g).

A mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%, também mostrou uma redução significativa (Figura 57) na população de bactérias, na área do claustro superior (Interna e externa). A referida mistura de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco demonstrou igual ação na redução das bactérias, em

comparação com todos os outros biocidas testados. Isso pode ter sido atribuído ao efeito sinérgico por meio do consórcio (mistura) de dois biocidas, com princípios ativos diferentes, sendo que as substâncias atuaram em duas vias celulares diferentes com eficiência no combate às bactérias e em baixa dosagem, o que corrobora os resultados de Rodin e outros (2005). Esses autores realizaram um estudo que consistiu em testar o efeito dos biocidas quimicamente diferentes nas colônias da espécie de bactéria *Serratia marcescens*. Os testes com os cultivos bacterianos continham a mistura de Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) com o produto Kathon (2-N-octil-4-isothiazolin-3-1), em meio de cultura Agar Medium. Os resultados demonstraram que, mesmo em baixas concentrações, ocorreu uma diminuição significativa nas colônias das bactérias, o que foi atribuído ao efeito sinérgico dos biocidas testados.

Segundo o Quadro 11, a análise de variância demonstrou uma diferença significativa na probabilidade ( $P < 0,05$ ) para o local, o tempo e a interação do local com o tempo em relação aos dados dos fungos no claustro superior da região interna e externa do convento.

De acordo com os gráficos das Figuras 59 e 60, os tratamentos nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%, independente do biocida, reduziram significativamente os fungos, no substrato de arenito do claustro superior, nas regiões interna e externa do convento de São Francisco de Salvador.

No gráfico da Figura 59, a concentração de 0,5, 1,0 e 2,0% do Preventol BP apresentou redução total na população de fungos, conforme análises microbiológicas quantitativas. No convento de São Francisco de Salvador, tivemos a presença dos gêneros de fungos: *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. O Preventol BP é um biocida que tem como princípio ativo o Clorofenol e que, segundo certificado de análise (C.A.) do fabricante Lanxess, o produto é considerado eficaz no combate a fungos das espécies: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* e *Rizhopus stolonifer*.

A partir dos resultados apresentados nos gráficos das Figuras 56 e 59, pode-se perceber que a ação dos biocidas Timol, Preventol BP e a mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco apresentam ação eficaz tanto na redução da população de fungos quanto na de bactérias, sendo estes biocidas testados no mesmo substrato da área interna do claustro superior.

Conforme o gráfico da Figura 59, as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% da mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco apresentaram a redução na população de fungos, ou seja, a microbiota foi reduzida significativamente. Também foi observado que as manchas diminuíram no que se refere à avaliação visual do substrato, após os diferentes

tratamentos deste biocida, conforme visto na área interna do claustro superior (Figura 58).

Conforme o gráfico da Figura 60, a concentração de 0,5, 1,0 e 2,0% do biocida Timol logrou a redução significativa na população dos fungos, o que comprova ação tóxica dos compostos fenólicos (Timol) sobre as células dos fungos, pois, segundo Tortora (2006), os compostos fenólicos agem diretamente na estrutura celular do fungo, rompendo a membrana plasmática e desnaturando as enzimas. Com esse mecanismo de ação do Timol sobre os micro-organismos, as células fúngicas são impedidas de desenvolver suas estruturas vegetativas essenciais para o crescimento do micélio.

Nota-se na área externa do claustro superior, conforme a Figura 61, que, após a aplicação da mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco, as manchas diminuíram significativamente, no que se refere ao aspecto visual do substrato, após os diferentes tratamentos deste biocida.

Após os tratamentos com mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco nos substratos testados do convento de São Francisco de Salvador, pôde-se perceber que esse biocida alternativo possui o metal cobre na sua composição, o que pode ter contribuído significativamente para a redução da microbiota fúngica devido a sua ação tóxica. Segundo, El-meleigy (2010) relata que o cobre é um metal com propriedades tóxicas e pode induzir alterações morfológicas e químicas na parede celular de fungos, como o da espécie *Cunninghamella blakesleeana*.

### 7.3 CONVENTO FRANCISCANO DE SANTO ANTÔNIO DE SÃO FRANCISCO DO CONDE

Os pontos de coleta verificados no interior do convento (Quadro 12) apresentam, em geral, um biofilme de aspecto esverdeado, como foi observado na sala de estudos, ponto 05, ou bastante denso como visto na biblioteca e coro, pontos 01 e 03. O aspecto esverdeado sugere a presença de cianobactérias e microalgas.

No exterior do monumento (Quadro 13), foi observado que os locais demonstram, em geral, a presença de manchas escuras, de aspecto pulverulento e, às vezes, tomando toda estrutura pétreo, como verificado na fachada da galilé no ponto 10. O substrato que predomina é o revestimento de argamassa, e os registros fotográficos do Quadro evidenciam sinais de degradação do material. Também foi verificado que, na parede externa do claustro superior (ponto 04), havia biofilme

com coloração esverdeada na superfície da parede com revestimento de argamassa e com pintura de cal, o que pode indicar a presença de micro-organismos realizando a biodeterioração e atacando os diversos materiais.

Os micro-organismos envolvidos no processo de biodeterioração se adaptam aos mais diversos substratos, devido, principalmente, à diversidade microbiana que compõe o biofilme. Substratos orgânicos, como madeira, tecido, papel e alguns tipos de tinta, são facilmente colonizados, por conta da disponibilidade de nutrientes. Os mesmos substratos inorgânicos como o calcário, arenito e outros tipos de material rochoso, mesmo sendo mais resistentes, também são atingidos por esses micro-organismos (TIANO, 1998).

A área externa do convento está exposta aos agentes atmosféricos que podem estar influenciando o processo de biodeterioração, já que se trata de um município de clima tropical úmido, de alta dispersão do spray marinho, com elevada umidade e localizado em uma região de estuário. Esses fatores têm contribuído para a proliferação de micro-organismos que formam o biofilme, como foi evidenciado através de manchas de pigmentação escura e verde, de aspecto pulverulento e, conseqüentemente, colonizando os diversos substratos como madeira, azulejos, rochas, revestimentos de argamassas, entre outros. O que corrobora os estudos de Urzi e outros (1993), para os quais, a colonização das superfícies externas dos edifícios históricos provoca o aparecimento de micro-organismos conhecidos esteticamente como prejudiciais e que mancham através de seus pigmentos coloridos.

A presença de umidade relativa alta na parede lateral da biblioteca, no ponto 02, favorece a biodeterioração por micro-organismos fotolitotróficos, cianobactérias e microalgas, pois o ambiente úmido, associado à luz solar disponível, permite a fotossíntese e o conseqüente desenvolvimento e reprodução desses agentes biológicos. O resultado são manchas verdes e escuras na parede do edifício histórico, causando danos estéticos e comprometendo assim a leitura artística do monumento.

O convento Santo Antônio de São Francisco do Conde está localizado em região litorânea, de clima tropical úmido, com forte influência da brisa marinha, chuvas e da umidade do ar, fatores que contribuem para o crescimento e a atividade microbiana e, conseqüentemente, para a biodeterioração dos materiais. Esse achado concorda com o de Videla (2001), que relata que tanto os solos como as rochas constituem ambiente heterogêneo repleto de matéria orgânica, pH favorável, temperatura e presença de água. Esta heterogeneidade ambiental conduz a uma flutuação em número e nas atividades dos micro-organismos.

As condições ambientais verificadas no convento (Quadros 14 e 15) apresentam com as características já esperadas, como os índices de temperatura (°C), maiores, nos locais externos do convento, que são constituídos de materiais de origem rochosa, conforme observado nos pontos 02, 04 e 10 (biblioteca, claustro superior e fachada da galilé). A temperatura atingiu 33, 31 e 38 °C, respectivamente, e mostrou-se mais acentuada no ponto 10 (fachada da galilé), em relação às demais áreas, possivelmente devido à incidência direta dos raios solares na entrada do monumento, entretanto a temperatura mostrou-se favorável ao crescimento de micro-organismos em todos os ambientes.

No relato de Tiano (1998), após as intervenções de limpeza da pedra algumas substâncias químicas (protéticos com ou sem consolidantes) podem ser aplicadas ao objeto a fim de aumentar sua proteção e coesão da água. Esses produtos podem impedir, ou retardar, a recolonização do substrato, diminuindo sua porosidade, aspereza e índice de água, mas, em circunstâncias ambientais críticas, podem favorecer o desenvolvimento da microbiota, sendo que os monumentos expostos a temperatura e a umidade, por longos períodos de tempo, são favoráveis ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas.

O índice de umidade relativa (%) do ar mostrou-se sempre acima dos 50%, em todos os pontos verificados, tendo atingido os 73, 73 e 77% nos pontos 06, 09 e 10 (sala de estudos, púlpito e fachada da galilé), respectivamente, o que é suficiente para promover o crescimento de micro-organismos. Durante o dia, a irradiação de luz é principalmente de origem natural, mesmo dentro do convento, já que existem diversas janelas. A irradiação solar apresentou valores mais baixos nos pontos internos, sendo 38 Lux no ponto 07, e valores altíssimos nos pontos externos, chegando a atingir 96800 Lux no ponto 10, sendo observado que esta área é um local de incidência direta da luz solar, logo pode favorecer a presença de micro-organismos pigmentados como as microalgas.

A produção e a liberação de substâncias metabólicas das colônias de fungos, microalgas e cyanobactérias podem provocar danos estéticos aos materiais que compõem os monumentos históricos.

No ponto 07 (coluna da nave) dos gráficos das Figuras 62 e 63, foram registrados o não crescimento de fungos e a presença significativa de bactérias (491 UFC/g) no substrato com revestimento de argamassa e com pintura de cal, em grau de degradação intensa. Este local apresenta um índice de temperatura de 28°C e baixa luminosidade, 38 Lux. Segundo Resende (2008), algumas bactérias como as do gênero *Nitrobacter* (converte nitrito em nitrato), sob influência dos fatores ambientais, promovem reações de oxidação que destroem o material

alcalino e o carbonato de cálcio, formando nitratos, que são solúveis em água, levando à perda de material rochoso.

No gráfico da Figura 63, pode-se observar que houve a presença de UFC de bactérias totais, em boa parte dos pontos coletados, devido às condições ambientais, com temperatura variando entre 28 °C nos pontos 01, 05, 07 e 08 (biblioteca interna, sala de estudos interna, coluna da nave e painel de azulejos da nave) a 38 °C no ponto 10 (fachada da galilé). Além disso, nesse mesmo local, apresenta umidade relativa elevada de 77%, conforme verificado, e disponibilidade de luz solar abundante (96800 Lux). Fatores como esses podem favorecer o crescimento de agentes biológicos, como as cyanobactérias, que atacam as estruturas e o material do edifício histórico.

Já no ponto 08 (painel de azulejos da nave), conforme o gráfico da Figura 63, o azulejo com presença de lacunas em diversas áreas do vidro e com biofilme esverdeado pode indicar a presença de microalgas. A abundância de UFC de bactérias totais foi significativamente menor (apenas 1 UFC/g), se comparado aos demais pontos. Existe um crescimento inversamente proporcional entre bactérias e organismos fotoautotróficos, sugerindo que o grande crescimento dos fotoautotróficos possa ter inibido o crescimento bacteriano neste ponto.

Nos gráficos das Figuras 62 e 63, ambas não apresentam semelhança com a distribuição verificada para bactéria e fungos, sendo estes marcados por pontos com crescimento mínimo e outros apresentando crescimento mais intenso. Os pontos 05, 07 e 09 do gráfico da Figura 63 apresentam grande crescimento bacteriano. Esses pontos estão localizados internamente no convento, ou seja, são favorecidos pelas condições não controladas de temperatura e umidade relativa no interior do monumento, o que está de acordo com Oliveira (1988), ao relatar que ambientes fechados, quentes e úmidos são bastante propícios ao desenvolvimento de micro-organismos, principalmente quando existe uma base de origem orgânica.

Na identificação molecular, verificou-se que os fungos filamentosos pertencem às espécies *Aspergillus aculeatus* e *Trichoderma longibrachiatum*. Para a amostra 2.1, com a sequência obtida, ainda não há como determinar com precisão qual a espécie relacionada, uma vez que tanto pode ser o *Penicillium griseofulvum* como o *Penicillium citrinum*. Assim, estaremos realizando novos testes moleculares com primers específicos do gênero *Penicillium*, a fim de obter a identificação precisa da espécie.

Se confirmada, a ocorrência da espécie de fungo *Penicillium griseofulvum*, na área interna da biblioteca do convento do Conde, pode contribuir com a biodeterioração de diversos materiais expostos como, a



madeira, o tecido e livros, além, das condições ambientais favoráveis desse local. Conforme, pesquisa realizada por Valetin (2001), foi detectada a presença de *Penicillium griseofulvum* em bioaerossóis de arquivos e museus espanhóis. Ainda segundo o autor, a espécie de fungo esteve associada à biodeterioração de diversos materiais, muitas vezes, as coleções são expostas em prédios históricos que mantem condições de umidade e ventilação favoráveis ao desenvolvimento desse fungo.

Na região externa do convento, como na parede da sala de estudos, tivemos a presença do fungo da espécie *Aspergillus aculeatus*, o que pode potencializar o desgaste físico e o dano estético do material pétreo da parede, ao ser contaminado por seus metabolitos, resultado da ação enzimática, sendo que a temperatura favorável de 30°C (Quadro 14) pode possibilitar essa condição. O que corrobora os achados de Hocking (2006), segundo o qual, a espécie de *Aspergillus aculeatus* cresce a temperaturas entre 10 a 42°C e tem preferência pela temperatura ideal de 30°C para a o seu desenvolvimento metabólico e com alta atividade enzimática.

Nota-se que, na região interna da biblioteca (parede revestida de argamassa e com pintura de cal), as manchas coloridas são evidentes. Isto pode ser devido à presença do gênero *Phialophora* sp2 (Figura 66). Trata-se de fungo com coloração pigmentada, que produz cadeias de conídios, o que pode ter causado o dano estético ao ambiente interno do monumento.

Na região interna da biblioteca, foi verificada a ocorrência da espécie de fungo *Trichoderma longibrachiatum*. Os esporos desse fungo podem ter sido transportados pelo ar e contaminado o ambiente, pois as condições do vento, da temperatura e da umidade são favoráveis a essa dispersão. Conforme, o relato de Schoenlein-crusius e outros (2001), os parâmetros ambientais, tais como pressão atmosférica, vento, temperatura e umidade, podem influenciar a concentração de esporos de fungos no ar ou a diversidade da micota. O gênero *Trichoderme* é um dos grupos de fungos anemofílos que contribuem para contaminação dos ambientes aéreos das cidades.

Os gêneros verificados no convento franciscano Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA também foram encontrados por outros autores. Segundo Santos (2009), em estudos realizados no município de Cairu-BA, entre os fungos envolvidos no processo de biodeterioração, encontravam-se os gêneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp e *Phialophora* sp.

A presença da espécie *Trichoderma longibrachiatum* no biofilme da parede interna da biblioteca foi evidenciada através de manchas naquele substrato, pois se trata de um fungo com capacidade de

biodeterioração de diversos materiais. Também foi detectado o dano estético ao monumento devido à produção de pigmentos coloridos. De acordo com pesquisas desenvolvidas por Abrusci e outros (2005), a espécie de fungo *Trichoderma longibrachiatum* estava associada à biodeterioração do patrimônio cultural de arquivos cinematográficos espanhóis; os filmes antigos, à base de componentes orgânicos (triacetato de celulose), estavam contaminados com biofilme e comprometidos no seu aspecto mecânico e estético, em face da produção de metabolitos. Estes, em determinadas condições ambientais, tais como fluxo de ar, temperatura e movimento de pessoal, tiveram um papel crucial na ocorrência dos fungos nos ambientes internos e nos danos dos materiais.

De acordo com o Quadro 16, a análise de variância demonstrou uma diferença significativa na probabilidade ( $P < 0,05$ ) para o local, o tempo e a interação do local com o tempo em relação aos dados da população bacteriana na parede interna da biblioteca e na parede externa da sala de estudo.

Os tratamentos com os biocidas Timol e Preventol BP e a mistura de 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco apontaram o decréscimo da população bacteriana da parede interna da biblioteca e, na parede externa da sala de estudos, foi significativo, conforme os gráficos das Figuras 69 e 70, o que indicou eficácia desses biocidas no combate aos micro-organismos dos substratos analisados.

Com a mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco, mesmo estando em baixa concentração (0,5%), conforme os gráficos das Figuras 69 e 70, a redução na população de bactérias foi também significativa. De acordo com trabalhos também realizados por Resende (2008), os compostos de cobre são usados por profissionais da área da preservação do patrimônio histórico, por serem substâncias extremamente tóxicas para as células dos micro-organismos, em especial devido ao sinergismo (efeito combinado) com diferentes substâncias orgânicas. Além disso, o cobre tem efeito letal sobre bactérias e fungos mesmo em doses baixas.

Conforme o gráfico da Figura 69, podemos notar que, após a aplicação da mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco, ocorreu uma diminuição das manchas verdes (Figura 71), no que se refere à avaliação visual do substrato da parede interna da biblioteca, após os 30 dias, do tratamento do biocida, provavelmente foi possível devido à ação do produto aplicado.

De acordo com o Quadro 17, a análise de variância demonstrou uma diferença significativa na probabilidade ( $P < 0,05$ ) para o local, o biocida, a concentração, o tempo, o biocida com a concentração, o local com o tempo, o biocida com o tempo, a concentração com o tempo, a interação

do local com o biocida e a concentração, e, por fim, o biocida com a concentração e o tempo. Isto ocorre em relação aos dados dos fungos na parede interna da biblioteca e na parede externa da sala de estudo, sendo ambos, substratos de argamassa.

A concentração de 1,0% do Preventol BP apresentou redução total na população de fungos da parede interna da biblioteca, após 30 dias do tratamento, conforme, demonstra o gráfico da Figura 72. Tal resultado está de acordo com os de Oliveira (1988), que realizou pesquisas utilizando o biocida químico Preventol a 1,0% no controle da biodeterioração por fungos, que comprometia a camada pictórica do mural artístico de Genaro de Carvalho, localizado no Hotel da Bahia em Salvador-BA. Os resultados do tratamento com o biocida Preventol foram satisfatórios, pois demonstrou redução no crescimento dos fungos.

Pode-se notar que, no gráfico da Figura 72, as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% da mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco apresentaram o decréscimo total na população de fungos após os tratamentos dos biocidas, ou seja, os fungos possivelmente foram eliminados devido à ação conjunta do Cobre e do Zinco. Segundo Gaylarde (2008), o Cobre é um bom algicida, que também tem atividade antifúngica. Este metal tem sido usado para impedir incrustações de cascos de navios, doenças fúngicas da videira e ainda utilizado como cobre-cromo e sais de arseniato de cobre na proteção de estruturas de madeira.

Segundo a Figura 73, observou-se que o biocida, mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco, reduziu também, totalmente, a população de fungos, nas três concentrações testadas (0,5, 1,0 e 2,0%) no substrato da parede externa da sala de estudos do convento de São Francisco do Conde. Isto pode ser atribuído à presença do elemento metálico Zinco, que também exerce ação letal sobre fungos. Segundo Tortora (2006), o zinco, por fazer parte do grupo dos metais pesados, age diretamente na célula dos micro-organismos desnaturando as enzimas e proteínas essenciais para o desenvolvimento microbiano.

A partir dos resultados apresentados nos gráficos das Figuras 69, 70, 72 e 73, pode-se perceber que a ação dos biocidas Timol, Preventol BP e da mistura 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco revelou uma redução significativa na microbiota de bactérias e de fungos, considerando-se tanto o ambiente interno como o ambiente externo do convento. A excelente ação tóxica de todos os biocidas testados no substrato de argamassa foi equivalente, o que diferencia o biocida à base de Cobre e Zinco dos demais é a sua via de ação no sistema celular das bactérias e dos fungos, além de seu custo, pois o preço é o menor de todos. (R\$: 9,50/60 L).

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos presentes cultiváveis e isolados, por métodos tradicionais, no convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-BA são caracterizados pelos gêneros: *Aspergillus* sp1, *Aspergillus* sp2, *Paecilomyces* sp1, *Paecilomyces* sp2, *Penicillium* sp1, *Phialophora* sp1, *Rhizopus* sp e Indeterminado sp.

A microbiota cultivável presente no convento de São Francisco de Salvador-BA e no convento franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde-BA, é caracterizada por bactérias e fungos. Os fungos, isolados e identificados, por meios tradicionais, no convento de Salvador, são pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp3, *Aspergillus* sp4, *Aspergillus* sp5, *Penicillium* sp2 e *Penicillium* sp3. Já no convento de São Francisco do Conde, esses fungos são dos gêneros *Aspergillus* sp 6, *Penicillium* sp 4 e *Phialophora* sp2.

Os fungos filamentosos cultiváveis, identificados por técnicas moleculares presentes no convento de São Francisco de Salvador, são das espécies *Aspergillus aculeatus* e *Cunninghamella blakesleeana*. Já os identificados no convento franciscano de Santo Antônio de São Francisco do Conde pertencem às espécies: *Aspergillus aculeatus* e *Trichoderma longibrachiatum*.

Esses micro-organismos presentes nos biofilmes, associados a fatores ambientais, podem influenciar os processos de biodeterioração verificados nos conventos. Os índices determinados no ambiente para temperatura, umidade relativa e luminosidade favoreceram o crescimento de bactérias e fungos, principalmente no ambiente externo, onde estes índices são mais acentuados.

As bactérias mostraram-se abundantes em praticamente todos os substratos estudados, nos casos dos conventos franciscanos de Salvador e de São Francisco do Conde, tendo sido mesmo frequentes no substrato de madeira, onde houve a predominância da microbiota fúngica. Já os fungos distribuíram-se, de maneira mais acentuada, nos substratos localizados externamente ao convento, suportando índices variáveis de temperatura, umidade relativa e luminosidade.

Em relação ao convento franciscano de Cairu, parece haver uma relação do tipo de substrato com a presença de *Penicillium* sp 1 e *Phialophora* sp 1, que se apresentaram associados ao substrato com pintura de cal, enquanto o morfotipo *Rhizopus* sp e o Indeterminado sp estiveram associados ao substrato de madeira. Já nas superfícies dos

substratos de calcário, os gêneros que mais dominaram foram o *Aspergillus* sp1 e o *Aspergillus* sp2.

O biocida Timol teve significativa ação tóxica no combate às bactérias e aos fungos nos conventos franciscanos de Salvador, Cairu e São Francisco do Conde, porém, segundo o fabricante, este produto possui o DL50 (980 mg/Kg), de ação tóxica mediana ao ser humano, com seu odor forte, causando irritação aos olhos e nariz, durante o processo de manipulação, além do seu alto custo.

O biocida Preventol BP demonstrou também significativa eficiência no combate aos fungos e bactérias presentes nos biofilmes dos três edifícios históricos. O custo desse produto, porém, ainda é alto, além da dificuldade de obtê-lo fracionado (apenas sacos de 25 kg).

No presente trabalho, foi comprovada a eficiência do biocida sugerido (mistura de biocidas 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco), podendo-se definir este consórcio como um agente biocida alternativo a ser aplicado nos micro-organismos presentes nos biofilmes dos três monumentos históricos estudados, em virtude da boa eficácia no combate à microbiota do biofilme. Essa substância é extremamente tóxica às células dos micro-organismos, especialmente devido ao sinergismo (efeito combinado) com diferentes substâncias orgânicas. Além disso, o cobre tem efeito letal sobre bactérias e fungos, mesmo em baixa concentração.

A partir dos resultados obtidos, podemos sugerir a concentração de 0,5% da mistura de biocidas 1:1 de Sulfato de Cobre com Sulfato de Zinco, a melhor a ser aplicada nos monumentos, além da eficácia no combate aos micro-organismos avaliados e toxicidade mediana ao ser humano, equivalente aos demais biocidas testados (Timol e Preventol BP). Ademais, possui o menor custo financeiro e facilidade de aquisição no mercado em relação aos outros.

Contudo, os efeitos colaterais dos biocidas precisam ser avaliados cuidadosamente, como mudanças de cor do objeto a ser protegido, corrosão e cristalização intensa, que devem ser evitados. E, para isso, é sugerido que se faça um diagnóstico criterioso e um ensaio antes da aplicação, numa pequena superfície do material. No caso dos três biocidas testados, nas áreas selecionadas dos monumentos, não foram observados os efeitos colaterais citados, mas, a fim de verificar a evolução do tratamento, recomendamos nova avaliação dos substratos testados, após seis meses de aplicação.

O tratamento com o biocida alternativo à base de Cobre e Zinco é fundamental. Entretanto, por mais que se obtenha o efeito residual, para ser controlada, a proliferação necessita de manutenção preventiva dos edifícios históricos por parte dos usuários, e isto pode ser feito com

medidas importantes e, também, com o controle das condições de temperatura e umidade relativa.

Os resultados deste trabalho só foram possíveis devido à ação interdisciplinar, mostrando a sinergia da pesquisa, ao reunir áreas da Conservação e do Restauo, da História da Arte, da Química, da Microbiologia Ambiental, da Taxonomia e da Biologia Molecular. Essas áreas caminham juntas na descoberta de meios de controle para o problema da biodeterioração.

Embora se considere importante esta pesquisa, deve ser encarada como parte de um esforço que precisa continuar, pois é imperativo que, para a evolução dos sistemas de proteção e preservação dos monumentos, devem ser incluídos estudos intensivos acerca dos microorganismos que agem na biodeterioração. Além disso, os meios de controle devem ser mais eficazes no combate aos agentes biológicos presentes no biofilme, não causem interferência no material, sejam de baixo custo econômico e provoquem o mínimo impacto no meio ambiente. A expectativa é que esta pesquisa desperte o interesse dos órgãos responsáveis pelo patrimônio histórico para sua preservação e restauração.

## REFERÊNCIAS

A BÍBLIA Sagrada: Antigo e Novo Testamento. Tradução dos originais mediante a versão dos Monges de Maredsous (Bélgica) pelo Centro Bíblico Católico. 30 ed. São Paulo: Ave Maria, 1981.

ABRUSCI, C.; MARTÍN-GONZÁLEZ, A.; DEL AMO, A.; CATALINA, F.; COLLADO, J.; PLATAS, G. Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films: Madrid-Spain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.56, p.58-68, 2005.

ALLSOPP, D.; SEAL, K. J.; GAYLARD, C. C. Introduction to biodeterioration. 2nd. ed. Cambridge, USA: Cambridge University Press, 2004.

ARGOLO, J. D. Abordagem conceitual sobre restauro. APCR . Associação Paulista de Conservadores e Restauradores de Bens Culturais, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 29-32, nov. 2005.

ARGOLO, J. D. O Convento Franciscano de Cairu: restauração dos elementos artísticos. Brasília: Unesco: Iphan, 2009.

ANVISA . Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação sobre Autorização de Registro, Renovação de Registro e Extensão de Uso de Agrotóxicos e Afins: Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Disponível em: < [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) >. Acesso em: 23 mar. 2011.

BARNETT, H. L.; BARRY B. HUNTER. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. Minnesota: APS PRESS, 1998.

CANEVA, G.; NUGARI, M. P.; SALVADORI, O. Biology in the conservation of works of art. Rome: International Centre for the Study of the Preservation and Restoration of Cultural Property, 1991.

CAR . COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO E AÇÃO REGIONAL. Plano Diretor do Município de Cairu, Ba: Relatório técnico nº 02. Salvador, 2004.

CARMICHAEL, J. W.; KENDRICK, W. Bryce; CONNORS, Lynne Sigler L. Genera of Hyphomycetes. Canada: University of Alberta Press, 1981.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water: further researches. Journal of Tropical Medicine and Higiene, n.70, p.181-184,1967.

CIFERRI, O. Microbial degradation of paintings. Applied and Environmental Microbiology, v.65, n.3, p.879-885, Mar.1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=91117>>. Acesso em: 16 ago. 2009.

CRISPIM, C. A. et al. Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 54, p.121-124, 2004.

ELLIS, M.B.: More Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, Commonwealth: Mycological Institute, 1976.

EL-MELEIGY, M. A.; EL-KASABY, A. M.; OSMAN, N. H. Microorganisms as a Tool in Biotechnology of Sea Water Treatment, Egypti. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v.4, p.1.083-1.099, 2010.

FAZENDA, Jorge M. R.(Coord.). Tintas e Vernizes: ciência e tecnologia. 2. ed. São Paulo: ABRAFATI, 1995. v.1.

FAZENDA, Jorge M. R.(Coord.).Tintas e Vernizes : ciência e tecnologia. 2. ed. São Paulo: ABRAFATI, 1995. v.2.

FLEXOR, Maria Helena Ochi; FRAGOSO, Frei Hugo (Org.). Igreja e Convento de São Francisco da Bahia. Salvador: Odebrecht, 2009.

FRANÇA, T.S.; SANTOS, A. B.; ESPIRITO SANTO, A. A.; Efeito de Biocidas sobre o crescimento de *Aspergillus* sp, *Phialophora* sp e *Penicillium* sp, isolados do Convento Franciscano Santo Antônio de Cairu-Ba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25., 2009, Porto de Galinhas-PE. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Anais... São Paulo: SBM in Foco, 2009. v. 9, p. 04-132.

GAYLARDE, P.M.; GAYLARDE, C.C. A safe controlled release biocide based copper Porto Alegre, RS, Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 37, p.1-2,1996.

GAYLARDE, P.M.; GAYLARDE, C.C. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.46, Issue 2, p.93-97, Sept. 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09648305> >. Acesso em: 22 fev. 2010.

GAYLARDE, P.M. et al. Cyanobacteria from Brazilian Building Walls Are Distant Relatives of Aquatic Genera. *A Journal of Integrative Biology*, v. 9, n.1, p.30-42, 2005.

GAYLARDE, C.C.; GAYLARDE, P.M.; BEECH, I.B. Deterioration of limestone structures associated with copper staining Porto Alegre, RS, Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 62, p. 179-185, 2008.

GONZALEZ, Juan M.; SAIZ-JIMENEZ, Cesáreo. Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *International Microbiology*, v.8, n.3, p.189-194, 2005. Disponível em: <<http://scielo.isciii.es/pdf/im/v8n3/06%20Gonzalez.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2010.

GOOGLE MAPS BRASIL. Disponível em: < [http://maps.google.com.br/maps/geocode\\_result&ct=image&resnum](http://maps.google.com.br/maps/geocode_result&ct=image&resnum) >. Acesso em: 28 mar. 2010.

GRIFFITHS, R. I. et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of Ribosomal DNA and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n.12, p.5.488-5.491, Dec.2000. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC\\_92488/pdf/am005488.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC_92488/pdf/am005488.pdf) > Acesso em: 2 mar. 2010.

GU, J.-D. Biofouling and prevention: corrosion, biodeterioration and biodegradation of materials. In: KULTZ, M. (Ed.). *Handbook of Environmental Degradation of Materials*. New York: William Andrew Publishing, 2005. p.179-206. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=fWk-lfP7YAC&pg=PA179&lpg=>



PA179&dq= BIOFOULING+AND+PREVENTION+Ji-Dong+ Gu&source >. Acesso em: 20 out. 2009.

HOCKING, A. D. Aspergillus and related teleomorphs, Australia. Food Science Australia, v.17, p.451-487, 2006.

IPHAN - INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL. Arquivo Noronha dos Santos: Livro das Belas Artes-Cairu. Disponível em: < [http// www.iphan.gov.br/ans/inicial.htm](http://www.iphan.gov.br/ans/inicial.htm)>. Acesso em: 25 abr. 2009.

KHANDELWAL, A. Sampling and Estimate of fungal biodeteriogens of Lucknow. AICCM Buletin, v.28, p.76-81, 2003.

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.

KOWALCHUK, G.A.; BODELIER, P.L.E.; HEILIG, G.H.J.; STEPHEN, J.R.; LAANBROEK, H.J. Community analysis of ammoniooxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. FEMS Microbiol. Ecol., n.27, p.339-350, 1998.

KUMAR, R.; KUMAR, A.V. Biodeterioration of Stone in Tropical Environments:an overview.EUA: The J. Paul Getty Trust, 1999.

LOPES, C. V. G.; CARVALHO, F. J. P. C.; KRIEGER, N. Biodeterioração: o ataque de microrganismos a monumentos históricos. Ciência Hoje, Brasília, v. 34, n.200, p. 34-39, dez. 2003.

MACÁRIO, C. M. Caracterização de madeiras usadas em estruturas de telhado em edifícios antigos. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense. Disponível em: < [http://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-R&lr=lang\\_pt&q=cache:pEheYVz2LqEj:www.carloszz.hpg.ig.com.br/carac.pdf+biodeteriora%C3%A7%C3%A3o](http://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-R&lr=lang_pt&q=cache:pEheYVz2LqEj:www.carloszz.hpg.ig.com.br/carac.pdf+biodeteriora%C3%A7%C3%A3o) >. Acesso em: 12 nov. 2010.

MARGULIS, L.E.; SCHWARTZ K.V. Cinco reinos: um guia ilustrado dos filós da vida na Terra. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife: UFPE: Imprensa Universitária, 2004.

MILLER, A. Z. et al. Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions. Science of the total environment, v. 405, n.1-3, p.278-285, Nov. 2008.

MILLER, A.; MACEDO, M. F. Mapping and characterization of a green biofilm inside of Vilar de Frades church (Portugal): Proceedings of the International Conference on Heritage, Weathering and Conservation. Madrid: Ed Forte, June 2006, p.21-24.

MORALES, O. O.; DUQUE, G. H. Biodeterioro de monumentos históricos Mayas. *Ciencia y Desarrollo, México*, v. 24, n.139, p. 48-53, mar./abr. 1998.

MORONI, B.; PITZURRA, L. Biodegradation of atmospheric pollutants by fungi: a crucial point in the corrosion of carbonate building stone. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 62, p. 391-396, 2008.

MOUGA; PROENÇA. Metodologias de controlo da flora infestante de monumentos: o caso da Porta Especiosa da Sé Velha de Coimbra. *Patrimônio Estudos*, Lisboa, n. 3, p.63-69, 2002.

NIMIS, P. L.; PINNA, D.; SALVADORI, O. Lichene e conservazione dei monumenti. Bologna: Editorice Clueb de Bologna,1992.

NUGARI, M.P.; PIETRINI, A.M.; CANEVA, G.; IMPERI, F.; VISCA, P. Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: the Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, p.705-711, 2009.

NUHOGLU, Y.; OGUZ, E.; USLU, H.; OSBEK, A.; IPEKOGLU, B.; OSCAK, I.; HANSENEKOGLU, I. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Science of the Total Environment*, n.364, p.272-283, July 2006.

OLIVEIRA, E. C. Introdução à Biologia Vegetal. 2. ed. São Paulo:EDUSP, 2003.

OLIVEIRA Mário Mendonça de. Tecnologia da conservação e da restauração. 3.ed. Salvador:EDUFBA, 2006.

OLIVEIRA, Mário Mendonça de; SANTIAGO, Cybèle Celestino. Estudo sobre a degradação biológica de um mural. *Revista Rua*, Salvador, v. 1, n. 1, p. 53-72, 1988.

PELCZAR Jr.; Joseph Michael; CHAN, E.C.S.; KRIEG, Noel R. *Microbiologia: conceitos e aplicação*. 2. ed. São Paulo: Macron Books,1996, v.1.

PIETRINI, A.M.; RICCI, S.; NUGARI, M.P. Churches and crypts. In: CANEVA, G.; NUGARI, M.P.; SALVADORI, O. (Ed.). *Plant Biology for Cultural Heritage: biodeterioration and conservation*. New York: Getty Conservation Institute, 2008. p. 179-183.

PINHEIRO, Sayonara Maria de Moraes. Impacto da colonização do fungo *Cladosporium sphaerospermum* sobre a argamassa do concreto. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil)-UFES, Vitória, 2003.

RESENDE, M. A. Fungos biodeteriogênicos em prédios históricos de pedra. In: VIDELA, Hector A.; GIUDICE, Carlos A. (Org.). *Jornadas Científico Tecnológicas sobre Prevencion y Proteccion del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental: Memorias*. La Plata: Buro Grafik S.R.L., 2002. v.1, p. 79-103.

RESENDE, M. A. Biodeterioração de monumentos históricos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. 2.ed. Jaguariúna: Embrapa-CPMA, 2008, p. 501-520.

RONDON, M. R. et al. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *App. Env. Microbiol*, v.66, n.6, p.2.541-2.547, 2000.

ROCA, E. E.; ERRICO, E. D.; IZZO, A.; STRUMIA, S.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. In vitro saprotrophic basidiomycetes tolerance to pendimethalin, Italia. *International Biodeterioration& Biodegradation*, v. 63, p.182-186, 2009.

RODIN, V.B.; ZHIGLETSOVA, S.K.; KOBELEV, V.S.; AKIMOVA, N.A.; KHOLODENKO, V.P. Efficacy of individual biocides and synergistic combinations Moscow, Russia. *International Biodeterioration& Biodegradation*. v. 55, p.253-259, 2005.

SAAD, D. S. Métodos bioquímicos e moleculares para a avaliação da biodeterioração em tintas residenciais. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia)-UFRGS, Porto Alegre, 2002.

SAAD, D. S. Notas de aula. Curso de Especialização em Conservação e Restauração de Patrimônio Cultural. Curso de Biodeterioração, Rio Grande do Sul, UFSM, 2003.

SAAD, D. S. Biodeterioração no ambiente construído. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa-CPMA, 2008. p. 339-350.

SAMBROOCK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

SANTOS, A. Braga dos. Identificação de Fungos Responsáveis pela Biodeterioração do Convento Franciscano Santo Antonio de Cairu-Ba. 2007. 57f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)-Faculdade de Ciências Agrárias e da Saúde, União Metropolitana de Educação e Cultura, Lauro de Freitas, 2007.

SANTOS, A. B.; ARGOLO, J. D.; ESPIRITO SANTO, A. A.; CARVALHO, G. C.; MORAES JUNIOR, V. Identificação de fungos responsáveis pela biodeterioração do convento franciscano de Santo Antônio de Cairu-Ba. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2., 2008, Aracaju. Anais... Aracaju: BDT - Bioteriores, 2008. 1 CD-RON.

SANTOS, A. B. Identificação de fungos responsáveis pela Biodeterioração do convento franciscano Santo Antônio de Cairu-BA. In: ARGOLO, J. D. O Convento franciscano de Cairu: restauração dos elementos artísticos. Brasília: Unesco: Iphan, 2009.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 32, p. 955-962, mar. 2007.

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

SCHOENLEIN-CRUSIUS I.H. et al. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 32, n.1, p.61-65, 2001.

SHIRAKAWA, M.A. et al. A biodeterioração de materiais de construção civil. *Revista Técnica: A Revista de Tecnologia da Construção Civil*. São Paulo, PINI, v..5, n 33, p. 36-39, mar./abr. 1998.

SHIRAKAWA, M. A., JOHN, V. M.; CINCOTTO, M. A., .Biodeterioração no ambiente construído. In: De Melo, Itamar Soares; De Azevedo, João Lúcio. (Org.). *Microbiologia ambiental*. 2a ed. Jaguariúna: Embrapa, 2008, v., p. 477-499.

SILVA FILHO, G.N.; OLIVEIRA, V. L. *Microbiologia: Manual de aulas práticas*. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004.

STATSOFT. *Statistica for Windows (Computer Program Manual)*. Tulsa: Statsoft, 2004. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em: 22 fev 2010.

STERFLINGER, K.; PRINLLINGER H. *Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment*. 2001. Viena. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11827213&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11827213&dopt=Abstract)> Acesso em: 20 abr.2010.

TIANO, Piero. *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. 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. *Microbiologia*. Tradução da 8.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment. a review. *Bioresource Technology*, v. 72, Issue 2, p.169-183, Apr. 2000. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09608524> >. Acesso em: 26 mai. 2008.

URZI, C.E.; CRISEO, G.; KRUMBEIN, W.E.; WOLLENZIEN, U.; GORBUSHINA, A.A. Are colour changes of rocks caused by climate, pollution, biological growth, or by interactions of the three. In: THIEL, M.-

J. (Ed.). Conservation of Stone and Other Materials, v. 1, p.279-286, London: E & FN Spon, 1993.

VALENTIN, J. L. Ecologia Numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. São Paulo: Interciência, 2000.

VALENTIN, N. Microbial Contamination and Insect Infestation in Spanish Museums, Archives and Libraries. Spain. Coalition, vol. 1, n. 3, p. 5-6, 2001.

VIDELA, H. A. Fungos biodeterioro de monumentos históricos de la zona maya. In: VIDELA, Hector A.; GIUDICE, Carlos A. (Org.). Jornadas Científico-Tecnológicas sobre Prevencion y Proteccion del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental: Memorias. Oaxaca: Buro Grafik S.R.L., 2001, v. 1, p.11-108.

VIOLLET-LE-DUC, Eugène Emmanuel. Dictionnaire raisonné de l'architecture française du Xie. au XVIe. siècle. Trad. Beatriz Mugayar Kühl. Cotia, São Paulo: Ateliê Editorial, 2008.

WHITE, J. T. T.; BRUNS, S. L. Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J. J.; BRANCO, T.J. (Ed.). IN PCR Protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990, p.315-322.

WOLLUM, II, A.G. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). Methods of Soil Analysis. Madison: Wiscosin, 1982, p.781- 802.

ZHOU, J. et al. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. App. Env. Microbiol, p.316. 322, feb. 1996.