



Alexandra José Rodrigues
Licentura em Conservação e Restauro

Biodeterioração de reproduções de vitrais por fungos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Conservação e Restauro, especialização em
Ciências da Conservação

Orientadora: Doutora Maria Filomena Macedo, Professora
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Doutora Márcia Vilarigues, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria João de Seixas Melo

Arguente: Prof. Doutor João Paulo Pereira de Freitas Coroado

Vogais: Prof. Doutora Maria Filomena Macedo Dinis e
Prof. Doutora Márcia Gomes Vilarigues



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro, 2012

Alexandra José Rodrigues
Licentura em Conservação e Restauro

Biodeterioração de reproduções de vitrais por fungos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Conservação e Restauro, especialização em
Ciências da Conservação

Orientadora: Doutora Maria Filomena Macedo, Professora
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Doutora Márcia Vilarigues, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Maria João de Seixas Melo

Arguente: Prof. Doutor João Paulo Pereira de Freitas Coroado

Vogais: Prof. Doutora Maria Filomena Macedo Dinis e
Prof. Doutora Márcia Gomes Vilarigues

Dezembro, 2012

BIODETERIORAÇÃO DE REPRODUÇÕES DE VITRAIS POR FUNGOS

Copyright © 2012

Alexandra José Rodrigues

Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa

Universidade Nova de Lisboa

Direitos de Cópia

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Copyright

Faculdade de Ciências e Tecnologia and Universidade Nova de Lisboa have the perpetual right with no geographical boundaries, to archive and publish this dissertation through printed copies reproduced on paper or digital form or by any other means known or to be invented, and to make it public through scientific repositories and allow its copy and distribution for educational purposes or research, not commercial, as long as credit is given to the author and editor.

AGRADECIMENTOS

Terminado este ano de trabalho, gostaria de agradecer a todos os que contribuíram para a conclusão do meu Mestrado em Conservação e Restauro. Destacam-se, em primeiro lugar e sem dúvida, a minha orientadora, Professora Doutora Filomena Macedo, e a minha co-orientadora, Professora Doutora Márcia Vilarigues, que, além da ajuda no desenvolvimento de toda a investigação, demonstraram sempre amizade, apoio, incentivo, confiança e disponibilidade.

Agradeço aos Parques de Sintra e Monte da Lua, pela possibilidade de estudar os belos vitrais da colecção de D. Fernando II, expostos actualmente na Sala dos Veados no Palácio Nacional da Pena.

Um especial agradecimento à unidade de investigação Vidro e Cerâmica para as Artes (VICARTE), pela sempre positiva interação entre artistas e investigadores, e em particular a ajuda do artista Robert Wiley, sem a qual não poderia ter reproduzido os vidros estudados.

Ao *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, (Sevilla, Espanha), pela realização das análises de biologia molecular.

À Micoteca do Minho, pelo pronto envio das espécies específicas e todos os cuidados prestados com os problemas de desenvolvimento das mesmas.

Ao Professor Rui Silva, pelo acompanhamento e disponibilização na utilização do Microscópio Óptico do CENIMAT.

Agradeço todo o tempo disponibilizado pela Daniela Gomes, bem como ao MicroLab (*Electron Microscopy Laboratory*) do Instituto Superior Técnico, pela realização das análises de SEM-EDS.

Aos doutorandos que incessantemente trabalham no Laboratório Científico do DCR e que prontamente ajudaram e responderam a qualquer dúvida, em particular à Vanessa Otero e ao Diogo Sanches, pela paciência em atender a todos os favores pedidos.

À Ana Maria, um obrigada imprescindível, por estar sempre presente e pela sua constante simpatia.

Gostava, ainda, de expressar agradecimentos aos meus professores e colegas do DCR e do Centro do Vidro pela amizade e bom ambiente de trabalho, com quem também sempre pude contar com grande apoio, incentivo e confiança. À Andreia Ruivo, à Sílvia Sequeira e à Mathilda Larsson, bem como a todos aqueles com quem a troca de ideias foi de grande importância para este estudo.

Um agradecimento especial à minha família, sobretudo aos meus pais e avós, que me apoiaram incondicionalmente ao longo destes de anos formação pessoal e profissional.

E, por fim, aos amigos, Cláudia Ferreira, Susana Coentro, Inês Coutinho, Joana Delgado, Tatiana Vitorino, Sara Canaveira, Ana Rita Araújo, Joana Devesa, Ana Raquel Ablum, Hélia Marçal, Andreia Nogueira, bem como a muitos outros que não esqueci, mas dificilmente os poderia aqui enumerar.

A todos, muito obrigada.

SUMÁRIO

Nas últimas décadas, vários estudos revelaram que os microrganismos são agentes de deterioração do vidro, sendo que os fungos se destacam com particular relevância. Os vitrais históricos possuem elementos modificadores como Ca, K e Na que os tornam particularmente vulneráveis a agressões ambientais (corrosão) e à corrosão induzida pelos microrganismos. Deste modo, realizou-se um estudo de biodeterioração acelerada através da inoculação de duas espécies de fungos seleccionadas de um caso de estudo (*Penicillium sp.* e *Cladosporium sp.*) efectuada sobre amostras de vidro de três variedades (cores), preparadas a partir do estudo da composição de dois vitrais. A alteração das superfícies foi estudada por μ -EDXRF, μ -Raman e μ -FTIR, microscopia óptica e SEM-EDS, tendo-se comparado dois estados iniciais de superfície: superfícies de vidro não corroídas e corroídas. As principais conclusões deste estudo são que: os organismos são capazes de produzir dano morfológico e químico após somente 2,5 meses de incubação em todas as superfícies, independentemente do seu estado inicial de corrosão, quando há condições de elevada humidade relativa e temperatura moderada. A biocorrosão ocorre de forma diferenciada em termos de taxa de e grau de ataque para os vidros das três cores. Verifica-se, ainda, que as amostras de controlo, sem meio de cultura (fonte de nutrientes) desenvolveram colonização biológica ao fim de 4,5 meses num ambiente previamente esterilizado.

Palavras-Chave

Vitrais, fungos, corrosão, biodeterioração.

ABSTRACT

Over the past decades, several studies revealed that microorganisms can act as biodeteriogens of glass surfaces. They also revealed that fungi play an important role in this matter. Since historic glasses and stained glasses are very rich in modifying elements, such as potassium and calcium, they are particularly vulnerable to environmental aggressions and also to microbial attack (microbially induced corrosion) that will promote glass biodeterioration. Thus, an accelerated biodeterioration study was carried out by the inoculation two fungal species selected from a case study (*Penicillium sp.* and *Cladosporium sp.*) on three glass types (colours and compositions), prepared from study of the composition of two stained glass windows. Glass surface alteration was studied by μ -EDXRF (X-ray florescence), μ -FTIR and μ -Raman spectroscopy, optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM-EDS). Two glass surface initial states (non corroded and corroded surfaces) were produced and compared over time. The main findings of this study are that the inoculated microorganisms are capable of producing morphological and chemical damage over all the surfaces after only 2.5 months of incubation, regardless of its initial state of corrosion, in high humidity and moderate temperature conditions (80-90% RH, $\approx 23^{\circ}\text{C}$). The biocorrosion of the three glass colours occurs with diferent rate and different degree of damage for each colour. We also found that the control samples without culture medium as nutrient source show biological colonization after 4.5 months in a sterilized environment.

Keywords

Stained glass, fungi, corrosion, biodeterioration.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

1. Introdução.....	1
1.1 Deterioração Física e Química.....	1
1.2 Deterioração Biológica.....	2
1.3 Objectivos.....	4
2. Caso de Estudo.....	5
2.1 O Vitral.....	5
2.1.1 Vitrais Estudados.....	6
3. Materiais e Métodos.....	7
3.1 Estudo da Composição de dois Vitrais da colecção de D. Fernando II.....	7
3.2 Preparação das Reproduções dos Vidros.....	7
3.3 Identificação e Selecção dos Fungos.....	7
3.4 Inoculação e Incubação dos Fungos sobre os Vidros Reproduzidos.....	8
3.5 Estudo do Efeito dos Fungos sobre os Vidros Reproduzidos.....	9
4. Resultados e Discussão.....	11
4.1 Composição de dois Vitrais da colecção de D. Fernando II.....	11
4.2 Reproduções dos Vidros no Estado Inicial.....	12
4.3 Efeito dos Fungos sobre os Vidros Reproduzidos.....	12
4.3.1 Alterações Morfológicas.....	12
4.3.2 Alteração Química Induzida pelos Fungos.....	19
4.3.3 Síntese dos Resultados.....	23
4.3.4 Desenvolvimento de Fungos sobre Superfície de Vidro Limpa.....	24
5 Conclusões.....	27
6 Conservação Preventiva.....	29
7 Perspectivas Futuras.....	31
8 Referências.....	33
Anexos	37
Anexo I	37
Fungos: Breve Introdução.....	38
Anexo II – A Colecção de D. Fernando II.....	41
Anexo III – Inoculação e Métodos de Exame e Análise.....	43
μ-EDXRF.....	44
MO.....	44
UV-Vis.....	45

μ-Raman.....	45
μ-FTIR.....	46
Anexo IV – Mapeamentos.....	47
Anexo V – Resultados.....	49
μ-EDXRF.....	49
UV-Vis.....	51
μ-Raman.....	53
μ-FTIR.....	60
SEM.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 3.1: Design analítico: sequência de análises a realizar ao longo da experiência laboratorial, de modo a acompanhar a evolução da corrosão e biodeterioração das superfícies de vidro.....	9
Fig. 4.1: Espectros de comparação das composições em óxidos (%m e desvio padrão à média dos pontos analisados), dos vidros de VA e VS.....	11
Fig. 4.2: Microfotografia digital obtida: (a) em condições de contraste de interferência (IC) e ampliação 1000× para superfícies de vidro incolor; (b) pela análise de SEM utilizando electrões retrodifundidos (BSE), que mostra a superfície corroída das amostras incolores em t_0 (5000×).....	12
Fig. 4.3: Microfotografias ópticas de ampliação 200× e 50× das superfícies de vidro incolor (setas brancas indicam cristais e setas pretas organismos e danos consequentes).....	14
Fig. 4.4: Microfotografias ópticas com ampliações de 500×, 200× e 100× das superfícies de vidro púrpura (setas brancas indicam cristais e setas pretas organismos e danos consequentes).....	15
Fig. 4.5: Imagens resultantes das análises de SEM das superfícies das amostras de vidro incolor nos tempos de incubação t_0 e $t_{2,5}$ obtidas com electrões secundários (SE) ou electrões retrodifundidos (BSE), como indicado, e cujas diferentes ampliações foram escolhidas de modo a salientar os pormenores mais relevantes.....	16
Fig. 4.6: Imagens resultantes das análises de SEM das superfícies das amostras de vidro púrpura nos tempos de incubação t_0 e $t_{2,5}$ obtidas com electrões secundários (SE) ou electrões retrodifundidos (BSE), como indicado, e cujas diferentes ampliações foram escolhidas de modo a salientar os pormenores mais relevantes.....	17
Fig. 4.7: Imagens resultantes das análises de SEM das superfícies das amostras de vidro castanho nos tempos de incubação t_0 e $t_{2,5}$ obtidas com electrões secundários (SE) ou electrões retrodifundidos (BSE), como indicado, e cujas diferentes ampliações foram escolhidas de modo a salientar os pormenores mais relevantes.....	18
Fig. 4.8: Espectros obtidos da série de análises realizada às superfícies das amostras de coloração incolor (esquerda) e castanha (direita) inicialmente não corroídas (i.n.c.) e corroídas (i.c.), de t_0 a t_6 , por espectroscopia FTIR, e respectivos ajustes lorentzianos para os picos correspondentes às vibrações das ligações Si–O–Si (ca. 1010) e Si–O ⁻ (ca. 910).....	21
Fig. 4.9: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro incolor em $t_{2,5}$ e a uma depressão claramente empobrecida em Ca e Na, e com menor empobrecimento em K.....	22
Fig. 4.10: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em $t_{2,5}$ e a uma depressão claramente empobrecida em Ca e K.....	23
Fig. 4.11: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em $t_{4,5}$ e a uma depressão claramente empobrecida em Ca e Na.....	23
Fig. I.1: Desenho esquemático da aparência de uma hifa – filamento com ramificações	38
Fig. I.2: Desenho esquemático da evolução de um esporo para um micélio.....	38
Fig. I.3: Esquematização dos conídios (à esquerda) e micélio do género <i>Cladosporium</i>	39
Fig. I.4: Esquematização dos conídios (à esquerda) e textura das colónias (à direita) (a) lanosa e (b) funiculosa) do género <i>Penicillium</i>	39

Fig. II.1: Vitral que representa St. Agostinho ou St. Ambrósio, com associação a S. Lucas pelo atributo (o boi), ca. séc. XV, Alemanha.....	41
Fig. II.2: Vitral brasonado, com três níveis de representação, encerrada em espaço arquitectónico, cerca do séc. XVII, Suíça.....	41
Fig. III.1: Design experimental da incubação: separação e disposição das várias amostras nas respectivas caixas de Petri – exemplo para dois dos quatro casos.....	43
Fig. III.2: Design experimental da inoculação.....	44
Fig. III.3: Espectro μ -Raman exemplificativo dos realizados às amostras de vidro das 3 diferentes cores (neste caso, vidro de coloração castanha), respectivos ajustes e atribuição de componentes Qn e Qn' que foram separadas em picos individuais.	45
Fig. IV.1: Mapeamento de todos os pontos relativos às análises de μ -EDXRF realizadas ao VS – considerados os pontos realizados sobre o vidro, sendo que as restantes colorações são obtidas com pintura a grisalha, amarelo de prata e esmaltes.....	47
Fig. IV.2: Mapeamento das zonas onde foram recolhidas amostras biológicas localizadas sobre o vitral – assinaladas a vermelho – nos fragmentos do VS.....	47
Fig. IV.3: Mapeamento de todos os de análise de μ -EDXRF realizados ao conjunto VA (direita) e pequenos painéis individuais (esquerda) (pontos n correspondem ao reverso e n' corresponde ao anverso do painel).....	48
Fig. IV.4: Mapeamento das zonas onde foram recolhidas amostras biológicas localizadas sobre o vitral – assinaladas a vermelho – nos fragmentos do VA e painéis mais pequenos associados.....	48
Fig. V.1: Composição média (%m) dos óxidos constituintes dos vidros dos painéis de vitral em estudo.....	49
Fig. V.2: Espectros de UV-Vis das amostras de diferentes colorações: (a) vidro púrpura, (b) vidro castanho, (c) vidro incolor.....	51
Fig. V.3: Microfotografia digital obtida em condições de contraste de interferência (IC) e ampliação 1000 $\times$ para superfícies de: (a) vidro púrpura (b) vidro castanho	51
Fig. V.4: Microfotografias ópticas de ampliação 200 $\times$ das superfícies de vidro castanho (setas brancas indicam cristais e setas pretas organismos e danos consequentes).....	52
Fig. V.5: Espectros obtidos para as superfícies das amostras incolores (de t_0 a t_6), por μ -Raman.....	53
Fig. V.6: Espectros obtidos das análises de μ -Raman realizadas às superfícies das amostras púrpura.....	54
Fig. V.7: Espectros obtidos das análises de μ -Raman realizadas às superfícies das amostras castanhas.....	55
Fig. V.8: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{2,5}$, sobre cristais na superfície de vidro incolor e purpura inicialmente não corroída e corroída inoculadas, como ilustrado no exemplo para o caso de vidro incolor.....	56
Fig. V.9: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{4,5}$, sobre cristais na superfície de vidro incolor inicialmente não corroída (i.n.c.) inoculada, como ilustrado.....	56
Fig. V.10: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{4,5}$, sobre cristais na superfície de vidro incolor inicialmente corroída (i.c.) não inoculada e inoculada, como se ilustra no exemplo para o primeiro caso.....	56

Fig. V.11: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{4,5}$, sobre superfície de vidro castanho inicialmente corroída não inoculada, onde se identificam picos potencialmente correspondentes a cristais na superfície, como ilustrado.	57
Fig. V.12: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{4,5}$, sobre cristais em vidro castanho inicialmente não corroído (i.n.c.) não inoculado, como ilustrado. Foi também obtido para vidro incolor e púrpura inicialmente não corroído não inoculado e púrpura corroído não inoculado.....	57
Fig. V.13: Espectro obtido por μ -Raman após t_6 , sobre formações cristalinas em vidro incolor inicialmente corroído (i.c.) não inoculado, como ilustrado.....	57
Fig. V.14: Espectro obtido por μ -Raman após t_6 , sobre formações cristalinas em vidro incolor inicialmente não corroído (i.n.c.) e inoculado, como ilustrado, e no púrpura não corroído inoculado.....	58
Fig. V.15: Espectro obtido por μ -Raman após t_6 , sobre formações cristalinas em vidro incolor e púrpura inicialmente não corroído (i.n.c.) não inoculado, como ilustrado para o primeiro caso.....	58
Fig. V.16: Espectro obtido por μ -Raman após t_6 , sobre vidro púrpura inicialmente corroído (i.c.) inoculado, como ilustrado.....	58
Fig. V.17: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{4,5}$, sobre cristais na superfície de vidro castanho inicialmente corroída (i.c.) e não inoculada, como ilustrado.	59
Fig. V.18: Espectro obtido por μ Raman após t_6 , sobre uma das superfícies de vidro castanho, inicialmente corroída (i.c.) e inoculada, como ilustrado, onde se observa uma película superficial.....	59
Fig. V.19: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies incolores inicialmente não corroídas (i.n.c.).....	61
Fig. V.20: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies incolores inicialmente corroídas (i.c.).....	61
Fig. V.21: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies castanhas inicialmente não corroídas (i.n.c.).....	62
Fig. V.22: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies castanhas inicialmente corroídas (i.c.).....	62
Fig. V.23: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em t_0 e a um dos aglomerados ricos em Ca sobre o mesmo.....	63
Fig. V.24: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro incolor em $t_{2,5}$ e a dois dos aglomerados ricos em Ca sobre o mesmo.....	63
Fig. V.25: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realiza-das ao vidro incolor em $t_{2,5}$ e a dois dos aglomerados ricos em Ca e a um outro enriquecido em Na, sobre o mesmo.....	63
Fig. V.26: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realiza-das ao vidro púrpura em $t_{2,5}$ não corroído e não inoculado, a dois dos aglome-rados ricos em Ca encontrados.....	64
Fig. V.27: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realiza-das ao vidro púrpura em $t_{2,5}$ inicialmente corroído e não inoculado que apresenta, como ilustrado, zonas enriquecidas em Ca.....	64
Fig. V.28: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realiza-das ao vidro púrpura em $t_{2,5}$ inicialmente corroído e inoculado que apresenta, como ilustrado, estruturas enriquecidas em Na e Al..	64
Fig. V.29: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em $t_{2,5}$ inicialmente corroído e inoculado, a dois dos aglomerados ricos em Ca encontrados.....	65
Fig. V.30: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em $t_{2,5}$ inicialmente corroído e inoculado, a dois dos aglomerados ricos em Na e Cl encontrados.....	65

Fig. V.31: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em $t_{2,5}$ inicialmente não corroído e não inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.....	65
Fig. V.32: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em $t_{2,5}$ inicialmente corroído e não inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.....	66
Fig. V.33: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em $t_{2,5}$ inicialmente não corroído e inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.....	66
Fig. V.34: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro incolor em $t_{4,5}$ inicialmente corroído (i.c.) e inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.....	66
Fig. V.35: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em $t_{4,5}$ inicialmente não corroído (i.n.c.) e inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.....	67
Fig. V.36: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t_6 a uma zona de alteração com clara variação das intensidades relativas de elementos como Si, Ca, K, Na e P.....	67
Fig. V.37: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t_6 a uma zona de alteração com clara variação das intensidades relativas de elementos como Si, Ca, K e Na.....	67
Fig. V.38: Gráficos de variação da concentração elementar do vidro incolor em função da profundidade ($t_0-t_{2,5}$).....	68
Fig. V.39: Gráficos de variação da concentração elementar do vidro púrpura em função da profundidade ($t_0-t_{2,5}$).....	69
Fig. V.40: Gráficos de variação da concentração elementar do vidro castanho em função da profundidade ($t_0-t_{2,5}$).....	70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Mecanismos e Consequências da Biodeterioração do Vidro por Fungos.....	3
Tabela 3.1 – Afiliação filogenética dos fungos encontrados na superfície dos Vitrais A e S.....	8
Tabela 3.2 – Componentes Qn e Qn' em que se decompõem A ₅₀₀ e A ₁₀₀₀ num espectro Raman de vidro	10
Tabela 4.1 – Índices de Polimerização correspondentes às amostras de vidro das três tipologias (incolor, púrpura e castanho), obtidos nas várias etapas de desenvolvimento dos organismos (desvio padrão <0,2).....	19
Tabela 4.2 – Compostos detectados e identificados sobre as superfícies de vidro, analisados por μ -Raman.....	20
Tabela 4.3 – Sumário dos danos observados. Os danos estão classificados de forma semi-quantitativa numa escala de 0 a 10 (desde inexistente a muito pronunciado, considerando parâmetros como densidade, quantidade e dimensões)	24
Tabela I.1 – Fungos identificados em vidro histórico e noutros materiais inorgânicos.....	37
Tabela V.1 – Composição em %m (e respectivos desvios padrão à média de pontos analisados) dos óxidos dos vidros dos painéis de Vitral Alemão e Suíço.....	50
Tabela V.2 – Composição média (%m) dos óxidos constituintes dos vidros reproduzidos e respectivo desvio padrão à media dos pontos analisados.....	50
Tabela V.3 – Centros aproximados dos componentes Qn de cada amostra incolor estudada (posições em números de onda em cm ⁻¹ , admitindo um erro de ± 3 cm ⁻¹ em todos os casos não indicados)	53
Tabela V.4 – Centros aproximados dos componentes Qn de cada amostra castanha estudada (posições em números de onda em cm ⁻¹ , admitindo um erro de ± 3 cm ⁻¹ em todos os casos não indicados a cinzento).....	54
Tabela V.5 – Centros aproximados dos componentes Qn de cada amostra púrpura estudada (posições em números de onda em cm ⁻¹ , admitindo um erro de ± 3 cm ⁻¹ em todos os casos não indicados a cinzento).....	55
Tabela V.6 – Centros aproximados dos componentes vibracionais ν Si–O–Si e ν Si–O ⁻ e correspondentes áreas dos picos, obtidos por ajustes lorentzianos.....	60
Tabela V.7 – Razão entre as áreas dos picos, auxiliar à avaliação da variação das intensidades relativas.....	60

1 INTRODUÇÃO

O vidro de sílica é um material inorgânico que tem vindo a ser considerado quase inerte, ou quimicamente muito resistente. A sílica (SiO_2) é a principal matéria-prima do vidro natural e histórico, sendo responsável pela durabilidade e resistência que lhe são atribuídas, e determinando os seus comportamentos físico e químico. O vidro de sílica tem grande dureza, elevada resistência a ácidos e ao choque térmico e uma temperatura de fusão muito elevada (1725 °C). Todavia, na produção do vidro são adicionados outros compostos, entre eles modificadores e estabilizadores de rede (em particular óxidos de iões alcalinos e alcalino-terrosos), que permitem a diminuição da temperatura de fusão assim como da temperatura de trabalho do vidro. Estes compostos alteram as propriedades do vidro, entre elas a sua estabilidade química [1,2,3]. Apesar da aparente estabilidade, o vidro encontra-se invariavelmente sujeito à interacção com o ambiente e com a comunidade biológica que o envolve, estando, por consequência, sujeito a deterioração [4].

A grande diversidade de microrganismos vive em comunidade. Estas comunidades podem participar na degradação – por vezes, pela sua mera presença física –, podendo levar à destruição do material [5]. São, essencialmente, efeitos de corrosão induzida (processo de corrosão desencadeado ou catalisado pelos microrganismos) os que mais afectam o património de vidro, como se tem vindo a verificar [6]. Para compreender os fenómenos de biodeterioração provocados pelos mesmos, deve realizar-se uma revisão das vias de deterioração do vidro.

1.1 Deterioração Física e Química

A deterioração física, que resulta de fenómenos de expansão e/ou retracção, tensões internas, acção humana, ou tensões e pressões exercidas externamente, dá-se devido a forças mecânicas, podendo resultar em fissuras, fracturas, desgaste superficial, entre outros [7].

No que respeita à deterioração por via química, ou corrosão do vidro, conhece-se actualmente que este ocorre, essencialmente, na presença de água. O contacto da água com a superfície do vidro desencadeia a lixiviação dos iões alcalinos e alcalino-terrosos da matriz vítrea, através de um conjunto de reacções de troca iónica com os iões H^+ e/ou H_3O^+ (resultantes da auto-dissociação da molécula de H_2O). Desta lixiviação resulta a formação de uma camada rica em sílica, porosa e hidratada (pela entrada de moléculas de água). A camada de sílica-gel assim formada é já uma camada de corrosão que, com o tempo, tenderá a propagar-se para o interior, respondendo mecanicamente de forma diferente da matriz vítrea e estando susceptível a maiores danos, quando exposta a modificações bruscas de humidade relativa (HR). O contacto dos iões alcalinos e alcalino-terrosos com os aniões dissolvidos na água, pode dar origem à formação de cristais na superfície do vidro – as características crostas de corrosão. Por outro lado, se a solução em contacto com o vidro não for renovada, a tendência será para que haja subida de pH à superfície – aumento da concentração de iões alcalinos OH^- na água – e para que se dê a quebra de ligações silício-oxigénio a partir de um pH crítico ($\text{pH} \approx 9$) [8,9].

1.2 Deterioração Biológica

De um modo geral, a acção microbiana na corrosão do vidro histórico foi, até às últimas décadas do século XX, um processo subestimado e, consequentemente, pouco estudado. Anteriormente, sabia-se que a deterioração de vidro exposto a condições ambientais não controladas (como é o caso de vitrais *in situ*) derivava de processos físico-químicos. Ao longo do último século, vários estudos contribuíram para se compreender que o fenómeno de biodeterioração efectivamente ocorre e que se traduz essencialmente na participação activa de microrganismos na corrosão do vidro, através de processos biofísicos e bioquímicos [3,10].

Os factores determinantes para o estabelecimento dos microrganismos sobre o substrato de vidro foram estudados por vários autores [e.g. 11,12,13]:

- factores ambientais, tais como HR, temperatura, flutuações de HR e temperatura e tempo durante o qual a superfície do vidro se encontra húmida;
- factores antropogénicos, tais como a concentração e tipo de nutrientes carbónicos devido, por exemplo, a camadas orgânicas protectoras e poluentes;
- propriedades do vidro e comportamento de corrosão: intrínsecas (composição e durabilidade química do vidro, rugosidade e produtos de corrosão) e extrínsecas (actividade da água na superfície¹ [11], capacidade de mobilização dos minerais e iões metálicos do vidro essenciais ao crescimento dos microrganismos);
- depósitos orgânicos, como por exemplo, depósitos de poeiras, resíduos mortais de fungos, bactérias ou outros organismos, ou devido aos resíduos dos seus produtos metabólicos;

De acordo com os factores enumerados, na literatura considera-se que a existência de uma camada de sílica-gel influencia a bioreceptividade do vidro, tornando-o mais acessível ao ataque de microrganismos, em particular, à adesão e penetração de células em crescimento, sendo responsável pela retenção da humidade na superfície [13]. Schabereiter-Gurtner *et al.* refere que a actividade biológica sobre o vidro ocorre devido a uma conjugação favorável dos factores acima referidos e que apenas uma comunidade complexa, que inclua diferentes espécies de líquenes, algas, fungos e/ou bactérias, seja passível de sobreviver sobre um substrato inorgânico pouco favorável ao crescimento biológico [12].

Os efeitos que têm vindo a ser observados relativamente aos danos causados por microrganismos sobre superfícies inorgânicas como minerais e vidro são essencialmente os seguintes [14]:

- os microrganismos formam biofilmes, alterando assim a difusão, o comportamento químico e a condutividade da superfície do vidro, no que respeita à sua interacção com o ambiente (parâmetros físicos, como o pH, o potencial redox e o ataque mecânico);
- os microrganismos oxidam, reduzem ou agem, selectivamente, como agentes quelantes sobre uma série de elementos químicos, dos quais preferem: o fósforo (P), o potássio (K), o ferro (Fe), o manganês (Mn), o cálcio (Ca) e alguns metais pesados.

1 A actividade da água é uma medida relativa à água disponível na superfície de determinado material para desenvolvimento de microrganismos.

Deste modo, verifica-se que a colonização microbiana modifica e, geralmente, acelera os processos físico-químicos já decorrentes, através de reacções de catálise [13].

De entre os vários tipos de microrganismos acima referidos como parte de comunidades colonizadoras, focaremos doravante os fungos em particular, visto que, de acordo com a literatura, estes parecem ser o grupo dominante na deterioração de vidros e vitrais medievais, surgindo em grande escala em biofilmes já estudados [e.g. 3,12,15,16]. Os diversos fungos que até à actualidade foram encontrados em vitrais encontram-se sumariados em anexo, Tabela I.1. A biocorrosão de vidros históricos, ligada a filmes de fungos, ocorre com taxas de ataque extraordinárias, que levam a que, apesar de num curto período de tempo as consequências não serem visíveis, os danos provocados serem irreversíveis [14,15,17]. Segundo as experiências realizadas nos últimos anos, estes microrganismos provocam, para além de danos químicos e alterações acima referidas, danos físicos devido à sua estrutura e à instalação do seu micélio (Anexo I). Por conseguinte, os mecanismos de acção determinados pelo seu crescimento celular são bioquímicos e biofísicos [14] (cf. Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Mecanismos e Consequências da Biodeterioração do Vidro por Fungos.		
Dano	Mecanismo	Tipo de Dano
Alterações Crómicas	Bioquímico	<u>Perda de Transparência</u> : alteração das propriedades ópticas do vidro pela oxidação de alguns dos seus constituintes metálicos [10].
	Biofísico	<u>Pátina Biológica</u> : primeira consequência evidente do crescimento do micélio dos fungos sobre a superfície de vidro: acumulação destas estruturas altamente ramificadas, diminuindo a transmissão de luz. No caso de existir uma fonte de carbono, o desenvolvimento do micélio ocorre e, ao incorporar humidade, iões e poluentes, pode tornar-se corado [14,15].
Biocorrosão	Bioquímico	<u>Lixiviação e bioetching</u> : a presença do biofilme contribui para o aumento da camada de sílica-gel, participando ainda na remoção de alguns iões do vidro [13], e as hifas presentes no biofilme excretam substâncias metabólicas extracelulares e ácidos (principalmente ácidos acético, cítrico, glucónico, oxálico, entre alguns outros), que, como noutros casos de organismos químo-organotróficos, podem diminuir o valor do pH da superfície até 2-4 [13,19], que podem atacar quimicamente o substrato, juntamente com a humidade presente na superfície [15].
	Bioquímico e Biofísico	<u>Biopicamento</u> : como consequência do fenómeno anteriormente descrito, bem como através da penetração das referidas hifas, há a formação de pequenos sulcos sobre a superfície [13,19].
	Bioquímico (A) e Biofísico (B)	<u>Formação de crostas ou depósitos de biominerais</u> : ocorre através de: A) mobilização e lixiviação de elementos pelos microrganismos e conjunto de reacções químicas com os ácidos produzidos pelos mesmos, formando-se minerais característicos como a <i>weddellite</i> , <i>apatite</i> , <i>singenite</i> , <i>gesso</i> e <i>calcite</i> , entre outros [13,20,19]; B) Se, por via química ou bioquímica já tiver ocorrido deterioração, o micélio pode remover partículas hidratadas de sílica e incorporá-las em crostas complexas, de uma forma puramente física [14,15].
Alterações Estruturais	Bioquímico (1) e Biofísico (2,3)	<u>Redes de microfissuras ou microfracturas</u> : estas podem ser causadas por: 1. dissolução química do vidro (neste caso particular, catalisada) [6,14,18], 2. pela penetração das hifas dos microrganismos no mesmo [3], 3. ou pela deposição de minerais biogénicos em fissuras ou pequenas fracturas pré-existent, proporcionando-se a sua expansão ou agravamento, por via física, dado o elevado volume dos cristais [14,15].

Em resumo, verifica-se que os processos de deterioração pela água, gases e por via biológica podem ocorrer simultaneamente ou em sequência [21], podendo causar severos danos. Estes danos, por sua vez, podem ser agrupados em três tipos principais – Tabela 1.1, para o caso particular dos fungos.

Diversos autores têm vindo a estudar os diferentes processos e efeitos dos microrganismos sobre o substrato de vidro, nomeadamente nas áreas da saúde e alimentação [e.g. 22], armazenamento de resíduos tóxicos [e.g. 14], instrumentos ópticos [e.g. 14, 23, 24], bem como existem também alguns estudos sobre a biodeterioração do património cultural [e.g. 3, 10, 11, 12]. Alguns autores referem, inclusive, que os vidro de janela e os vitrais medievais são alguns dos maiores testemunhos em vidro da passagem dos séculos, constituindo bons casos de estudo e uma oportunidade excepcional do estudo da durabilidade do material face ao ambiente [3,25].

1.3 Objectivos

De acordo com o contexto anteriormente apresentado, os principais objectivos deste trabalho são:

1. Levantamento do estado actual do conhecimento relativo ao tipo de microrganismos colonizadores das superfícies vítreas e seus mecanismos de acção;
2. Estudo da composição dos vitrais dos séculos XV e XVII da colecção de D. Fernando II;
3. Identificação dos principais fungos que colonizam os vitrais mencionados no ponto anterior (antes da limpeza dos vitrais).
4. Realização de reproduções de três tipos de vidro com três diferentes cores, utilizando a composição dos vitrais analisada no ponto 2, produzindo-se superfícies não corroídas e corroídas, simulando vidro «novo» e vidro alterado, respectivamente;
5. Estudo da biodeterioração das reproduções de vidros através da inoculação dos fungos seleccionados no ponto 3.

2.1 O Vitral

O vitral é uma arte antiga. Os mais antigos foram encontrados no Ocidente (Inglaterra), datando de ca. 686 d.C.. As suas origens são incertas, dado que o vidro colorido soprado era usado desde os Romanos, em janelas, pelo menos desde o século V. Adquire a sua expressão máxima na Idade Média respondendo aos requisitos da Igreja Católica. Predomina, naturalmente, a temática religiosa, constituindo o elo entre o edifício e a luz do céu, entre o terreno e o divino. A evolução das formas arquitectónicas permitiu a criação de grandiosas paredes de luz colorida. Durante aquele período e o do Renascimento, foi considerado objecto de valor, intimamente ligado à estética das pedras e metais preciosos, recebendo lugar de honra no edifício que o incorporava [9,26].

“Do ponto de vista estrutural, um vitral é um conjunto de vidros – incolores, corados na massa ou coloridos por sobreposição de camadas de vidro durante o processo de fabrico, pintados ou não, montados em calhas de chumbo cujos pontos de união são soldados (...).”

Pedro Redol [27]

Para a realização de um vitral, a ideia começava por ser materializada na tábua do vitralista (prancha de madeira, posteriormente substituída por cartão), delineando-se limites, linhas de corte e elementos do posterior trabalho de pintura. O vidro era cortado em fragmentos segundo as formas e cores indicadas na tábua e, por fim, aplicavam-se os detalhes pintados, por excelência, a grisalha [9,27].

O vidro antigo tratava-se essencialmente de vidro sódico, fabricado com cinzas de plantas marinhas ou com um mineral denominado natrão, importado do Egipto. A partir do declínio do império Romano e com a interrupção das rotas comerciais, a dificuldade de aceder à matéria-prima promoveu a evolução técnica da produção de vidro no Norte da Europa, no séc. X, e o vidro sódico é substituído pelo potássico, produzido com cinzas de madeira de faia, matéria-prima mais disponível [28]. Assim, os vidros utilizados na produção do vitral na Idade Média eram, em geral, vidros potássicos, produzidos à base das referidas cinzas e de areia. Infelizmente, no âmbito da conservação, este último tipo de vidro sofre uma degradação mais rápida por corrosão, quando comparado com o vidro sódico, sendo mais susceptível à corrosão atmosférica por reacção com o vapor de água e, posteriormente, outros gases, resultando na sua menor durabilidade [9,27]

O vidro era fabricado por processo de sopro, em que o vidreiro colhia a matéria fundida com a ponta da sua cana e soprava a mesma em bola, que poderia ser tornada plana ao ser transferida para o pontel em rotação, fabricando-se um disco, ou a partir do alongamento da bola em cilindro que posteriormente sofria um corte longitudinal e nas extremidades, abrindo-se com o calor até se obter a chapa. No final, o vidro era recozido para aliviar tensões. O vidro produzido poderia ser transparente, ou colorido pela adição de óxidos metálicos (óxidos de Co, Fe, Cu, Mn). O vidro era depois cortado e pintado de acordo com o projecto, montado numa estrutura de calhas de chumbo e, finalmente, o vitral era instalado na janela. [1, 9,27].

2.1.1 Vitrais Estudados

D. Fernando II, Rei Consorte de Portugal (1837-1853), ocupou a ala conventual do Palácio das Necessidades, em Lisboa, após a morte da rainha D. Maria II, sua esposa. Tendo recolhido inúmeras obras de arte, juntou então, em três janelas da Casa de Jantar, uma colecção de vitrais de produção da Europa Central – Suíça, Alemanha e Holanda –, recolhidos de igrejas, mosteiros, *ateliers* de artistas ou mansões de aristocratas. Durante a República, o conjunto de vitrais foi transferido para as reservas do Palácio da Ajuda, onde permaneceu até 1949, data em que é transferido novamente, desta vez, para a localização onde permaneceu até aos dias de hoje, no Palácio Nacional da Pena, num ambiente de elevada humidade relativa (HR) e com temperaturas moderadas – HR médias da ordem de 80% e temperaturas entre os 18-25°C [29,30,31] (cf. Anexo II).

Para este estudo, seleccionaram-se dois vitrais representativos de subconjuntos. O primeiro caso de estudo pensa-se que possa representar St. Agostinho ou St. Ambrósio, com associação a S. Lucas pelo seu atributo (o boi), a quem aparece uma Virgem com o Menino (Fig. II.6, Anexo Anexo II). Trata-se, aparentemente, de uma produção do século XV, de origem alemã (pelo que, doravante, será denominado Vitral A ou VA). O segundo painel seleccionado trata-se de um vitral brasonado de origem suíça, datado do século XVII (pelo que, doravante será Vitral S ou VS) (Fig. II.5, Anexo II).

Os critérios de selecção destes vitrais foram: (i) representatividade, no que respeita à proveniência dos painéis da colecção; (ii) possibilidade de deslocação para estudo da sua composição; (iii) características iconográficas que nos permitem deduzir que se tratem de painéis representativos de centros de produção comum a outros da mesma colecção.

3.1 Estudo da Composição de dois Vitrais da colecção de D. Fernando II

A composição do vidro, esmaltes e de outros componentes dos dois vitrais foi determinada por μ -EDXRF (Micro Fluorescência de Raios X Dispersiva de Energia) – cf. Anexo III. Este é um método não destrutivo que nos permite o acesso a informação sobre a composição elementar. Os pontos de aquisição encontram-se assinalados no mapeamento em Anexo (Anexo IV). Realizaram-se análises semelhantes a padrões cujas composições são conhecidas [32] para uma análise quantitativa.

3.2 Preparação das Reproduções dos Vidros

A realização das reproduções de vidros teve por base a composição dos vitrais estudados, em particular de três das colorações presentes: vidros incolor, de coloração púrpura e de coloração castanha. Para a síntese, utilizaram-se composições aproximadas das da Tabela V.1, utilizando matérias-primas puras (reagentes de laboratório, cf. Anexo III; valores apresentados na Tabela V.2, Anexo V), sendo que cada vidro foi fundido num cadinho de cerâmica refractária a 1300 °C durante 24h. O vidro obtido foi soprado em disco (*fire polished*), recozidos a 500° C (patamar de 4h), seguindo-se um arrefecimento lento (~20h), e depois cada um dos discos foi cortado em polígonos de dimensões aproximadas de (10x10x2)mm³, utilizando uma ponta de diamante. Estudou-se a composição, após síntese, por μ -EDXRF, do mesmo modo que descrito anteriormente.

Metade de um total de 24 amostras de cada cor foi colocada em água, para aceleração do processo de corrosão, durante cerca de 4-6 meses, até se observar uma superfície corroída. As restantes foram guardadas em ambiente não húmido.

Foram realizadas análises para o estudo preliminar das superfícies dos vidros (veja-se a secção 3.5).

3.3 Identificação e Selecção dos Fungos

Para a recolha das amostras biológicas, foi utilizada uma zaragatoa humedecida em água destilada esterilizada, o que foi repetido em diferentes fragmentos dos vitrais (observem-se as Figs.IV.2 e IV.4, no Anexo IV). Esta amostragem foi efectuada, antes da limpeza dos vitrais, realizada na campanha de restauro realizada entre 2010 e 2011, esfregando/passando a zaragatoa na totalidade da superfície de cada fragmento do vitral. As amostras foram então colocadas a -80°C até à data da realização das análises de biologia molecular.

Os principais fungos presentes no vitral foram identificados (Tabela 3.1). Das espécies encontradas, foram seleccionadas dois géneros (*Cladosporium* e *Penicillium* – espécies assinaladas) para inocular sobre os vidros modelo, seguindo os seguintes critérios:

- aquelas que evidenciaram a sua presença em mais do que uma área dos fragmentos dos vitrais analisados;

- géneros de estirpes que foram também encontradas em outros vidros ou vitrais (Tabela I.1),
- disponibilidade das espécies (tendo sido encontradas e isoladas de culturas recolhidas nos azulejos vidrados do mesmo ambiente – Palácio da Pena).

Tabela 3.1 – Afiliação filogenética dos fungos encontrados na superfície dos Vitrais A e S.

Fungos	Nº de Acesso	Similaridade (%)	VA	VS
<i>Alternaria tenuissima</i>	HM210840.1	99		x
<i>Ascomycete sp./</i>				
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AM410610.1/FJ490621.1	100	x	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	GU017501.1	100	x	
<i>Cladosporium sp.</i>	AJ971409.1	99		x
<i>Chaetomium cristatum</i>	GU183110.1	100	x	
<i>Didymellaphacae/Dothiorellagaria/Phoma macrostoma</i>	EU167570.1/EU520054.1	99/98/98		x
<i>Penicillium brevicompactum</i>	AY373897.1/HM210834.1	99/100	xx	
<i>Penicillium citreonigrum</i>	EF198646.1/EF198647.1	99	xx	x
<i>Penicillium corylophilum</i>	AF033450.1	100	x	x
<i>Penicillium roseopurpureum</i>	GU566239.1	99	x	
<i>Sistotrema sp. 178</i>	GU062211	99		x

As análises de biologia molecular foram efectuadas em colaboração com o Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IRNAS-CSIC) (Espanha).

3.4 Inoculação e Incubação dos Fungos sobre os Vidros Reproduzidos

Antes de realizar a inoculação, cada conjunto de 18 vidros de cada cor (9 superfícies corroídas e 9 não corroídas) foi colocado no interior de uma caixa de Petri (de vidro), com água destilada no fundo e uma rede que evita o contacto directo da água com as amostras. As 3 diferentes cores foram separadas em caixas Petri diferentes. As 18 amostras de diferentes cores (9+9), foram ainda separadas em conjuntos de 3 (para fins estatísticos), dispostos na mesma caixa. As amostras de controlo (6 superfícies não inoculadas) foram separadas por cores e por superfície inicialmente não corroída e inicialmente corroída, formando igualmente grupos de 3. As amostras e respectivas caixas de Petri, bem como a água destilada, foram levadas à autoclave a 121 °C, para esterilização. Este modo de incubação para crescimento dos fungos sobre as amostras foi concebido de forma a manter o ambiente mais estéril possível e garantir a humidade necessária aos microrganismos estudados.

Para a inoculação, colocaram-se ambas as espécies de fungos seleccionados, lado a lado, sobre todas as 18 amostras de cada cor. No final, as caixas de Petri foram ainda colocadas dentro de caixas de vidro acrílico com água no fundo. Garantiu-se um ambiente húmido no exterior de cerca de 75-80% HR, sendo a temperatura controlada a cerca de 22-23°C, de modo realizar um estudo de biocorrosão acelerada. Além disso, os fungos foram colocados com um pouco de PDA (meio de cultura orgânico) de forma a simular material orgânico que se encontrava sobre os vitrais antes da limpeza (poeiras, bactérias, material orgânico particulado).

Para uma melhor compreensão do *design* experimental, veja-se a Fig. III.1 para a incubação e Fig. III.2 para a inoculação, no Anexo III.

3.5 Estudo do Efeito dos Fungos sobre os Vidros Reproduzidos

O estudo foi realizado com base em técnicas analíticas (descritas no Anexo III) que permitem avaliar alterações físicas e químicas. Seguiu-se o *design* analítico definido (Fig. 3.1). As amostras foram analisadas sucessivamente, pretendendo-se avaliar diferentes fases de crescimento dos organismos, considerando-se os seguintes tempos de incubação:

- t_0 → estado inicial: superfícies inicialmente não corroída e corroída;
- $t_{2,5}$ → amostras após um período de 2,5 meses de incubação;
- $t_{4,5}$ → amostras após um período de 4,5 meses de incubação;
- t_6 → amostras após um período de 6 meses de incubação.

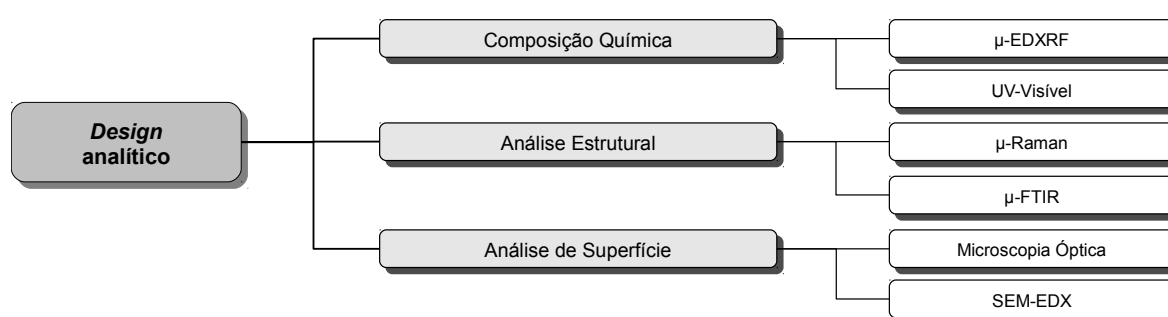


Fig. 3.1: *Design* analítico: sequência de análises a realizar ao longo da experiência laboratorial, de modo a acompanhar a evolução da corrosão e biodeterioração das superfícies de vidro.

O estudo das superfícies dos vidros foi realizado através de microscopia óptica (MO), espectrometria de absorção óptica no UV-Vis (ultra violeta-visível próximo), micro Espectrometria Raman (μ -Raman) e micro Espectrometria de Infra-Vermelhos por Transformada de Fourier (μ -FTIR) e microscopia electrónica de varrimento com detecção de raios X (SEM-EDS) de modo a avaliar os efeitos provocados pelos fungos.

As análises de MO foram realizadas às superfícies de controlo e às superfícies com organismos (após remoção do excesso de meio de cultura) bem como após o processo de limpeza suave por via húmida².

A espectroscopia UV-Vis, realizada em t_0 , permite a determinação do estado de oxidação e geometria coordenação dos iões metálicos adicionados (geralmente, catiões de metais de transição responsáveis pela cor do vidro, com orbitais d não totalmente preenchidas e se coordenam com aniões na rede). Tal associação permite, por sua vez, a identificação desse ião à sua função na rede vítrea [9].

Nos casos das análises de μ -Raman (realizadas antes da limpeza) e μ -FTIR (após limpeza), a informação obtida é relativa à estrutura e de natureza local, sendo que o estudo destas gamas

² – Semelhante ao utilizado na limpeza de painéis de vitral em conservação e restauro que consiste na utilização de cotonete impregnado numa solução de água:etanol 1:1

espectrais complementares permite a identificação dos grupos funcionais das amostras [9,33], acompanhar a alteração química das superfícies e a identificação de produtos de corrosão eventualmente formados. Os espectros obtidos para os vidros inorgânicos são compostos por diversos picos que geralmente se sobrepõem em bandas, pelo que foi realizada a separação em picos individuais com ajustes matemáticos, por forma a poder ser extraída informação relativa às alterações estruturais. Os parâmetros de posição, largura e intensidade características de cada um dos picos, fornecem, regra geral, informação sobre a estrutura do vidro.

Os espectros de μ -Raman do vidro traduzem a estrutura da rede tridimensional e covalente de tetraedros SiO_4 , que retém um forte carácter polimérico e cuja assinatura vibracional é bem definida, estando presente a informação sobre a estrutura e a composição das fases vítreas [34,35,36]. Neste tipo de espectros (*cf.* Fig. III.3) encontram-se geralmente duas regiões espectrais: A_{500} (pico mais intenso a ca. 500 cm^{-1}), que corresponde à vibração de flexão da ligação Si–O (Q^n), e A_{1000} (ca. 1000 cm^{-1}), correspondente à distensão da ligação Si–O (Q^n) [35]. A nomenclatura atribuída associa-se aos componentes da estrutura da rede (Tabela 3.2), decomponíveis com ajustes gaussianos, considerando a desordem estrutural do material [33,34,35], como foi feito. O parâmetro *índice de polimerização* é dado pela razão entre as duas áreas sob as regiões de flexão e distensão, ou seja: $I_p = (A_{500}/A_{1000})$, fornecendo informação sobre a alteração das suas intensidades relativas, afectada pela alteração da estrutura e composição química (como pela adição ou remoção de modificadores de rede) [34].

Tabela 3.2 – Componentes Q^n e Q^n em que se decompõem A_{500} e A_{1000} num espectro Raman de vidro [34].

Nome	Oxigénios em ponte	Estrutura	Banda Q^n	Banda Q^n
Q^0/Q^0	zero (tetraedro isolado)	SiO_4 isolado	ca. $800\text{-}850 \text{ cm}^{-1}$	ca. 260 cm^{-1}
Q^1/Q^1	um (tetraedro ligado)	Si_2O_7	ca. 900 cm^{-1}	ca. 300 cm^{-1}
Q^2/Q^2	dois (tetraedro ligado)	cadeias de Si	ca. $1050\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$	ca. 470 cm^{-1}
Q^3/Q^3	três (tetraedro ligado)	em folha	ca. 1100 cm^{-1}	ca. 500 cm^{-1}
Q^4/Q^4	quatro (sílica pura)	SiO_2 , tectossilicato	ca. $1150\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$	ca. 570 cm^{-1}

No caso dos espectros de μ -FTIR, a análise à região superficial em modo ATR (*cf.* Anexo III) permite obter informação de teor semelhante, sendo que nestes espectros de sílica vítrea ou quartzo se destacam duas bandas características, uma associada à distensão do grupo Si–O–Si (ca. 1100 cm^{-1}) e outra à presença de grupos Si–O $^-$ (ca. $900\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$) [9,37].

O recurso à técnica de SEM-EDS permite a análise da superfície e das secções transversais ao nível morfológico e obter informação relativamente à alteração da composição elementar.

4.1 Composição de dois Vitrais da colecção de D. Fernando II

A composição média dos painéis de vitral em estudo encontra-se no Anexo V, nas Fig. V.1 e Tabela V.1. A Fig. V.4 resume as razões entre os principais óxidos constituintes dos vidros analisados.

Todos os vidros analisados são do tipo alcalino-misto ou rico em cálcio. Numa discussão sumária, o gráfico da Fig. V.4 (a) sugere que a fonte de sílica e alumina (areia) é a mesma para todos os vidros do VA e diferente para o VS, tal como esperado, sendo estes de épocas e centros de produção diferentes. A partir dos gráficos das Fig. V.4 (b) e (c), é ainda possível assumir que no caso do VA dois tipos de composições foram utilizados. O conteúdo superior de K_2O num dos grupos, relativamente ao outro, pode estar associado a diferentes receitas ou a matérias-primas de diferentes origens, usadas para a mesma receita (como diferentes partes do tronco da árvore da qual as cinzas são fonte de fundentes) [38]. No caso do VS verificamos que se trata de um vidro de produção diferente, sendo o conteúdo de sódio muito superior. A concentração de P_2O_5 próxima de 2% (percentagem em massa) nestes vidros, aponta para a utilização de cinzas não purificadas [39].

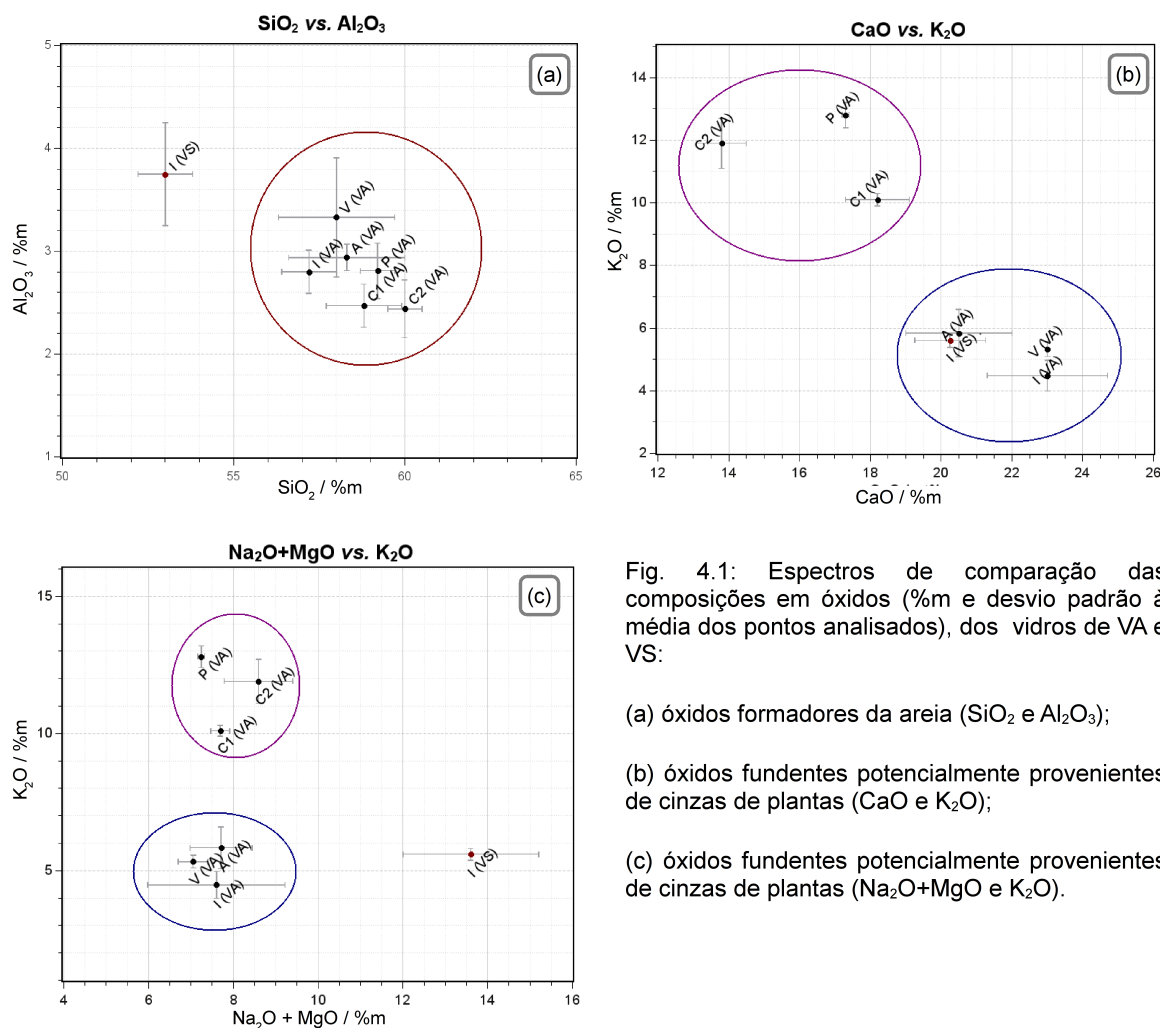


Fig. 4.1: Espectros de comparação das composições em óxidos (%m e desvio padrão à média dos pontos analisados), dos vidros de VA e VS:

- (a) óxidos formadores da areia (SiO_2 e Al_2O_3);
- (b) óxidos fundentes potencialmente provenientes de cinzas de plantas (CaO e K_2O);
- (c) óxidos fundentes potencialmente provenientes de cinzas de plantas (Na_2O+MgO e K_2O).

4.2 Reproduções dos Vidros no Estado Inicial

Os vidros produzidos foram analisados semi-quantitativamente por μ -EDXRF (composição na Tabela V.2, onde se observa o acréscimo de elementos vestigiais, que poderão derivar das reacções químicas decorrentes às altas temperaturas do forno com os componentes da cerâmica refractária do cadinho). Considerando o erro (desvio padrão), a composição superficial das amostras varia entre não corroídas e corroídas.

A Espectrometria UV-Vis, cujos espectros se apresentam em Anexo (Anexo V), evidencia os iões responsáveis pela coloração dos vidros produzidos: o Fe^{3+} para o caso do vidro castanho e, menos claramente, o seu efeito no vidro incolor – como se observa pelas três bandas de fraca intensidade assinaladas –, e o ião Mn^{3+} no caso do vidro púrpura – banda característica a ca. 500 nm [1].

Comparando as superfícies inicialmente não corroída e inicialmente corroída, observa-se, para qualquer das três cores, que as primeiras se matêm lisas e sem estruturas relevantes (esquerda, Fig. 4.2 (a)), enquanto que as segundas efectivamente apresentam corrosão (direita, Fig. 4.2 (a)): alteração da morfologia por desenvolvimento de microfissuras e aglomerados, que, pelas análises de SEM-EDS, revelaram ser ricos em Ca (preferencialmente no vidro púrpura – Anexo V, Fig. V.8 –, o que já havia sido observado por outros autores [9]). A análise da estratigrafia realizada por SEM (Fig. 4.2 (b)) revelou, ainda, a existência de uma camada em destacamento, considerada uma camada de sílica-gel, de acordo a literatura [9].

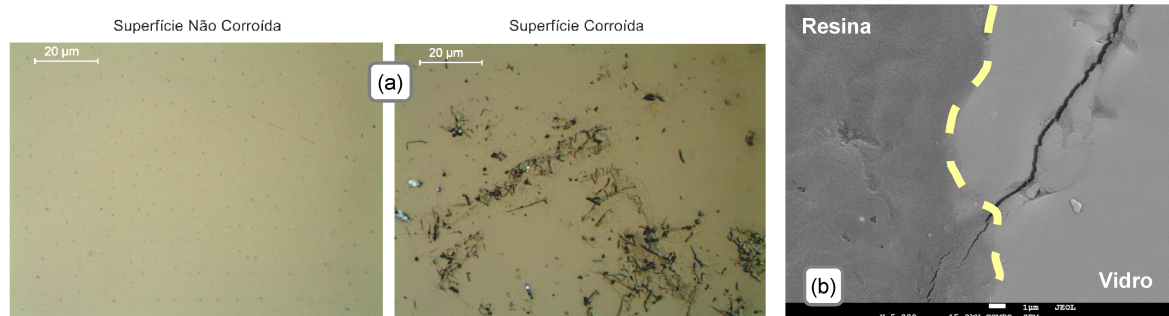


Fig. 4.2: Microfotografia digital obtida: (a) em condições de contraste de interferência (IC) e ampliação 1000 $\times$ para superfícies de vidro incolor; (b) pela análise de SEM utilizando electrões retrodifundidos (BSE), que mostra a superfície corroída das amostras incolores em t_0 (5000 $\times$).

4.3 Efeito dos Fungos sobre os Vidros Reproduzidos

O crescimento biológico dos fungos foi avaliado por fases, como anteriormente referido, subdividindo-se o processo em diferentes tempos de incubação. O tipo de alterações das superfícies foi estudado de acordo com os pontos seguintes.

4.3.1 Alterações Morfológicas

A avaliação do efeito provocado pelos fungos estudados é, em primeira instância, a do possível dano estético e morfológico associado à formação de um biofilme. Deste modo, realizaram-se observações à vista desarmada e de microscopia óptica às superfícies de todas as amostras, bem como análises de microscopia electrónica (SEM), para observação de danos a escalas microscópicas.

Nas observações à vista desarmada das amostras de controlo e inoculadas, feitas após a limpeza, não se observaram alterações significativas da cor, rugosidade e morfologia. Exceptuam-se alguns casos em t_6 , onde já se observam alguns cristais na superfície.

Microscopia Óptica

Os resultados obtidos por microscopia óptica (MO) permitiram observar a evolução do crescimento dos organismos, desde t_0 até t_6 . Nas Fig. 4.3 e 4.4 apresentam-se os vidros incolor e púrpura, que evidenciam alterações mais distintas. O caso do vidro castanho encontra-se no Anexo V (Fig. V.4).

Amostras de Vidro Incolor

Os resultados de MO para o vidro incolor encontram-se na Fig. 4.3.

Nas amostras incolores inoculadas observa-se que o micélio se desenvolve e se torna cada vez mais denso ao longo do tempo (t_0 a t_6). Observa-se, ainda, que existe uma elevada formação de estruturas cristalinas para estes casos. Comparando com as amostras de controlo, há uma clara diferença no grau de deterioração (e biodeterioração).

Em todos os casos, após a limpeza os microrganismos foram quase totalmente removidos, permanecendo apenas alguns vestígios (discutido na secção 5).

Ao contrário do esperado, ocorre a presença de colonização biológica sobre as amostras de controlo em $t_{4,5}$ e t_6 (Fig. 4.3.3 e 4.3.4 (a) e (b)).

Amostras de Vidro Púrpura

Os resultados de MO para o vidro púrpura encontram-se na Fig. 4.4.

Nas amostras púrpura inoculadas observa-se que o micélio se desenvolve e se torna pouco mais denso, ao longo do tempo (t_0 a t_6). Quanto à formação de estruturas cristalinas, esta ocorre esporadicamente em $t_{2,5}$, mas não aumenta nos tempos de incubação seguintes. Comparando com as amostras de controlo, uma vez mais é clara a diferença no grau de deterioração, principalmente no que respeita à alteração óptica das superfícies.

Tal como para o vidro incolor, em todos os casos a limpeza das superfícies púrpura permitiu remover quase totalmente os fungos, mas permaneceram alguns vestígios (discutido na secção 5).

Como ocorreu no vidro incolor, sobre as amostras de controlo púrpura, em $t_{4,5}$ e t_6 (Fig. 4.4.3 e 4.4.4 (a) e (b)), observa-se colonização biológica e formação de algumas estruturas cristalinas.

Amostras de Vidro Castanho

Os resultados de MO para o vidro castanho encontram-se na Fig. V.4.

Nas amostras de vidro castanho inoculadas observa-se que o micélio se desenvolve e para pouco mais denso ao longo do tempo (t_0 a t_6). Quanto à formação de estruturas cristalinas, esta é visível em $t_{2,5}$ após a limpeza, mas não aumenta visivelmente nos tempos de incubação seguintes. Comparando com as amostras de controlo, existe clara alteração óptica das superfícies (marcas e manchas deixadas pelos organismos) e uma clara diferença no grau de deterioração de ambas as superfícies.

Tal como sobre o vidro incolor e púrpura, permaneceram alguns vestígios após a limpeza (secção 5).

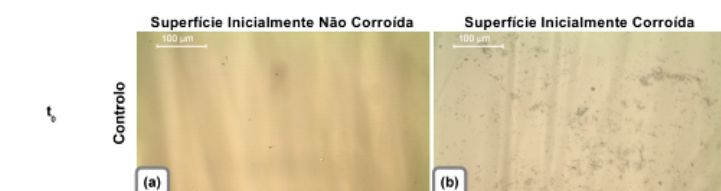


Fig. 4.3.1: Estado inicial t_0 .

Observa-se:

→ que a amostra (b) apresenta rede de microfissuras

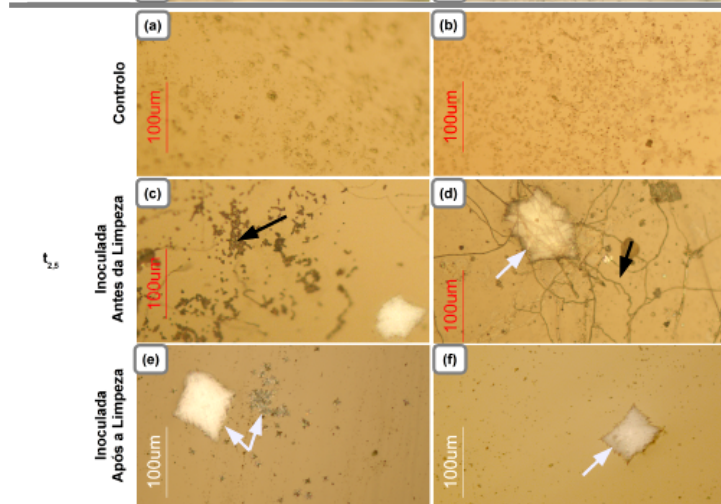


Fig. 4.3.2: Tempo de incubação $t_{2.5}$.

Observa-se:

→ superfícies de controlo (a) e (b) mais deterioradas;

→ desenvolvimento de hifas até às extremidades e cristais, sobre as duas superfícies inoculadas (c) e (d) (antes da limpeza);

→ marcas deixadas pelos fungos sobre as superfícies (e) e (f) e cristais (após a limpeza).

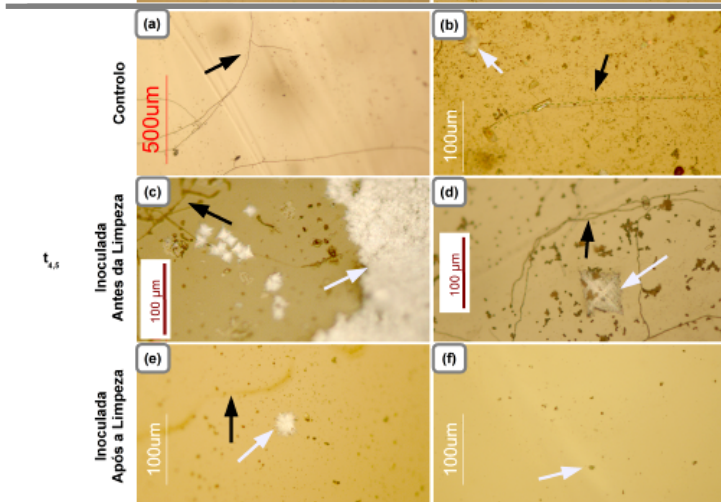


Fig. 4.3.3: Tempo de incubação $t_{4.5}$.

Observa-se:

→ superfícies de controlo (a) e (b) mais deterioradas, evidenciando colonização biológica;

→ micélio desenvolvido sobre as duas superfícies inoculadas (c) e (d), bem como maior número de cristais (antes da limpeza);

→ marcas deixadas pelos fungos sobre as superfícies (e) e (f) e outros cristais que anteriormente estariam cobertos pelos fungos (após a limpeza).

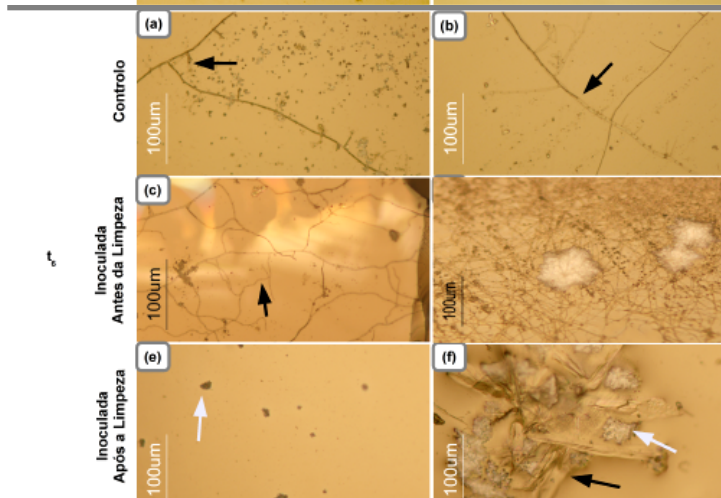


Fig. 4.3.4: Tempo de incubação t_6 .

Observa-se:

→ superfícies de controlo (a) e (b) mais deterioradas, evidenciando colonização biológica e cristais;

→ micélio desenvolvido mais denso e estruturas ou marcas sobre as superfícies inoculadas (c) e (d) (antes da limpeza);

→ marcas deixadas pelos fungos sobre as superfícies (e) e (f) e cristais, principalmente nas superfícies inicialmente corroída (após a limpeza).

Fig. 4.3: Microfotografias ópticas de ampliação 200× e 50× das superfícies de vidro incolor (setas brancas indicam cristais e setas pretas organismos e danos consequentes).

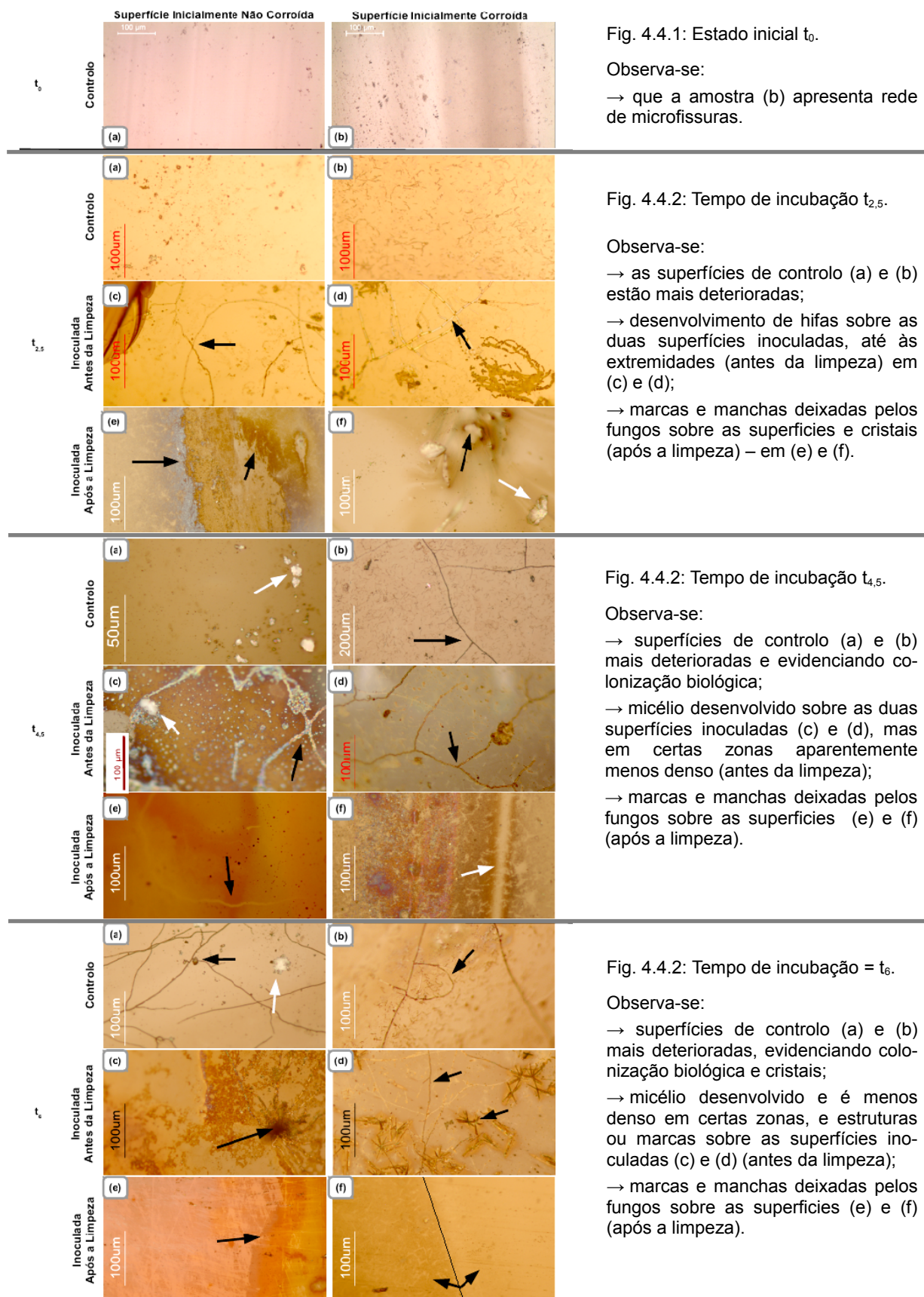


Fig. 4.4.1: Estado inicial t_0 .

Observa-se:

→ que a amostra (b) apresenta rede de microfissuras.

Fig. 4.4.2: Tempo de incubação $t_{2.5}$.

Observa-se:

→ as superfícies de controlo (a) e (b) estão mais deterioradas;

→ desenvolvimento de hifas sobre as duas superfícies inoculadas, até às extremidades (antes da limpeza) em (c) e (d);

→ marcas e manchas deixadas pelos fungos sobre as superfícies e cristais (após a limpeza) – em (e) e (f).

Fig. 4.4.2: Tempo de incubação $t_{4.5}$.

Observa-se:

→ superfícies de controlo (a) e (b) mais deterioradas e evidenciando colonização biológica;

→ micélio desenvolvido sobre as duas superfícies inoculadas (c) e (d), mas em certas zonas aparentemente menos denso (antes da limpeza);

→ marcas e manchas deixadas pelos fungos sobre as superfícies (e) e (f) (após a limpeza).

Fig. 4.4.2: Tempo de incubação = t_6 .

Observa-se:

→ superfícies de controlo (a) e (b) mais deterioradas, evidenciando colonização biológica e cristais;

→ micélio desenvolvido e é menos denso em certas zonas, e estruturas ou marcas sobre as superfícies inoculadas (c) e (d) (antes da limpeza);

→ marcas e manchas deixadas pelos fungos sobre as superfícies (e) e (f) (após a limpeza).

Fig. 4.4: Microfotografias ópticas com ampliações de 500×, 200× e 100× das superfícies de vidro púrpura (setas brancas indicam cristais e setas pretas organismos e danos consequentes).

Também neste caso (em $t_{4,5}$ e t_6) ocorreu colonização biológica sobre as amostras de controlo e formação de estruturas cristalinas de dimensões consideráveis (cerca de 30 μm).

SEM

Os resultados mais representativos das observações por SEM encontram-se nas Figs. 4.5 a 4.7.

Superfícies de Vidro Incolor

Como ilustrado na Fig. 4.5, existe evolução das superfícies do vidro incolor ao longo do tempo.

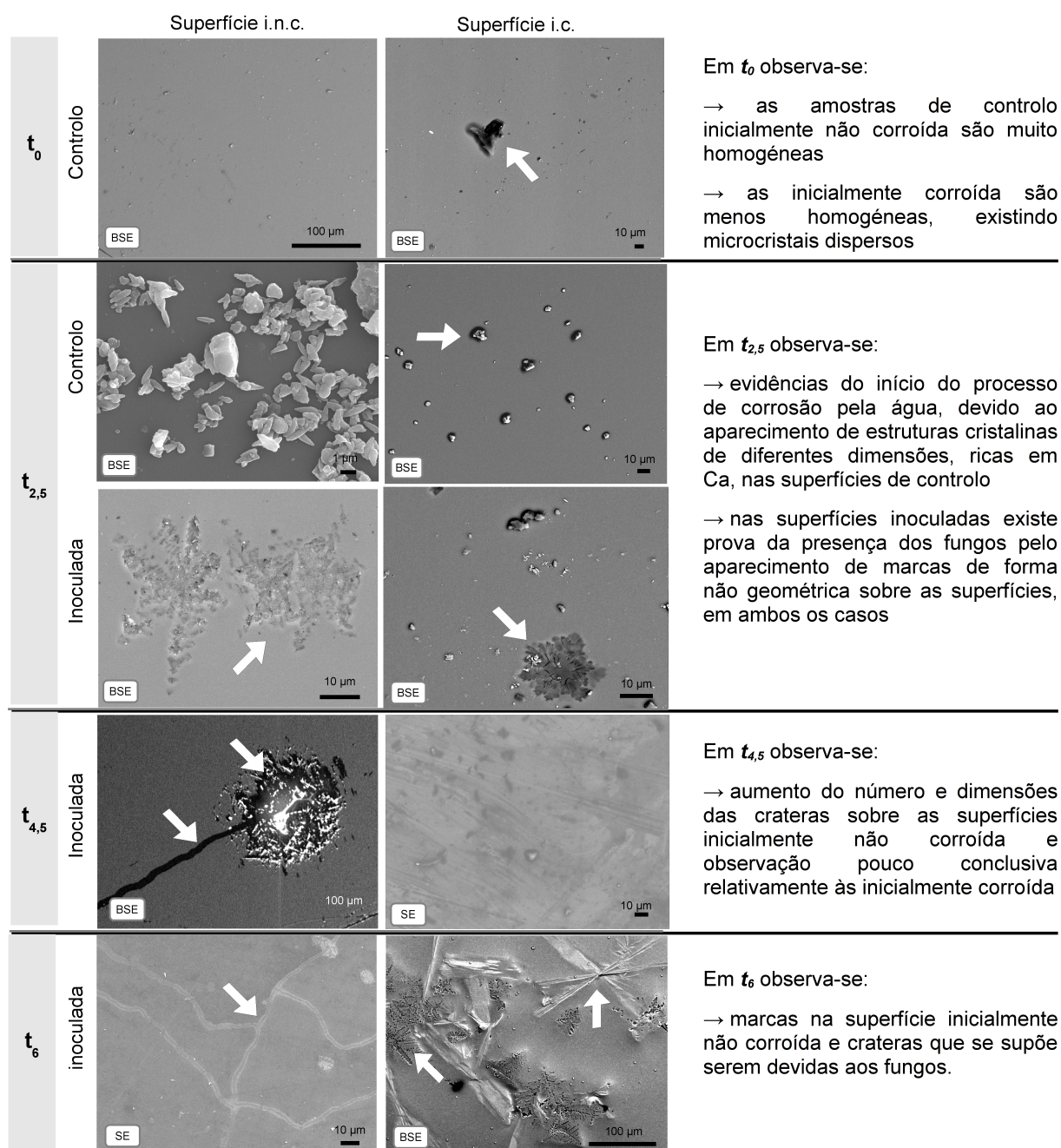


Fig. 4.5: Imagens resultantes das análises de SEM das superfícies das amostras de vidro incolor nos tempos de incubação t_0 e $t_{2,5}$ obtidas com electrões secundários (SE) ou electrões retrodifundidos (BSE), como indicado, e cujas diferentes ampliações foram escolhidas de modo a salientar os pormenores mais relevantes.

Salientam-se os sinais de alteração morfológica das superfícies não corroídas inoculadas: em $t_{2,5}$, $t_{4,5}$ e t_6 , observam-se crateras com depleção de alguns elementos (cf. espectro de SEM-EDS na secção 4.3.2) e, em t_6 , marcas da anterior presença de hifas. Nas superfícies corroídas inoculadas, parece haver evolução das crateras observadas em $t_{2,5}$, para t_6 (porém, os dados de $t_{4,5}$ são inconclusivos).

Superfícies de Vidro Púrpura

Como se pode observar na Fig. 4.6, o vidro púrpura evolui ao longo do tempo de incubação.

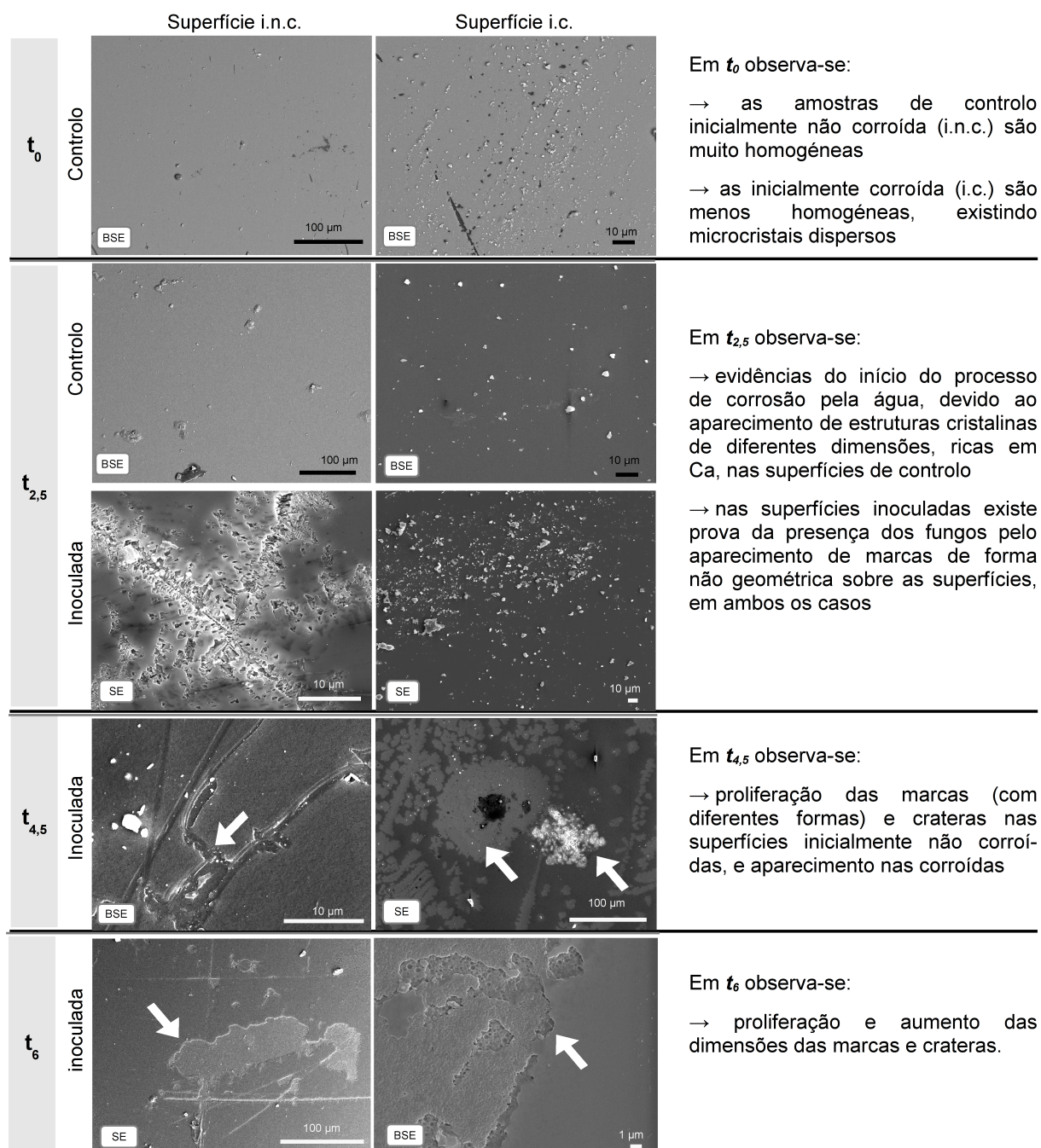


Fig. 4.6: Imagens resultantes das análises de SEM das superfícies das amostras de vidro púrpura nos tempos de incubação t_0 e $t_{2,5}$ obtidas com electrões secundários (SE) ou electrões retrodifundidos (BSE), como indicado, e cujas diferentes ampliações foram escolhidas de modo a salientar os pormenores mais relevantes.

Neste caso, ressaltam os sinais de alteração morfológica nas superfícies púrpura inicialmente não corroídas logo ao fim de $t_{2,5}$, enquanto que o mesmo não se observa para as inicialmente corroídas. No entanto, ao fim de $t_{4,5}$ e t_6 ambas as superfícies estão marcadas e apresentam crateras com depleção de elementos (veja-se a secção 4.3.2) devido à presença dos organismos.

Superfícies de Vidro Castanho

Como ilustrado na Fig. 4.7, existe alguma evolução do estado das superfícies do vidro castanho.

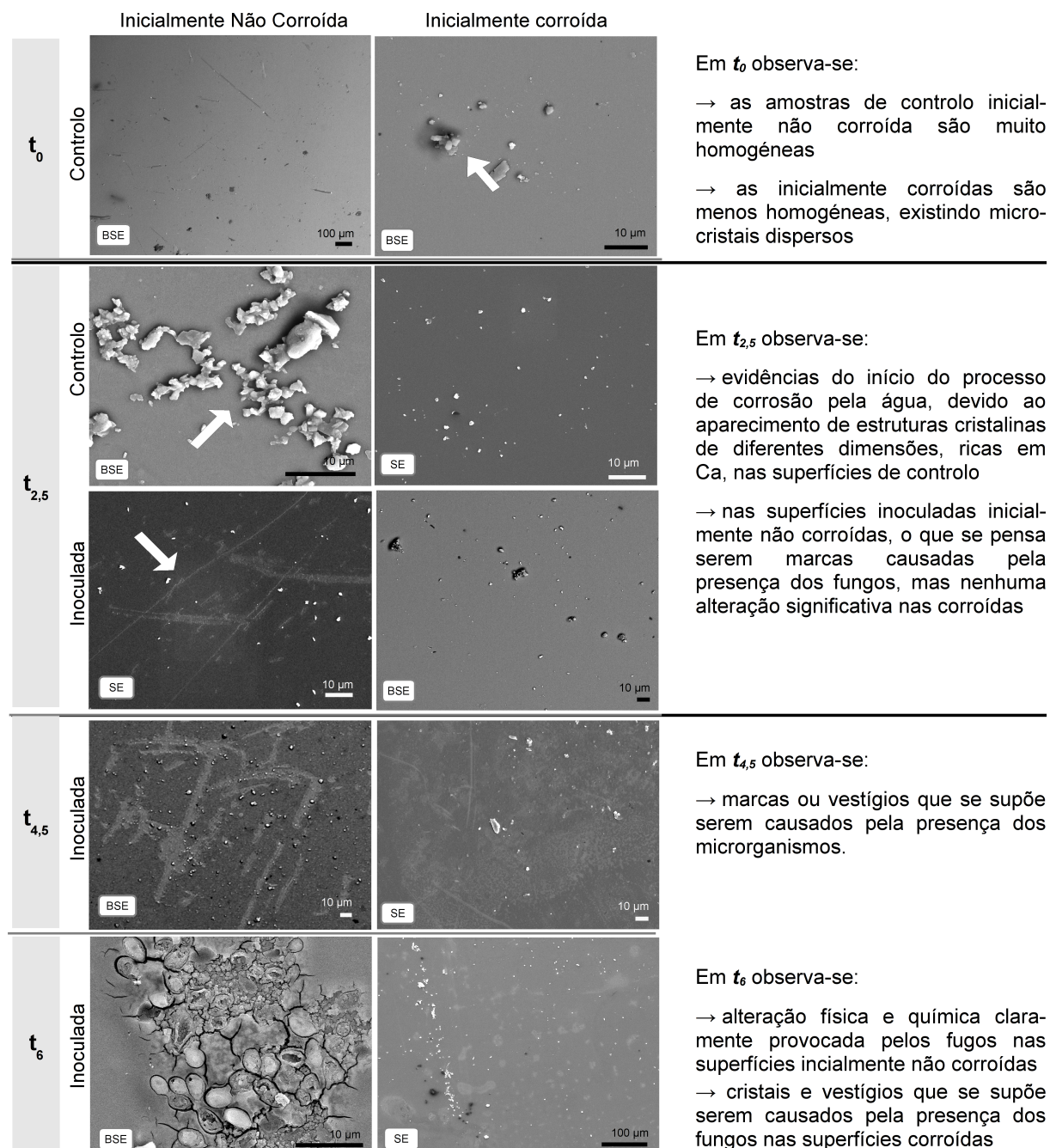


Fig. 4.7: Imagens resultantes das análises de SEM das superfícies das amostras de vidro castanho nos tempos de incubação t_0 e $t_{2,5}$ obtidas com electrões secundários (SE) ou electrões retrodifundidos (BSE), como indicado, e cujas diferentes ampliações foram escolhidas de modo a salientar os pormenores mais relevantes.

No caso do vidro castanho, ressaltam o que se pensa serem sinais de alteração morfológica ou vestígios (produtos metabólicos ou substâncias afins) nas amostras inicialmente não corroídas em $t_{2,5}$, que aumentam em $t_{4,5}$. Nas inicialmente corroídas estes sinais só aparecem ao fim de $t_{4,5}$. Nas superfícies inicialmente não corroídas, em t_6 , existe já clara evidência do ataque físico e químico provocado pelos fungos (dadas as formas circulares e fendas ramificadas).

Ao confrontar os resultados, verifica-se que os fungos se encontram a provocar dano ao nível morfológico, em escalas microscópicas e em forma de corrosão incongruente (ou localizada) [13], na maioria das amostras. As observações sugerem que são primeiramente atacadas (ou de forma mais predominante) as superfícies inicialmente não corroída. Comparando as várias cores, amostras de vidro púrpura parecem ser as mais susceptíveis. As superfícies do vidro castanho apresentam menor alteração e não apresentam crateras (nem depleção de elementos, veja-se a secção 4.3.2), embora os dados relativos a t_6 (não disponíveis até à data) possam fornecer novas informações.

As análises realizadas às secções transversais até $t_{2,5}$ revelam que não existe penetração das hifas.

4.3.2 Alteração Química Induzida pelos Fungos

Como referido, as análises de espectroscopia e o SEM permitem a análise da eventual alteração química das superfícies, acompanhada ao longo do decorrer desta experiência.

μ -Raman

Os resultados mais representativos da caracterização das superfícies dos três vidros por μ -Raman apresentam-se nas Fig. Fig. V.5 a Fig. V.7, em Anexo, conjuntamente com a respectiva síntese (Tabelas V.3 a V.5, Anexo V) dos valores dos centros dos modos vibracionais, extraídos através de ajustes com curvas gaussianas. Serão considerados para a discussão seguinte, os valores do modo de flexão (cf. Anexo V). As áreas das bandas foram usadas para o cálculo do índice de polimerização (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Índices de Polimerização correspondentes às amostras de vidro das três tipologias (incolor, púrpura e castanho), obtidos nas várias etapas de desenvolvimento dos organismos (desvio padrão <0,2).

$I_p = \frac{A_{500}}{A_{1000}}$		Amostras t_0		Amostras $t_{2,5}$		Amostras $t_{4,5}$		Amostras t_6	
		n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.
Incolor	controlo	1,3	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
	inoculada	–	–	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
Púrpura	controlo	1,5	1,6	2,0	1,8	1,9	1,7	1,6	1,7
	inoculada	–	–	1,7	1,9	1,6	1,7	1,6	1,6
Castaño	controlo	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5
	inoculada	–	–	1,7	1,7	1,6	1,5	1,6	1,6

n.c. → amostras inicialmente não corroídas; c. → amostras inicialmente corroídas

Para o vidro incolor observa-se uma fraca evidência de alteração na estrutura molecular. Não existindo variação significativa no pico mais intenso $Q^{4'}$ a ca. 600 cm^{-1} , existe, porém, um pequeno desvio dos picos Q^3 e Q^0 para números de onda mais baixos (Tabela V.3 e Fig. V.5). No que respeita às superfícies do vidro púrpura também não se observa qualquer variação significativa no pico $Q^{4'}$,

mas, aparentemente, há um pequeno desvio para números de onda inferiores do pico que na amostra não corroída em t_0 se situa a cerca de 681 cm^{-1} (Tabela V.4 e Fig. V.6). Quanto às amostras de vidro castanho, há também um pequeno desvio para números de onda mais baixos de $Q^{1'}$, de $Q^{2'}$ e do pico que se situava a cerca de 683 cm^{-1} em t_0 não corroído, além do desvio do pico mais intenso $Q^{4'}$ (Tabela V.5 e Fig. V.7). Contudo, em qualquer dos três casos esta variação parece ser idêntica para amostras inoculadas com organismos e amostras de controlo, independentemente do estado inicial de corrosão, não ficando demonstrada a influência da presença dos fungos. Ocorre algo semelhante com os valores dos índices de polimerização (apresentados na Tabela 4.1) cujas variações esporádicas e incongruentes não permitem retirar conclusões sobre o efeito dos microrganismos.

Não obstante os resultados anteriores serem inconclusivos, identificaram-se por μ -Raman alguns dos cristais observados por microscopia óptica e SEM. Estes ocorrem preferencialmente sobre superfícies inoculadas, nos vidros incolor e púrpura. Os cristais identificados encontram-se brevemente sumariados na Tabela 4.2 (os espectros correspondentes são apresentados no Anexo V).

Maioritariamente, observa-se a formação de carbonato de cálcio uma consequência comum da corrosão do vidro por contacto com água [9]. Porém, nalgumas superfícies foram identificados alguns sulfatos (gesso, sulfato de sódio hidratado e glauberite ($\text{Na}_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2$)) e, ainda, alguns silicatos (CaSiO_3 , $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$, SiO_2), os quais podem ser indício da presença de ácidos produzidos pelos organismos (referido em 1.2) e dos complexos mecanismos envolvidos na biocorrosão [13]. Ao fim de $t_{4,5}$, as amostras não inoculadas apresentam compostos distintos dos das inoculadas. Conjugando estes dados com as observações realizadas por MO, há a sugestão de que os microrganismos pioneiros, detectados sobre as primeiras, possam ter alguma influência na formação destas estruturas cristalinas.

Tabela 4.2 – Compostos detectados e identificados sobre as superfícies de vidro, analisados por μ -Raman.

		Amostras t_0		Amostras $t_{2,5}$		Amostras $t_{4,5}$		Amostras t_6	
		n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.
Inc.	contr.	–	–	–	–	CaCO_3	$\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$	CaCO_3	–
	inoc.	–	–	CaCO_3	CaCO_3	$\text{NaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$	$\text{NaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{CaSiO}_3 + n.i.$
Púrp.	contr.	–	–	–	–	CaCO_3	–	CaCO_3	–
	inoc.	–	–	CaCO_3	CaCO_3	–	–	–	$\text{NaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Cast.	contr.	–	–	–	–	CaCO_3	$\text{CaCO}_3 + n.i. + \text{Na}_2\text{Ca}(\text{SO}_4)_2$	–	$\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ (?)
	inoc.	–	–	–	–	–	–	–	$\text{SiO}_2 + n.i.$

n.i. → detectado, mas não identificado; contr → controlo; inoc → inoculadas; n.c. → não corroídas; c. → corroídas

μ -FTIR

Apresentam-se na Fig. 4.8 os espectros FTIR para o vidros de colorações castanha e incolor. São claramente visíveis os dois picos associados aos modos vibracionais das ligações Si–O–Si ($\sim 1020\text{ cm}^{-1}$) e Si–O $^-$ ($\sim 900\text{ cm}^{-1}$) [9,37,40] (veja-se o conjunto de espectros e respectivos ajustes no Anexo V, bem como as Tabelas V.6 e I.1). Não foi possível obter o mesmo tipo de informação espectral para o vidro púrpura, como em estudos semelhantes [9].

No vidro incolor, observa-se (Fig. 4.8, esquerda) um aumento da intensidade do pico associado à vibração das ligações Si–O–Si (oxigénios em ponte) conjuntamente com o tempo de incubação das amostras. Isto sucede para as superfícies inicialmente corroídas e não corroídas. No entanto, verificam-se diferenças entre ambas no que respeita à presença de organismos, pois as superfícies inicialmente não corroídas revelam maior alteração das bandas vibracionais do que as corroídas. Comparando as amostras inicialmente não corroídas inoculadas em $t_{2,5}$ e $t_{4,5}$, com as de controlo, verifica-se que há aumento da intensidade relativa do pico de Si–O–Si. Este aumento é menos evidente nas amostras inicialmente corroídas para o mesmo t . Existe, ainda, o deslocamento do pico de Si–O⁻, no primeiro caso. Em t_6 , há uma diminuição da intensidade do pico de Si–O–Si nas amostras inicialmente não corroídas inoculadas, o que não se observa nas corroídas. Coloca-se a hipótese de se tratar de uma corrosão incongruente ou da dissolução rede de sílica da primeira camada de corrosão.

No caso das superfícies de vidro castanho, observa-se (Fig. 4.8, direita) o mesmo comportamento que no vidro incolor relativamente à presença ou ausência dos fungos: uma variação do pico da vibração Si–O–Si de ca. 998 para, no caso mais extremo, 1058 cm^{-1} . O centro do mesmo pico desloca-se para números de onda superiores, de t_0 (não corroído) a t_6 (em qualquer caso). O centro do pico de Si–O⁻ encontra-se deslocado para números de onda mais baixos, em alguns casos.

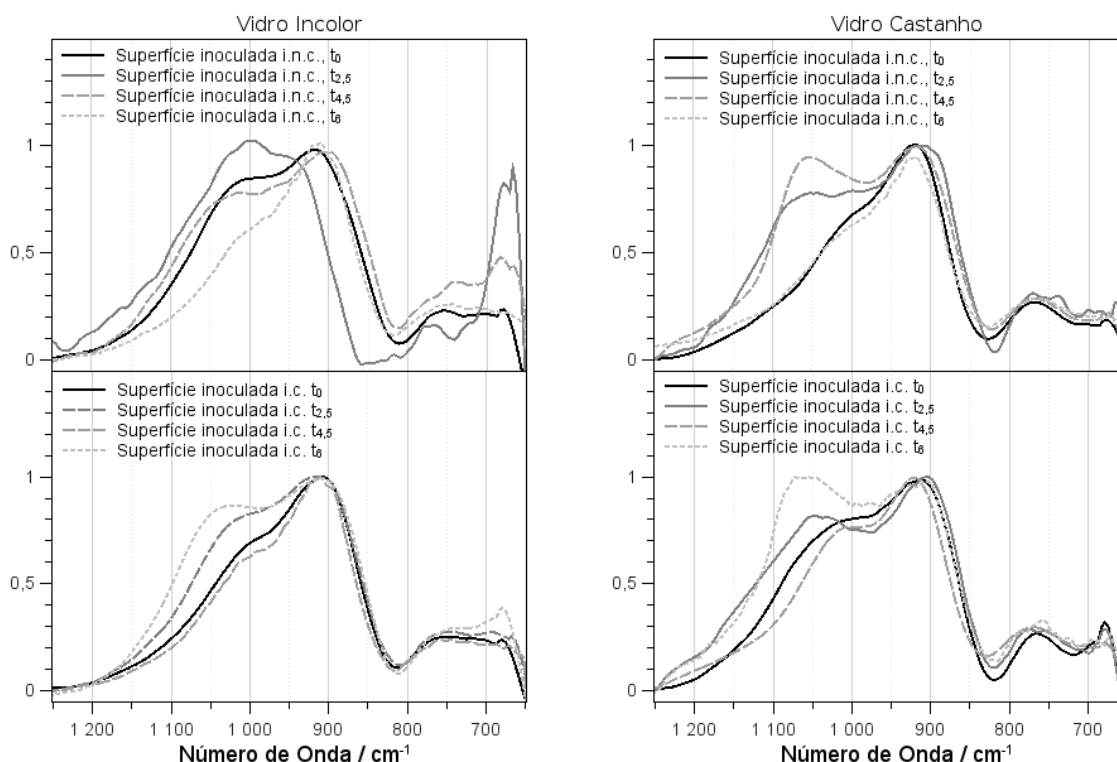


Fig. 4.8: Espectros obtidos da série de análises realizada às superfícies das amostras de coloração incolor (esquerda) e castanho (direita) inicialmente não corroídas (i.n.c.) e corroídas (i.c.), de t_0 a t_6 , por espectroscopia FTIR, e respectivos ajustes lorentzianos para os picos correspondentes às vibrações das ligações Si–O–Si (ca. 1010) e Si–O⁻ (ca. 910).

As duas alterações referidas revelam uma modificação estrutural, associada à deterioração da superfície e formação de uma camada enriquecida em sílica, de acordo com a literatura [9]. O aumento da intensidade das ligações Si–O–Si deve-se à diminuição de iões alcalinos [40]. Por outro lado, o deslocamento do segundo pico para menores números de onda indica que o número de átomos de oxigénio não ligados e de iões alcalinos diminui [9]. No que respeita à avaliação dos efeitos dos organismos neste processo, os dados são indicativos de diferente grau de deterioração entre as amostras inoculadas, relativamente às não inoculadas com o mesmo período de incubação, sugerindo um efeito ou acção catalítica dos fungos no processo de alteração química da superfície.

SEM

Pelas análises de SEM-EDS aplicadas às superfícies, é possível constatar que existem zonas com empobrecimento em alguns elementos, correspondentes a zonas marcadas pela presença dos microrganismos, como se comprova pelos espectros das Figs. 4.9, 4.10 e 4.11, (superfícies inoculadas de vidro incolor e púrpura, após $t_{2,5}$, e púrpura após $t_{4,5}$ respectivamente; *cf.* Anexo V, Fig. V.36 e Fig. V.37 para casos semelhantes ao fim de t_6).

No espectro da cratera sobre o vidro incolor (Fig. 4.9), verifica-se que existe menor intensidade dos picos de Ca, K e Na, comparativamente ao obtido para a superfície de vidro envolvente. De modo análogo, o espectro do vidro púrpura obtido para a zona da depressão (Fig. 4.10) possui menor intensidade dos picos de Ca e K quando comparado ao do vidro adjacente.

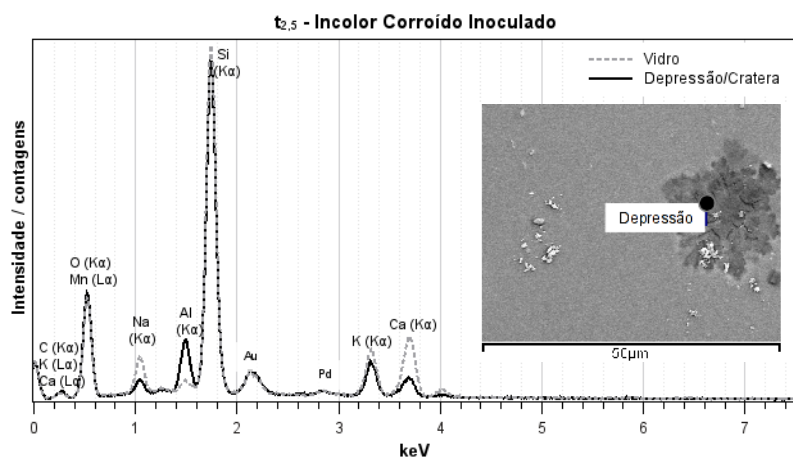


Fig. 4.9: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro incolor em $t_{2,5}$ e a uma depressão claramente empobrecida em Ca e Na, e com menor empobrecimento em K.

Estas análises sugerem a acção dos organismos sobre as superfícies, logo no período de incubação $t_{2,5}$. Como referido na literatura, apesar de os danos não serem visíveis a à vista desarmada, tudo indica que estarão a ocorrer em micro-escala por catálise, sendo já irreversíveis [14,15,17].

Após $t_{4,5}$ (e nos casos analisados em t_6) observa-se que os danos nas superfícies dos vidros se voltam a manifestar, nomeadamente no vidro púrpura inicialmente corroído (Fig. 4.11). No entanto, esta situação não é semelhante em todos os casos, aparentando tratar-se de corrosão incongruente.

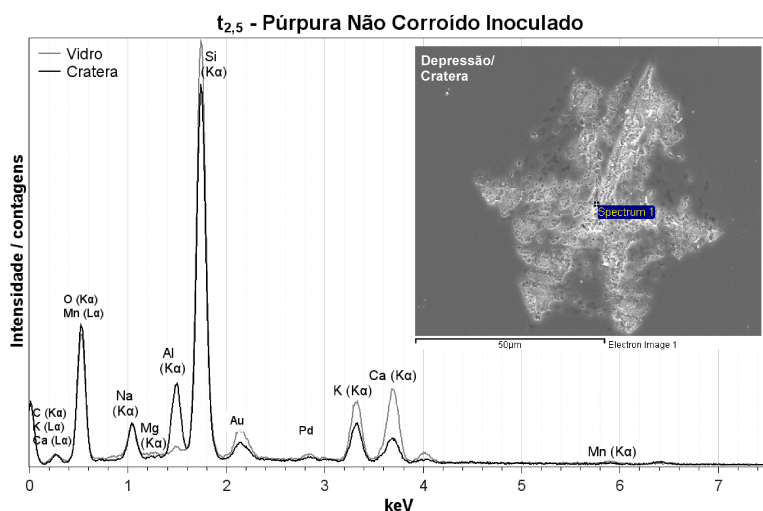


Fig. 4.10: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em $t_{2,5}$ e a uma depressão claramente empobrecida em Ca e K.

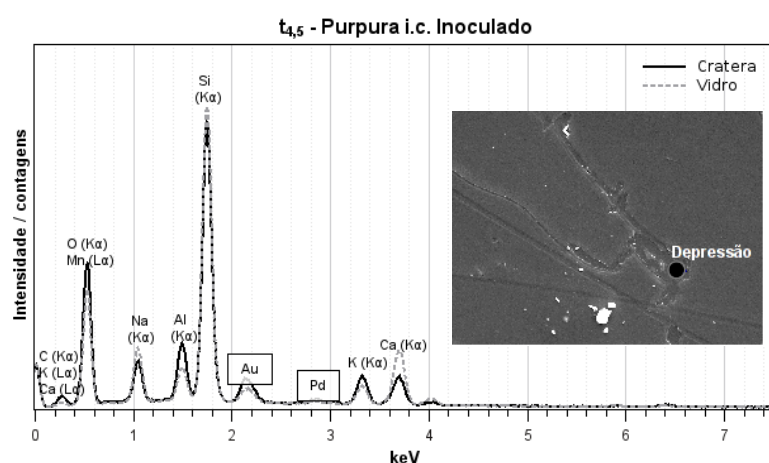


Fig. 4.11: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em $t_{4,5}$ e a uma depressão claramente empobrecida em Ca e Na.

Não sendo passíveis de extrapolação directa para o caso real, os resultados obtidos indicam, ainda assim, uma forte possibilidade de, na eventualidade de se ter desenvolvido um filme de origem biológica nos vitrais da colecção, haver danos, pelo menos ao nível microscópico.

As análises semi-quantitativas realizadas às secções transversais para t_0 e $t_{2,5}$ (Anexo V) não foram conclusivas na análise da variação da composição desde a superfície até ao interior.

4.3.3 Síntese dos Resultados

O conjunto de todos os resultados obtidos encontra-se sintetizado na Tabela 4.3 para facilitar a sua análise comparativa e permitir a identificação das correlações entre os diferentes tipos de amostras e também das correlações com origem nos processos a que estas foram sujeitas.

No vidro incolor inoculado observa-se uma evolução aproximadamente linear de todos os tipos de alteração, com excepção de alteração da cor da superfície (manchas), que não é observada.

O vidro púrpura inoculado apresenta uma evolução mais complexa. As superfícies estão bastante marcadas e machadas, em zonas que se julga terem tido micélio mais denso antes da limpeza (visíveis em baixas ampliações de MO após a limpeza) e a alteração da superfície aumenta de uma forma progressiva, mas a densidade do micélio não acompanha esta evolução.

Tabela 4.3 – Sumário dos danos observados. Os danos estão classificados de forma semi-quantitativa numa escala de 0 a 10 (desde inexistente a muito pronunciado, considerando parâmetros como densidade, quantidade e dimensões)⁴.

Síntese		Incolor				Púrpura				Castanho			
		Controlo		Inoculada		Controlo		Inoculada		Controlo		Inoculada	
		n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.	n.c.	c.
Micélio	t ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	t _{2,5}	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0	6	6
	t _{4,5}	1	1	6	6	1	1	5	5	1	2	5	5
	t ₆	2	2	7	8	3	2	5	5	3	3	5	5
Corrosão	t ₀	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
	t _{2,5}	3	4	6	6	3	4	6	6	2	3	5	6
	t _{4,5}	4	4	7	7	4	4	6	7	3	3	7	7
	t ₆	5	5	8	8	5	5	8	8	4	4	7	7
Alt. Crom.	t ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	t _{2,5}	0	0	2	2	0	0	7	7	0	0	5	5
	t _{4,5}	0	0	2	2	0	0	8	8	0	0	5	5
	t ₆	0	0	4	4	0	0	8	8	0	0	6	6
Cristais	t ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	t _{2,5}	0	0	3	3	0	0	1	1	0	0	1	1
	t _{4,5}	0	0	5	4	1	n.i.	n.i.	n.i.	1	1	1	n.i.
	t ₆	1	1	5	7	1	n.i.	n.i.	1	n.i.	1	n.i.	2
Crateras	t ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	t _{2,5}	0	0	2	1	0	0	2	1	0	0	n.i.	n.i.
	t _{4,5}	–	–	2	?	–	–	2	2	–	–	1	n.i.
	t ₆	–	–	2	2	–	–	2	2	–	–	2	n.i.

Legenda: n.i. → não identificado/encontrado; – → análises não realizadas; ? → inconclusivo; n.c. → superfícies inicialmente não corroídas; c. → superfícies inicialmente corroídas; Alt. Crom. – Alterações cromáticas (marcas e manchas)

No vidro castanho inculado, tal como no caso do vidro púrpura, não ocorre uma evolução crescente da densidade do micélio. Além disso, tanto a corrosão como as marcas e manchas, aumentam de forma pouco expressiva, após uma rápida subida inicial. Não foram detectadas crateras com depleção de elementos no caso deste tipo de superfície, quer corroída, quer não corroída (apesar de ser necessário o último tempo de análise para conclusões relativas a este ponto).

Comparando qualquer das amostras inoculadas com as amostras de controlo, verifica-se que existe influência da presença dos organismos para o grau de deterioração da superfície.

É, ainda, de salientar, que se detectou (ao fim de t_{4,5}) colonização biológica nas amostras de controlo.

4.3.4 Desenvolvimento de Fungos sobre Superfície de Vidro Limpa

As amostras de controlo, introduzidas no ambiente incubado semelhante ao das amostras inoculadas com as duas espécies de fungos escolhidas e conhecidas, revelaram alguns resultados inesperados e interessantes. Estas amostras seguiram o mesmo processamento que as demais, mas não foram inoculadas. Seguiu-se o mesmo nível de exigência no que respeita à esterelização do ambiente: as superfícies foram lavadas e autoclavadas, incubadas num ambiente húmido e estéril (ou pensado como o mais possível), e o manuseamento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

No entanto, estas amostras apresentaram colonização biológica por fungos sobre as suas superfícies ao fim de $t_{4,5}$, que logo ao fim de t_6 estes já haviam proliferado, o que se comprovou por MO (Figs. 4.3, 4.4 e V.4). O facto de se terem encontrado maior número de cristais nestes dois últimos períodos de incubação sobre estas amostras, poderá estar correlacionado com este desenvolvimento de filme biológico. Note-se que:

1. Apesar de não se terem identificado as espécies através de mera observação, sendo outras análises necessárias e não passíveis de realizar em tempo útil para o presente trabalho, deduz-se pelo observado que se tratem de hifas de fungos *airborne*.
2. O ambiente revelou-se, por conseguinte, não ser totalmente estéril. Considera-se que é possível que, ou os esporos não tenham sido eliminados na autoclave, ou que tenha entrado um pequeno fluxo de ar para o interior das caixas de Petri esterilizadas. Os póis no interior das mesmas ou que penetraram, a par dos esporos dos fungos (e que eventualmente se terão depositado devido ao ambiente húmido), terão sido meio suficiente de desenvolvimento destes microrganismos colonizadores.
3. Como já referido, não foram colocados quer qualquer meio nutritivo, quer microrganismos, propositadamente sobre estas superfícies. Assim sendo, estes desenvolveram-se em ambiente, ao que tudo indica, altamente oligotrófico.
4. Os fungos são organismos quimio-organotróficos, pelo que não se encontram necessariamente a alimentar-se do vidro, podendo, no entanto, estar a começar a provocar algum tipo de dano.

Sobre os eventuais contaminantes da superfície, produtos excretados por estes organismos, a sua identificação e da fonte de nutrientes parece ser necessária uma muito mais profunda investigação, com métodos como análises de EPMA (*Electron Probe Micro-Analysis*), análises de biologia molecular, ou outras afins, passíveis de determinar e estudar os mesmos temas.

Torna-se importante salientar que, apesar de alguns autores [4,6] já terem referido a capacidade ubíqua dos organismos, e, em particular, a capacidade dos fungos se desenvolverem sobre vidros ou compostos de silício polidos e aparentemente limpos [15,41], ainda que outros tenham discordado que o vidro possa servir *per se* como fonte de alimento [2,23], não se encontra qualquer referência ao aparecimento de fungos em vidro num ambiente estéril ou dificilmente propício à colonização, ainda que húmido e com temperaturas amenas. Todos os estudos onde foram detectados fungos sobre as superfícies de vidro, estas estavam em atmosfera natural.

5 CONCLUSÕES

A presença de fungos sobre todos os vidros testados provocou um efeito perfeitamente visível na corrosão (marcas, manchas, cristais e crateras), ocorrendo efectivamente biocorrosão.

Entre os vários tipos de vidro, observam-se as seguintes diferenças principais:

- o vidro incolor apresenta muito mais formação de estruturas cristalinas que os demais;
- note-se que o desenvolvimento do micélio também é mais acentuado e sistemático para aquele tipo de vidro;
- os vidros púrpura e castanho apresentam mais alterações ao nível das propriedades ópticas (manchas e marcas, que se atribuem à acção do filme de origem biológica) relativamente ao vidro incolor;
- o vidro púrpura apresenta, claramente, mais crateras com deplecção de elementos que os demais, aparentando ser o mais susceptível;
- existe um igual grau de corrosão das superfícies no final, no entanto, esta manifesta-se de diferentes formas para cada cor, bem como difere entre amostras ou zonas da mesma amostra, deduzindo-se que se trate de um tipo de corrosão incongruente (localizada).

Estas diferenças sugerem que a composição destes vidros influenciou o tipo e grau de alteração.

Da análise química, conclui-se que os elementos Na, K e Ca são os que são removidos da camada superficial na zona das crateras encontradas, podendo ser assimilados pelos organismos ou reagirem com os seus produtos de corrosão (geralmente, ácidos).

Relativamente às superfícies inicialmente não corroídas e corroídas, não foi possível concluir se existe uma forte influência do factor “estado inicial” para o agravamento ou o tipo de dano provocado pelos fungos. No entanto, os resultados parecem apontar para que o facto de existir uma camada inicial de sílica-gel não promoveu em, qualquer dos casos, a formação de um biofilme mais denso ou mais fisicamente ligado à superfície, como referido por Krumbein *et al.* [13]. Pelo contrário, as superfícies inicialmente não corroídas inoculadas formam frequentemente mais cristais e manchas nas primeiras fases de desenvolvimento, acabando por aparentemente se equilibrar o estado de ambas ao fim de t_6 . Além disso, não houve penetração do micélio.

Ao que tudo indica, do ponto de vista da conservação, uma limpeza suave por via húmida pode não ser suficiente para remover a totalidade de um filme de origem biológica, podendo este voltar a estabelecer-se, aparentemente, em meio altamente oligotrófico, como se verificou, biodeteriorando ou continuando um processo de biocorrosão já iniciado sobre a superfície de um vidro de um vitral, em particular, como será o caso dos vitrais desta colecção, expostos a condições de elevada HR.

Além dos resultados positivos do desenvolvimento dos fungos nas amostras inoculadas, todas as amostras de controlo desenvolveram organismos, mesmo num ambiente o mais estéril possível, o que é necessário investigar em maior profundidade.

Revelou-se, ainda, ao nível metodológico, que as análises de MO e SEM-EDS são uma boa

conjugação ao nível do estudo das alterações morfológicas das superfícies de vidro biodeterioradas, bem como as análises de μ -FTIR se verificam ser úteis e esclarecedoras para avaliar a alteração estrutural ao nível da camada superficial do vidro, enquanto que as análises de μ -Raman são particularmente positivas na identificação de estruturas cristalinas que se possam associar a origem biogénica – retirando-se o resultado positivo de esta metodologia poder ser seguida em estudos futuros.

Ao nível da conservação da colecção cujos dois painéis foram tomados como caso de estudo e, em particular, à conservação preventiva, devemos retirar deste estudo de biocorrosão acelerada que é necessário adoptar um procedimento cuidadoso, dadas as condições de exposição e reserva dos vitrais da colecção de D. Fernando II, no Palácio da Pena. Futuramente, deve ter-se em atenção:

- a) a monitorização do estado das superfícies dos vidros (com intervalos nunca superiores a 6 meses),
- b) uma limpeza regular e cuidadosa das superfícies, por via suave,
- c) idealmente, manter estes objectos com temperaturas correntemente recomendadas entre 18-22 °C e HR entre 45-55% [7,42,43],
- d) e que o local de exposição dos vitrais seja bem arejado, de modo a evitar a deposição e fixação de esporos.

Estas serão das principais medidas de prevenção do desenvolvimento ou agravamento do dano provocado por fungos, que se pode deduzir que ocorreu e poderá ocorrer no futuro. Este estudo deveria ser continuado durante mais de 6 meses, de modo a perceber melhor a acção dos fungos inoculados sobre os vidros reproduzidos.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

No que respeita ao resultados sobre a instalação de microrganismos filamentosos, que se supõe serem fungos *airborne*, sobre as superfícies dos vidros, torna-se necessário realizar estudos mais aprofundados relativamente a pontos chave de discussão:

- a) em que circunstâncias se estão a desenvolver estes organismos, nomeadamente onde estão a ir buscar nutrientes;
- b) identificação destes organismos, para inferir quais os organismos pioneiros e que correspondem à fase de biorreceptividade primária deste substrato;
- c) identificação do tipo de dano causado e condições ideais de crescimento, procurando determinar como se poderão evitar.

Outras questões que seriam interessantes explorar, passam pelo estudo ou análise dos produtos metabólicos destes fungos e da sua interacção química com estas superfícies, por forma a melhor compreender os mecanismos envolvidos. Sugerem-se análises à composição das superfícies, realizadas por μ -EDXRF ou PIXE/PIGE (*Proton induced gamma- ou x-ray emission*) e, ainda, ICP-AES (*Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*) para estudo de produtos de lixiviação (que não foram possíveis realizar no presente estudo por limitações técnicas).

-
- [1] NAVARRO, J. M. F., El Vidrio. Constitución, fabricación, propiedades. CSIC (Ed.), Madrid, 1985.
- [2] NEWTON, R. & DAVISON, S., Conservation of Glass. Butterworth-Heineman (Ed.), Oxford, U.K., 1989.
- [3] GARCIA-VALLÀS, M., GIMENO-TORRENTE, D., MARTÍNEZ-MANENT, S. & FERNÁNDEZ-TURIEL, J.L., "Medieval stained glass in a Mediterranean climate: Typology, weathering and associated biomineralization processes and products", in *American Mineralogist*, vol. **88** (2003), pp. 1996-2006.
- [4] BREHM, U., GORBUSHINA, A. & MOTTERSHEAD, D., "The role of microorganisms and biofilms in the breakdown and dissolution of quartz and glass", in *Paleography, Paleoclimatology, Paleoecology*, vol. **219** (2005), pp. 117-129.
- [5] SAND, W., "Microbial Mechanisms of Deterioration of Inorganic Substrates: a General Mechanistic Overview", in *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. **40**(2-4) (1997), pp. 183-190.
- [6] GALLIEN, J., GOUGET, B., CARROT, F., ORIAL, G. & BRUNET, A., "Alteration of glasses by microorganisms", in *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, vol. **181** (2001), pp. 610-615.
- [7] DAVISON, S., Conservation and Restoration of Glass. Butterworth-Heinemann (Ed.), Oxford, U.K., 2003.
- [8] ANAF, W., "Study on the formation of heterogeneous structures in leached layers during the corrosion process of glass", in *Horizons, CeROArt*, vol. **6** (2010), pp. 1-15.
- [9] VILARIGUES, M., *Estudo do efeito da adição de iões metálicos na corrosão de vidros*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2008.
- [10] MÜLLER, E., DREWELLO, U., DREWELLO, R., WEISSMANN, R. & WUERTZ, S., "In situ analysis of biofilms on historic window glass using confocal laser scanning microscopy", in *Journal of Cultural Heritage*, vol. **21** (2001), p. 31-42(12).
- [11] DREWELLO, U., WEISSMANN, R., RÖLLEKE, S., MÜLLER, E., WUERTZ, S., FEKRSANATI, F., TROLLE, C. & DREWELLO, R., "Biogenic surface layer on historical window glass and the effect of excimer laser cleaning", in *Journal of Cultural Heritage*, vol. **1** (2000), p. S161-S171.
- [12] SCHABEREITER-GURTNER, C., PIÑAR, G., LUBITZ, W. & RÖLLEKE, S., "Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis", in *Journal of Microbiological Methods*, vol. **47**(3) (2001), p. 345-354.
- [13] KRUMBEIN, W.E., URZI, C.E. & GEHRMANN, C., "Biocorrosion and biodeterioration of antique and medieval glass", in *Geomicrobiology Journal*, vol. **9** (1991), pp. 139-160.
- [14] DREWELLO, R. & WEISSMANN, R., "Microbially influenced corrosion of glass", in *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. **47** (1997), pp. 337-346.
- [15] GORBUSHINA, A. & PALINSKA, K., "Biodeteriorative processes on glass: experimental proof of the role of fungi and cyanobacteria", in *Aerobiologia*, vol. **15** (1999), pp. 183-191.
- [16] Krumbein, W.E.. The paradox of glass. Stability and decay; biological deterioration and transformation; conservation and restoration. In *Le matériau vitreux: verre et vitraux: actes du Cours Intensif Européen Ravello, 28-30 Avril 1995*. Lefèvre, R-A., and Pallot-Frossard, I (Ed.). 1995. p. 108-124.
- [17] EHRLICH, H., "Modern Views on Desilicification: Biosilica and Abiotic Silica Dissolution in Natural and Artificial Environments", in *Chemical Reviews*, vol. **110** (2010), p. 4656-4689.
- [18] STAUDIGEL, H., CHASTAIN, R.A., YAYANOS, A. & BOURCIER, W., "Biologically mediated dissolution of glass", in *Chemical Geology*, vol. **126** (1995), pp. 147-154.
- [19] Rölleke, S., Gurtner, C., Pinar, G. & Lubitz, W.. Molecular approaches for the assessment of microbial deterioration of objects of art. In *Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. Orio Ciferri, Piero Tiano & Giorgio Mastromei (Eds.). 2000. pp. 39-47.

- [20] TENNENT, N., "Fungal Growth on Medieval Stained Glass", in *J. Br. Soc. Master Glass Painters* , vol. **17** (1981), p. 64-68. Treitell, L., Berk, S. & Kravitz A. (1955)..
- [21] MITIK-DINEVA, N., WANG, J., TRUONG, V.K., STODDART, P.R., MALHERBE, F., CRAWFORD, R.J. & IVANOVA, E.P., "Differences in colonisation of five marine bacteria on two types of glass surfaces", in *Biofouling* , vol. **257** (2009), pp. 621-631.
- [22] CHAE, M.S., SCHRAFTB, H., HANSEN, L.T. & MACKERETH, R., "Effects of physiocochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass", in *Food Microbiology* , vol. **23** (2006), p. 250-259.
- [23] RICHARDS, O.W., "Somo Fungous Contaminants of Optical Instruments", in *Journal of Bacteriology* , vol. **58** (1949), pp. 453-455.
- [24] AAVV, Corrosion of Glass, Ceramics and Ceramic Superconductors: Principles, Testing, Chaaracterization and Apllications. David E. Clark & Bruce K. Zoitos (Eds.), William Andrews, 1992.
- [25] STERPENICH, J. & LIBOUREL, G., "Using Stained Glass Windows to Understand the Durability of Toxic Waste Matrices", in *Chemical Geology* , vol. **174** (2001), pp. 181-193.
- [26] RAGUIN, V. C., The History of Stained Glass: The Art of Light Medieval to Contemporary. , Thames & Hudson, 2003.
- [27] REDOL, P., O mosteiro da Batalha e o vitral em Portugal nos séculos XV e XVI. Câmara Municipal da Batalha (Ed.), Mosteiro da Batalha (?), 2003.
- [28] KURJIAN, C.R. & PRINDLE, W.R., "Perspectives on the history of Glass Composition", in *Journal of Americanl Ceramics Society* , vol. **81** (4) (1998), pp. 795-813.
- [29] (ED) TEIXEIRA, J., D. Fernando II – Rei-Artista Artista-Rei. , Fundação da Casa de Brangança, 1986.
- [30] MARTINHO, B. & VILARIGUES, M., Vitrais e Vidros, um gosto de D. Fernando II / Stained Glass and Glass Objects, Ferdinand II's passion. ISBN 978 989 95904 5 8. (Ed.), Parques de Sintra, Monte da Lua, S.A, 2011.
- [31] REIS, D.D.C., *The materials, technique, conservation treatment and after-care of "Interior de um Convento"*. Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Conservação e Restauro, especialização em pintura sobre tela, 2011.
- [32] BRILL, R. H., Chemical Analysis of Early Glass: Volumes 1 e 2. The Corning Museum of Glass (Ed.), New York, 1999.
- [33] COLOMBAN, P., TOURNIE, A. & BELLOT-GURLET, L., "Raman identification of glassy silicates used in ceramics, glass and jewellery: a tentative differentiation guide", in *Journal of Raman Spectroscopy* , vol. **37** (2006), pp. 841-852.
- [34] COLOMBAN, P., "Polymerization degree and Raman identification of ancient glasses used for jewelery, ceramic enamels and mosaics", in *Journal of Non-Crystalline Solids* , vol. **323** (2003), pp. 180-187.
- [35] COLOMBAN, P., ETCHEVERRY, M., ASQUIER, M., BOUNICHOU, M. & TOURNIE, A., "Raman identification of ancient stained glasses and their degree of deterioration", in *Journal of Raman Spectroscopy* , vol. **37** (2006), pp. 614-626.
- [36] COLOMBAN, P., "Raman spectrometry, a unique tool to analyze and classify ancient ceramics and glasses", in *Applied Physics A* , vol. **79** (2004), pp. 167-170.
- [37] ABO-NAF, S.M., EL BATAL, F.H. & AZOOZ, M.A., "Characterization of some glasses in the system SiO₂, (Na₂O)-R- by infrared spectroscopy", in *Materials Chemistry and Physics* , vol. **77** (3) (2002), pp. 846-852.
- [38] WEDEPOHL, K.H. & SIMON, K., "The chemical composition of medieval wood ash glass from Central Europe", in *Chemie der Erde* , vol. **70** (2010), pp. 89-97.
- [39] SCHALM, O., JANSSENS, K., WOUTERS, H. & CALUWÉ, D., "Composition of 12–18th century window glass in Belgium: Non-figurative windows in secular buildings and stained-glass windows in religious buildings", in *Spectrochimica Acta Part B* , vol. **62** (2007), p. 663–668.

- [40] DE FERRI, L., BERSANI, D., LORENZI, A., LOTTICI, P.P., VEZZALINI, G. & SIMON, G., "Structural and vibrational characterization of medieval like glass samples", in *Journal of Non-Crystalline Solids* , vol. **358** (2012), pp. 814-819.
- [41] WAINWRIGHT, M., AL-WAJEEH, K. & GRAYSTON, J., "Effect of silicic acid and other silicon compounds on fungal growth in oligotrophic and nutrient-rich media", in *Mycol. Res.* , vol. **101 (8)** (1997), pp. 933-938.
- [42] TENNENT, N., The conservation of glass and ceramics: research, practice and training. Earthscan (Ed.), James & James, 1999.
- [43] KOOB, S., Conservation and care of glass objects. Corning Museum of Glass (Ed.), Archetype, 2006.
- [44] MESSAL, C. & GERBER, T., "Biodeterioration on oxidic glasses: Part I: Glaspest on antique glasses as a special kind of biodeterioration on oxidic glasses (Abstract)", in *Materials and Corrosion* , vol. **49** (1998), pp. 870-876.
- [45] MESSAL, C., GERBER, T. & BALLIN, G., "Biodeterioration on oxidic glasses: Part II: Biocorrosive reasons for appearance of Glaspest of antique glasses like Meckleburger Waldglas (Abstract)", in *Materials and Corrosion* , vol. **50** (1999), pp. 166-172.
- [46] AAVV, Fungi: Biology and Applications. Kevin Kavanagh (Ed.), John Wiley & Sons, 2011.
- [47] HARRIS, S.D., "Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems", in *Mycologia* , vol. **100 (6)** (2008), pp. 823-832.
- [48] NEVES, E.R.D.S., *Avaliação da acção antifúngica e desacidificação de um anova mistura: aplicação à conservação e tratamento do papel*. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2006.
- [49] Raman spectra, X-ray diffraction and mineral chemistry database developed for the University of Arizona Mineralogy and Crystallography department and has been sponsored by NASA and Mike Scott.. Disponível em: <http://rruff.info>.
- [50] Handbook of Minerals Raman Spectra, Free database 2000-2012 Laboratoire de Sciences de la Terre ENS-Lyon France. Disponível em: <http://www.ens-lyon.fr/LST/Raman/>.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela I.1 – Fungos identificados em vidro histórico e noutros materiais inorgânicos.				
Fungos	Tipologia	Proveniência	Observações	Refs.
<i>Acremonium spp.</i>	Vidro de vitral	Vitrais alemães e franceses	Produzem substâncias poliméricas extracelulares.	[15]
<i>Alternaria spp.</i>	Vidro óptico	Zona do canal do Panamá		[13,23]
<i>Aspergillus spp.</i> <i>A. fumigatus</i> e <i>A. niger</i>	Forest Glass, Vitral Vidro óptico	Alemanha, Ilha na costa da Flórida,	Excreção de produtos metabólicos agressivos.	[12,14,23,44]
<i>Aureobasidium spp.</i> <i>A. pullulans</i> ou <i>Pullularia pullulans</i>	Vitral, vidro óptico	Alemanha, França, zona do canal do Panamá	Excreção de produtos metabólicos agressivos, nomeadamente substâncias poliméricas extracelulares.	[12,14,15,23]
<i>Bassiosporium spp.</i>	Vidro óptico	Zona do canal do Panamá		[23]
<i>Capnobotryella spp.</i> <i>C. renispora</i>	Vitral	Alemanha	Crescimento lento. Altamente resistentes a ambiente seco e à radiação UV.	[12]
<i>Cladosporium spp.</i>	Vidro óptico	Zona do canal do Panamá		[14,23]
<i>Coniosporium spp.</i> <i>C. perforans</i>	Vitral	Alemanha	Crescimento lento. Altamente resistentes a ambiente seco e à radiação UV.	[12]
<i>Engyodontium spp.</i> <i>E. album</i>	Vitral	Alemanha	Excreção de produtos metabólicos agressivos. Fungos micofílicos (vivem em material orgânico morto).	[12]
<i>Eurotium spp.</i>	Vitral		Tem um papel importante na corrosão do vidro (Ohtsuki (1962), <i>cit.</i> em [14]).	[14]
<i>Geomyces spp.</i> <i>G. panorum</i> <i>G. asperulatus</i>	Vitral	Alemanha	Excreção de produtos metabólicos agressivos.	[12]
<i>Kirschsteiniotelia spp.</i> <i>K. elasterascus</i>	Vitral	Alemanha		[12]
<i>Leptosphaeria spp.</i> <i>L. maculans</i>	Vitral	Alemanha		[12]
<i>Monilia sitophola</i>	Vidro óptico	Ilha na costa da Flórida		[23]
<i>Penicillium spp.</i> <i>P. frequentens</i> *	Forest Glass, Vitral, Vidro óptico	Alemanha, Ilha na costa da Flórida		[20,14,23,45]
<i>Himenoscomycetidae</i> Grupo: pirenomicetes	Vidro óptico	Zona do canal do Panamá		[23]
<i>Rhodotorula spp.</i> <i>R. minuta</i>	Vitral	Alemanha	Excreção de produtos metabólicos agressivos.	[12]
<i>Stanjemonium spp.</i> <i>S. ochroreum</i>	Vitral	Alemanha		[12]
<i>Trimmatostroma spp.</i>	Vidro de vitral	Alemanha e França	Produzem substâncias poliméricas extracelulares.	[15]
Género <i>Ustilago spp.</i>	Vitral	Alemanha		[12]
<i>Verticillium spp.</i> <i>V. lecanii</i> <i>V. psalliotae</i>	Vitral	Alemanha	Excreção de produtos metabólicos agressivos. Fungos micofílicos (vivem em material orgânico morto).	[12]

Fungos: Breve Introdução

A fisiologia das células dos fungos tem um impacto significativo no ambiente, nos processos industriais e na saúde humana. No que respeita aos aspectos ecológicos, no seu ciclo natural, estes são organismos decompositores de matéria orgânica (químio-organitróficos) [46].

A maioria dos fungos são organismos filamentosos e multicelulares. Existem, ainda as leveduras, unicelulares, mas que não serão aqui desenvolvidas [46].

Os fungos microscópicos (que, em particular, nos interessam) são diversos. Um olhar atento pelas suas estruturas revela que são compostos por agregados de filamentos longos e ramificados chamados hifas (Fig. I.1), organizados para suportar os esporos que são as células responsáveis pela sua reprodução e disseminação. As hifas destas estruturas aéreas estendem-se e ramificam-se dentro do substrato que as suporta, como uma rede, denominada micélio (Fig. I.2). Estas são as primeiras estruturas a estenderem-se, quando os fungos se instalam, sendo que lhes permite adequarem-se de forma eficiente ao espaço, só depois se iniciando a formação de células reprodutoras. Colónias de fungos em substratos ricos em nutrientes (eutróficos) frequentemente ramificam, produzindo um micélio denso para exploração dos recursos, enquanto que as hifas colonizadoras de um substrato pobre em nutrientes (oligotrófico) ramificam menos, produzindo um micélio espalhado, apropriado à procura de recursos [46].

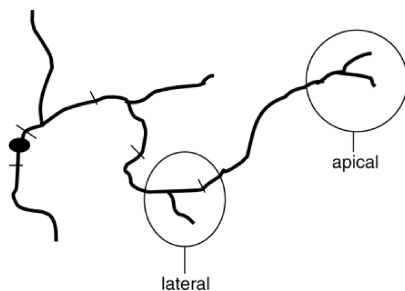


Fig. I.1: Desenho esquemático da aparência de uma hifa – filamento com ramificações [47].

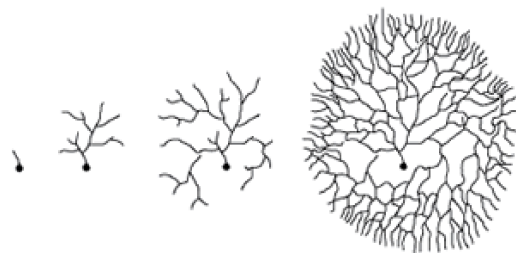


Fig. I.2: Desenho esquemático da evolução de um esporo para um micélio.

O alimento ideal para o crescimento dos fungos é rico em carbono e simultaneamente proporciona um ambiente ácido (em laboratório, um meio complexo composto de PDA (*potato-dextrose agar*) é ideal para o crescimento destes microorganismos). As células dos fungos utilizam uma vasta gama de nutrientes e aplicam diversas estratégias para a obtenção desses nutrientes. Os fungos são imóveis, saprófitas (decompositores) ou, por vezes, parasitas, e químio-organotróficos. Exibem uma interação dinâmica com o seu ambiente nutricional, o que pode ser exemplificado pelas alterações morfológicas, por vezes observadas, dependentes da disponibilidade de nutrientes [46].

A maioria dos fungos vive em ambiente quente, ácido, aeróbico e com disponibilidade de açúcares. A gama de temperaturas de crescimento é ampla, mas a maioria das espécies crescem bem a cerca de 25° C.

Os dois géneros de fungos filamentosos estudados neste trabalho (*Penicillium* e *Cladosporium*) são aqui utilizados como exemplo de esquematização taxonómica:

Cladosporium sp. → O género *Cladosporium* ainda não se encontra muito bem definido taxonomicamente. Os seus conidióforos são compridos e escuros, formando conídios (esporos) em cadeias ramificadas. Os conídios podem apresentar várias formas, nomeadamente elíptica e cilíndrica, e uma marca escura em cada extremidade (Fig. I.3). Este género é muito comum no ar de exterior e interior [48].

Penicillium sp. → O género *Penicillium* apresenta um micélio esponjoso e volumoso, com conidióforos (simples ou ramificados) que terminam em aglomerados de filíades, nas quais se produzem os conídios, em cadeia (Fig. I.4). Este género é muito frequente nos solos. Algumas espécies podem produzir toxinas [48].

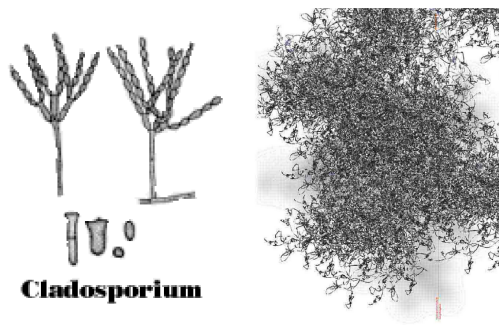


Fig. I.3: Esquematização dos conídios (à esquerda) e micélio do género *Cladosporium*.

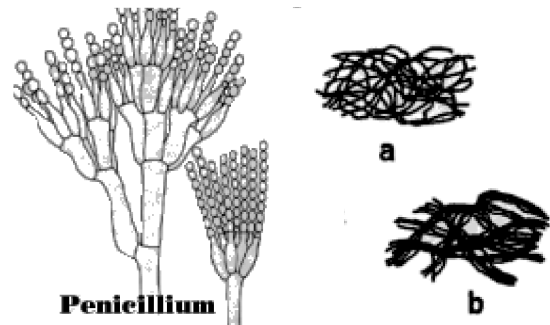


Fig. I.4: Esquematização dos conídios (à esquerda) e textura das colónias (à direita (a) lanosa e (b) funiculosa) do género *Penicillium*.

ANEXO II – A COLECÇÃO DE D. FERNANDO II

D. Fernando II entrou na dinastia de Bragança através do casamento com D. Maria II. Nasceu e foi educado entre a aristocracia romântica da corte de Viena, oriundo de uma família tradicionalmente ligada à cultura e civilização alemãs. Após a morte da rainha (1843), habitou no Palácio das Necessidades, onde juntou a colecção de vitrais de produção da Europa Central – Suíça, Alemanha e Holanda –, coleccionados e recolhidos de igrejas, mosteiros, *ateliers* de artistas ou mansões de aristocratas. Após a entrega do Palácio ao Ministro dos Negócios Estrangeiros, durante a República, o seu conteúdo foi gradualmente disperso e o conjunto de vitrais foi transferido para as reservas do Palácio da Ajuda, onde ficou até 1949. Nesta data, é transferido novamente, desta vez, para a localização onde permaneceu até aos dias de hoje, no torreão do Palácio Nacional da Pena. Recentemente, esta colecção sofreu uma intervenção de restauro e foi, pela primeira vez, apresentada ao público [29,30].

O primeiro painel seleccionado pensa-se que possa representar St. Agostinho ou St. Ambrósio, com associação a S. Lucas pelo seu atributo (o boi), a quem aparece uma Virgem com o Menino (Fig. II.1). Trata-se, aparentemente, de uma produção do século XV, de origem alemã.

O segundo painel seleccionado trata-se de um vitral brasonado de origem suíça, datado do século XVII. Observa-se uma organização bipartida, de uma composição heráldica colocada num quadro arquitectónico de colunatas perspectivadas com entablamentos. O espaço arquitectónico que encerra as figuras encontra-se dividido em três pisos, onde se encontram dois Anjos Tenentes suportando o brasão, dois Santos Patronos (crê-se que São Martinho e São Cristóvão), a figura de Cristo Ressuscitado e uma Virgem com o Menino, em Majestade, ao centro (Fig. II.2).



Fig. II.1: Vitral que representa St. Ambrósio (?), com associação a S. Lucas pelo atributo (o boi), ca. séc. XV, Alemanha.
Parques de Sintra – Monte da Lua © copyright



Fig. II.2: Vitral brasonado, com três níveis de representação, encerrada em espaço arquitectónico, cerca do séc. XVII, Suíça.
Parques de Sintra – Monte da Lua © copyright

Reprodução dos vidros

Foram utilizadas as seguintes matérias-primas puras (laboratoriais) para a produção dos vidros à semelhança das composições dos vitrais estudados, analisadas por μ -EDXRF (veja-se página seguinte):

- SiO_2 purum p.a. – Sigma-Aldrich, CAS: 60676-86-0
- CaCO_3 p.a. – Fluka/Sigma-Aldrich CAS:471-74-1
- K_2CO_3 p.a. – Sigma-Aldrich, CAS:584-08-7
- MnO_2 – Ridel-de Haën, CAS: 1313-13-9
- Fe_2O_3 p.a. – Ridel-de Haën, CAS: 1309-37-1
- Na_2CO_3 p.a. – PANREAC, CAS: 497-19-8

Inoculação e Incubação dos Vidros Reproduzidos

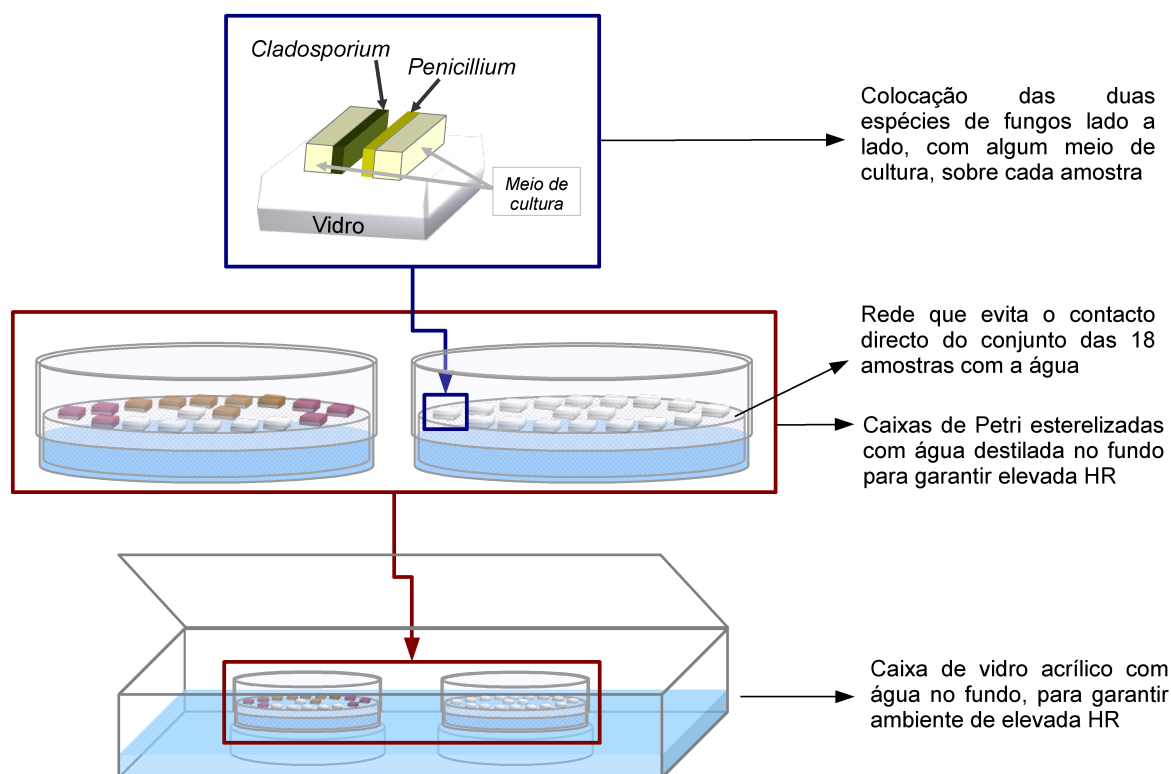


Fig. III.1: *Design* experimental da incubação: separação e disposição das várias amostras nas respectivas caixas de Petri – exemplo para dois dos quatro casos.

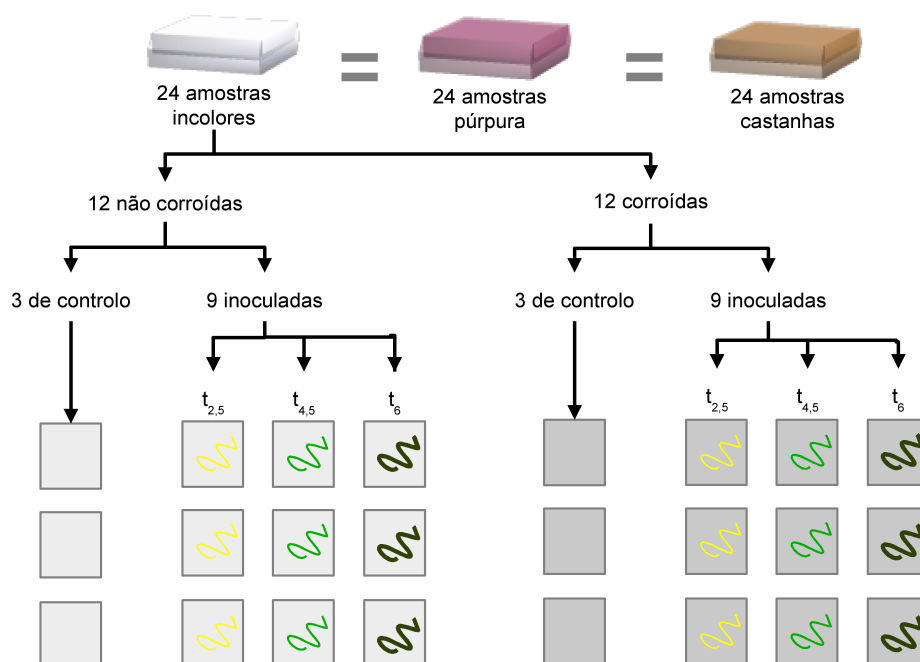


Fig. III.2: Design experimental da inoculação.

μ-EDXRF

Utilizou-se um espectrómetro ArtTAX, Intax®, do Laboratório Científico do Departamento de Conservação e Restauro (Lab. Científico do DCR).

O espectrómetro ArtTAX, Intax® está equipado com um tubo de raios X com alvo de Mo e detector de Si(Li) Xflash® refrigerado por efeito Peltier. O espectrómetro foi operado com os seguintes parâmetros fixos: em 40 kV, 600 μA e tempo de aquisição de 360 segundos, em atmosfera de Hélio. Este equipamento possui uma câmara acoplada, o que permitiu escolher a área de aquisição em ambas as peças. Para além dos referidos pontos, realizaram-se análises semelhantes aos padrões CMOG (*Corning Museum of Glass*) B, C e D, cujas composições são conhecidas [32], de modo a obter os dados da quantificação, através deste método.

Para a análise quantitativa, recorreu-se ao programa WinAXIL® (*analysis of X-ray spectra by a non-linear Interactive Least-squares*). Para tal foram necessários os padrões acima referidos. A capacidade do equipamento está limitada a $Z < 13$, não detectando sódio ou magnésio. A quantificação destes elementos foi realizada por diferença [32].

MO

Utilizou-se um microscópio Axioplan 2, Zeiss, com máquina fotográfica digital Nikon DMX acoplada. Este microscópio tem objectivas de 5×, 10×, 20×, 40×, 50× e 100×, esta última em modo contacto (com ampliações 10x superiores, respectivamente, pela ampliação da ocular).

Utilizou-se um outro equipamento pertencente ao Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT),

sendo este um Microscópio Leica DMI5000M com foco Z motorizado, dotado de um jogo de 5 objectivas semi-apocromáticas (ampliações de 5×, 10×, 20×, 50× e 100×) e de uma câmara digital Leica DFC290, com maiores ampliações (até 1000x) onde se utilizaram condições de *bright-field* (campo luminoso) e contraste de interferência, bem como a funcionalidade *multifocus* para melhor observação de amostras não planas.

UV-Vis

Neste trabalho, os espectros de absorção óptica foram obtidos com um espectrómetro Varian Cary 5G na gama UV-Vis-NIR.

μ-Raman

No que respeita às análises de μ-Raman, foram realizadas, na superfície dos vidros modelo, utilizando o espectrómetro de Raman Horiba Jobin Yvon, modelo LabRaman 300, pertencente ao Lab. Científico do DCR. Para a aquisição dos espectros utilizou-se o laser de estado sólido com linha de excitação de 532 nm (500mW), focado com objectivas Olympus de 50x. Todas as análises foram realizadas sem filtro e com os seguintes parâmetros fixos: 15 ciclos de 30 s de aquisição, na gama espectral entre 200 e 1300 cm^{-1} . A calibração do aparelho é realizada com um padrão de silício.

A informação contida num espectro Raman traduz a estrutura da rede tridimensional e covalente de tetraedros SiO_4 , que retém um forte carácter polimérico e cuja assinatura vibracional é bem definida, estando presente a informação sobre a estrutura e a composição das fases vítreas [34,35,36]. A polimerização é função da composição e do equilíbrio de temperatura de fusão, podendo alterar se sujeito a corrosão [35,34]. A substituição de átomos de Si, por Na, K, Ca, Pb, etc, muda a

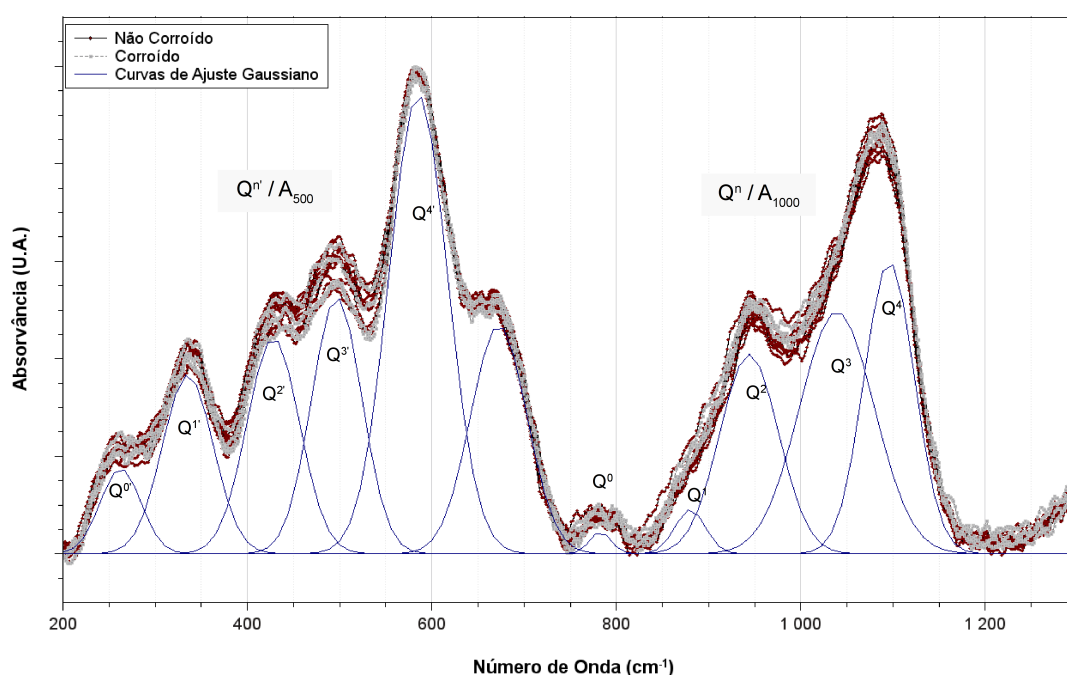


Fig. III.3: Espectro μ-Raman exemplificativo dos realizados às amostras de vidro das 3 diferentes cores (neste caso, vidro de coloração castanha), respectivos ajustes e atribuição de componentes Q^n e $Q^{n'}$ que foram separadas em picos individuais.

conectividade e ângulos da ligação Si–O e a carga iónica parcial dos oxigénios terminais, o que pode modificar o comprimento da ligação e a polarizabilidade [33], do mesmo modo que a depleção destes iões modifica a assinatura da rede no Raman.

Num espectro Raman de vidro, como os que se trataram neste trabalho, encontram-se geralmente duas regiões espectrais, uma cujo pico mais intenso se localiza a ca. 500 cm^{-1} (A_{500}) e corresponde à vibração de flexão da ligação Si–O (Q^n), e outra a cerca de 1000 cm^{-1} (A_{1000}), correspondente à distensão da ligação Si–O (Q^n) [35]. A nomenclatura atribuída associa-se aos componentes da estrutura da rede (Tabela 3.2 e Fig. III.3), decomponíveis com ajustes gaussianos, considerando a desordem estrutural do material [33,34,35]. Esta decomposição foi realizada de acordo com o descrito na literatura (considerados cinco ou menos picos para cada região espectral) [33-36], embora o pico entre $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ tenha sido necessariamente considerado para desconvolução, sem atribuição a um componente dos modos vibracionais.

μ-FTIR

As análises de μ -FTIR foram realizadas na superfície dos vidros modelo utilizando o espectrómetro *Nicolet Nexus* equipado com um microscópio *Continuum* com objectiva IV 15 $\times$, e um detector de semicondutor, *Thermo Nicolet MCT* (semicondutor ternário de mercúrio, cádmio e telúrio), em modo ATR (*Attenuated Total Reflectance*) com cristal de Si, analisando-se a 128 scans e com resolução de 8 cm^{-1} . Através desta técnica é possível a identificação dos grupos funcionais dos compostos existentes apenas na zona superficial da amostra, até profundidades de $\sim 2\text{ }\mu\text{m}$. Os espectros foram obtidos para a região espectral entre 4000 cm^{-1} e 650 cm^{-1} , gama habitualmente denominada infravermelho médio [9,33].

Os espectros de FTIR foram tratados através de normalização e ajustes lorentzianos, de modo a decompor a banda entre $800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ essencialmente nos dois picos vibracionais informativos relativamente à estrutura da rede vítrea: vibrações das ligações Si–O–Si (cerca de 1000 cm^{-1} para o quartzo, deslocada na sílica vítrea para cerca de 920 cm^{-1}) e Si–O $^-$ (ca. $900\text{-}950$) [9].

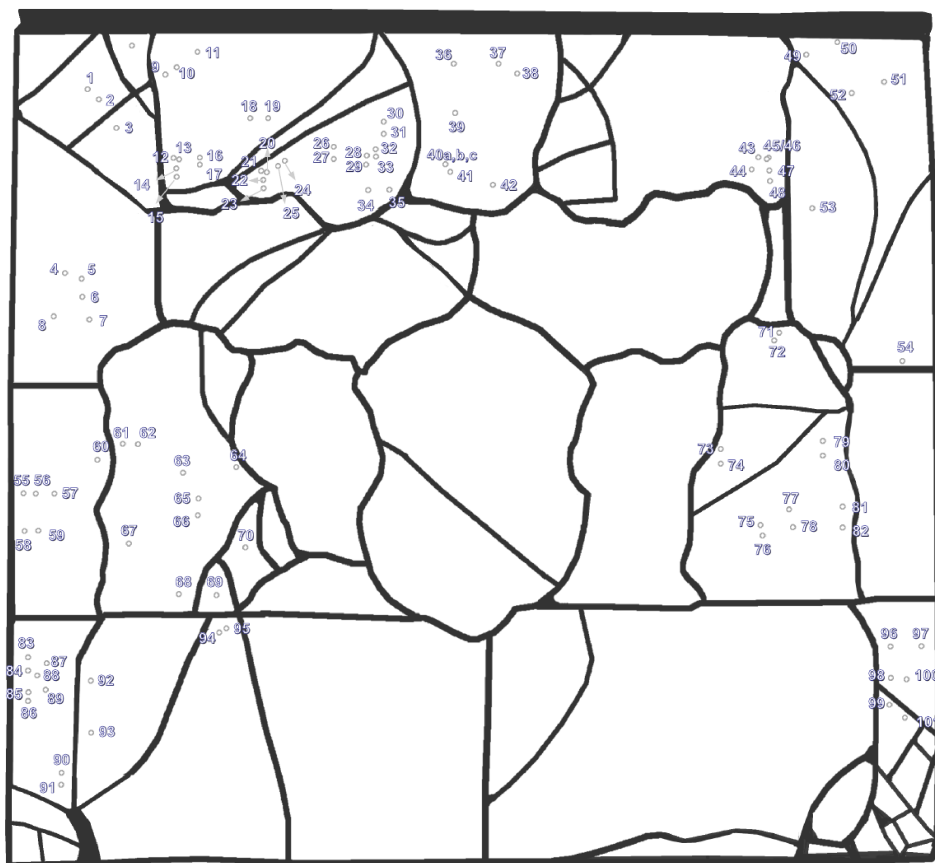


Fig. IV.1: Mapeamento de todos os pontos relativos às análises de μ -EDXRF realizadas ao VS – considerados os pontos realizados sobre o vidro, sendo que as restantes colorações são obtidas com pintura a grisalha, amarelo de prata e esmaltes.



Fig. IV.2: Mapeamento das zonas onde foram recolhidas amostras biológicas localizadas sobre o vitral – assinaladas a vermelho – nos fragmentos do VS.

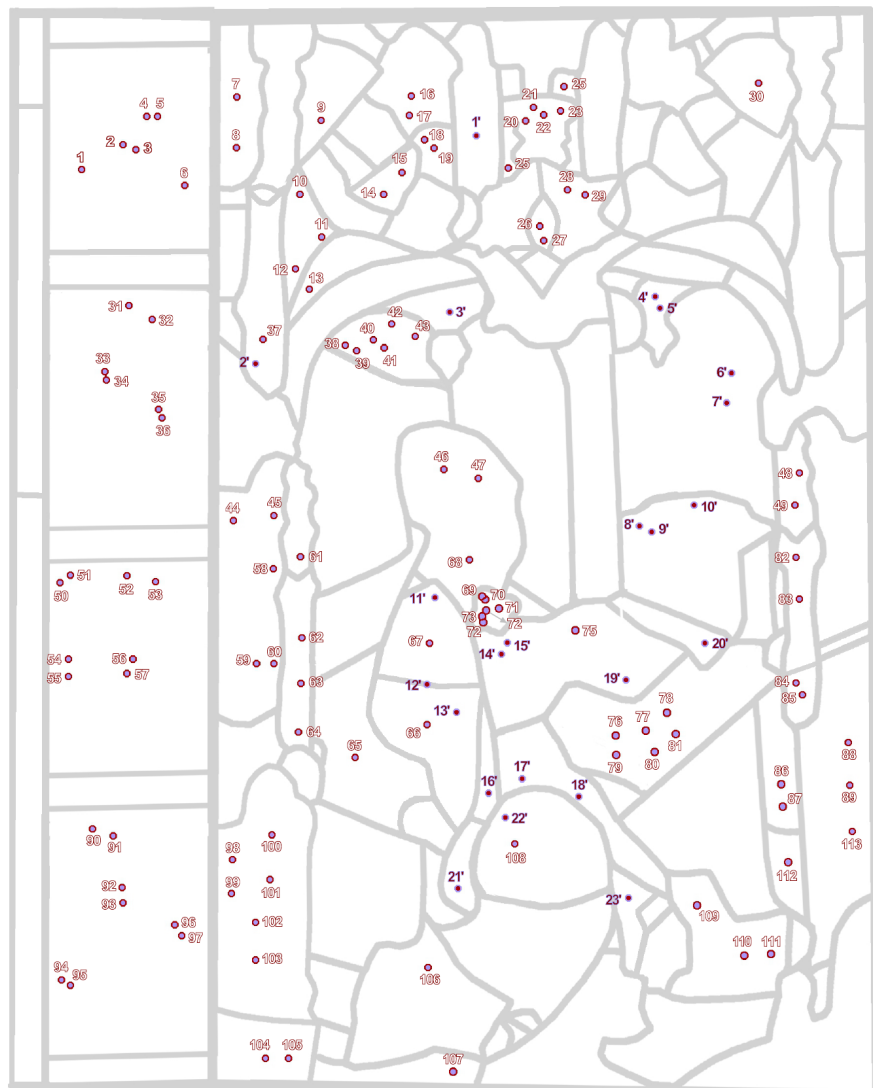


Fig. IV.3: Mapeamento de todos os de análise de μ -EDXRF realizados ao conjunto VA (direita) e pequenos painéis individuais (esquerda) (pontos n correspondem ao reverso e n' corresponde ao anverso do painel).

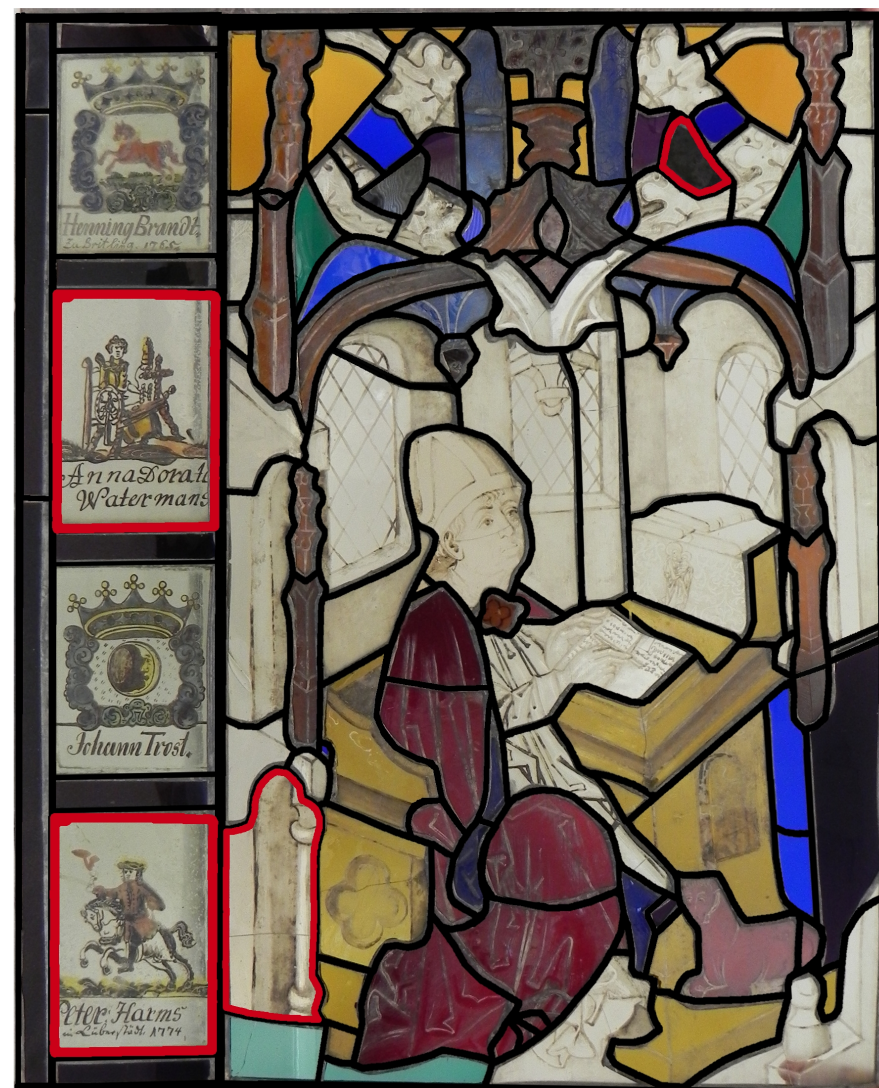


Fig. IV.4: Mapeamento das zonas onde foram recolhidas amostras biológicas localizadas sobre o vitral – assinaladas a vermelho – nos fragmentos do VA e painéis mais pequenos associados.

μ -EDXRF

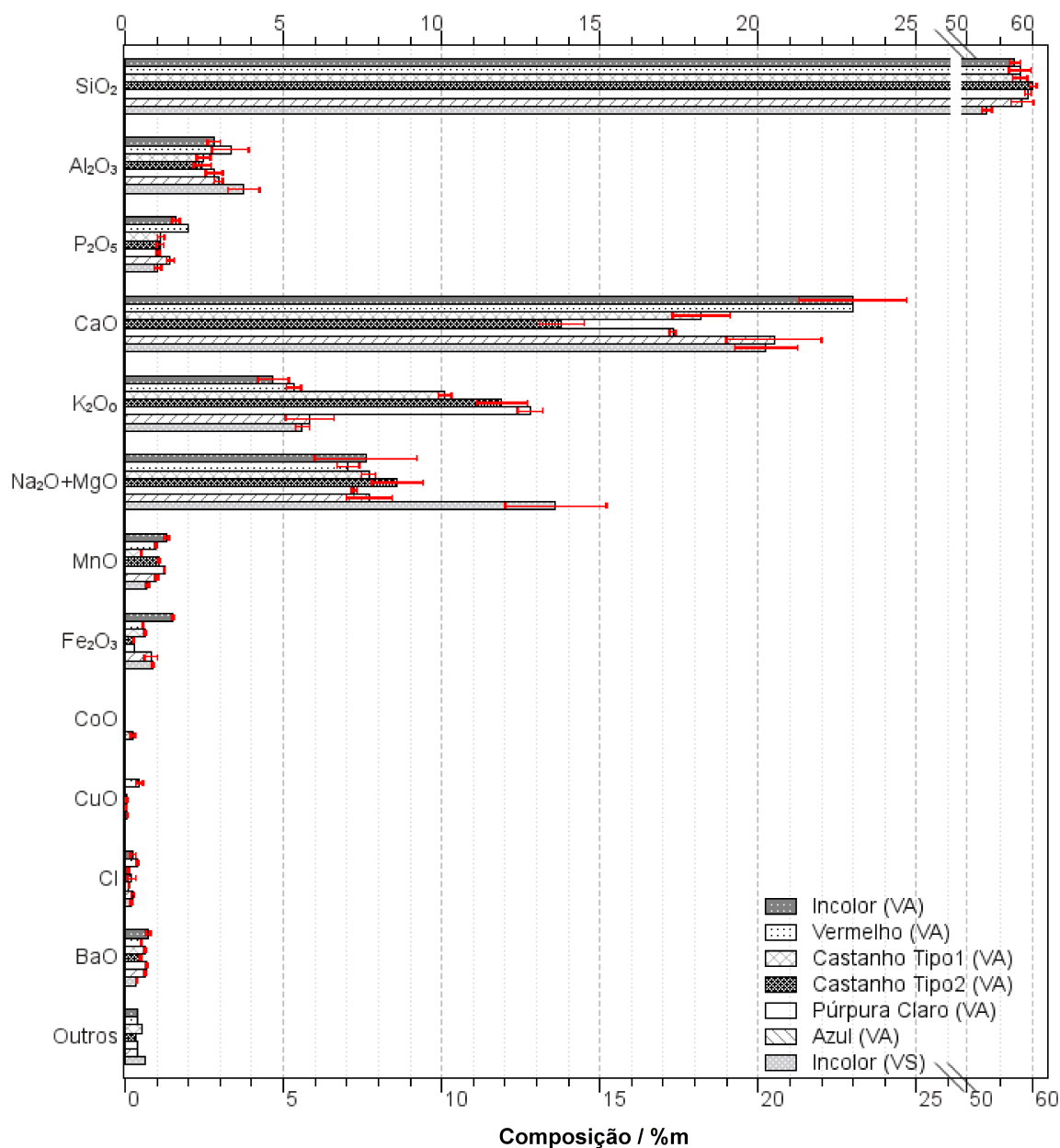


Fig. V.1: Composição média (%m) dos óxidos constituintes dos vidros dos painéis de vitral em estudo.

Tabela V.1 – Composição em %m (e respectivos desvios padrão à média de pontos analisados) dos óxidos dos vidros dos painéis de Vitral Alemão e Suíço.

Óxidos:	SiO ₂	Al ₂ O ₃	P ₂ O ₅	CaO	K ₂ O	MnO	Fe ₂ O ₃	CoO	CuO	Cl	BaO	PbO	SnO ₂	SrO	TiO ₂	ZnO	NiO	Rb ₂ O	Na ₂ O + MgO
VA – Séc.XV																			
Incolor (11)	57,2 ±0,8	2,80 ±0,21	1,60 ±0,13	23,0 ±1,7	4,68 ±0,49	1,29 ±0,09	0,49 ±0,03	n.d.	0,01 ±0,00	0,26 ±0,08	0,72 ±0,07	0,04 ±0,02	0,11 ±0,01	0,09 ±0,01	0,10 ±0,01	0,04 ±0,01	vest.	vest.	7,60 ±1,62
Vermelho (3)	58,0 ±1,7	3,33 ±0,58	2,00 ±0,00	23,0 ±0,0	5,33 ±0,23	0,98 ±0,04	0,57 ±0,02	n.d.	0,44 ±0,11	0,37 ±0,04	0,51 ±0,03	0,03 ±0,00	0,13 ±0,02	0,09 ±0,00	0,12 ±0,00	0,03 ±0,00		vest.	7,05 ±0,35
Castanho T1 (4)	58,0 ±1,1	2,47 ±0,21	1,12 ±0,11	18,2 ±0,9	10,1 ±0,2	0,52 ±0,02	0,64 ±0,03	n.d.	0,02 ±0,00	0,11 ±0,03	0,64 ±0,03	0,07 ±0,01	0,09 ±0,02	0,16 ±0,01	0,15 ±0,01	0,03 ±0,00	vest.	0,01 ±0,00	7,69 ±0,22
Castanho T2 (10)	60,0 ±0,5	2,44 ±0,28	1,10 ±0,10	13,8 ±0,7	11,9 ±0,8	1,05 ±0,04	0,26 ±0,01	n.d.	0,04 ±0,03	0,21 ±0,14	0,50 ±0,04	0,13 ±0,13	0,05 ±0,01	0,06 ±0,00	0,07 ±0,01	0,03 ±0,00	vest.	0,02 ±0,00	8,59 ±0,81
Púrpura (3)	59,2 ±0,5	2,81 ±0,27	1,03 ±0,05	17,3 ±0,1	12,8 ±0,4	1,25 ±0,01	0,28 ±0,00	n.d.	0,02 ±0,01	0,11 ±0,02	0,68 ±0,03	0,05 ±0,03	0,10 ±0,01	0,10 ±0,00	0,11 ±0,01	0,03 ±0,00	vest.	0,02 ±0,00	7,24 ±0,08
Azul (6)	58,3 ±1,7	2,94 ±0,13	1,42 ±0,12	20,5 ±1,5	5,84 ±0,76	0,99 ±0,05	0,81 ±0,20	0,24 ±0,07	0,05 ±0,01	0,24 ±0,04	0,63 ±0,03	0,04 ±0,01	0,09 ±0,01	0,09 ±0,02	0,09 ±0,02	0,03 ±0,01	0,05 ±0,01	vest.	7,71 ±0,73
VS - Séc. XVII																			
Incolor (4)	53,0 ±0,8	3,75 ±0,50	1,03 ±0,10	20,25 ±1,0	5,60 ±0,22	0,69 ±0,05	0,88 ±0,04	n.d.	vest.	0,21 ±0,04	0,36 ±0,02	0,13 ±0,05	0,09 ±0,02	0,07 ±0,00	0,19 ±0,01	0,03 ±0,00	vest.	vest.	13,6 ±1,6
Legenda: vest. = vestígios (quantidades inferiores a 100 ppm); n.d. = não detectado.																			

Tabela V.2 – Composição média (%m) dos óxidos constituintes dos vidros reproduzidos e respectivo desvio padrão à media dos pontos analisados.

Óxidos:	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	K ₂ O	MnO	Fe ₂ O ₃	CuO	BaO	SrO	TiO ₂	ZnO	ZrO	Na ₂ O + MgO
Incolor	Vidro produzido	58,5	–	18,0	5,0	0,7	0,8	–	–	–	–	–	17 + 0
	Superfície não corroída	51,2±2,3	0,72±0,03	13,07±0,96	3,88±0,30	0,50±0,05	0,82±0,08	vestígios	vestígios	0,03±0,00	0,10±0,02	vestígios	29,7
	Superfície corroída	56,0 ±1,0	0,80±0,10	15,77±0,31	4,57±0,05	0,61±0,01	1,00±0,02	vestígios	vestígios	0,03±0,00	0,13±0,00	n.d.	20,9
Púrpura	Vidro produzido	64,4	–	16,8	12,6	1,2	0,3	–	–	–	–	–	4,7 + 0
	Superfície não corroída	67,7±2,3	0,73±0,12	15,93±0,45	12,07±0,35	1,12±0,04	0,45±0,03	vestígios	0,16±0,09	vestígios	0,05±0,00	vestígios	5,46
	Superfície corroída	65,0±0,2	0,93±0,12	15,03±0,55	11,40±0,26	1,01±0,02	0,45±0,02	n.d.	vestígios	n.d.	0,09 ±0,02	n.d.	6,04
Castanho	Vidro produzido	62,5	–	17,0	11,2	0,8	0,5	–	–	–	–	–	8,0 + 0
	Superfície não corroída	64,5±0,7	0,87±0,09	15,33±0,47	10,5±0,17	0,76±0,03	0,63±0,01	n.d.	vestígios	n.d.	0,12±0,01	n.d.	7,10
	Superfície corroída	64,0 ±1,0	1,03±0,12	14,5±1,00	9,83±0,15	0,67±0,04	0,62±0,02	n.d.	vestígios	n.d.	0,13±0,02	n.d.	8,94

UV-Vis

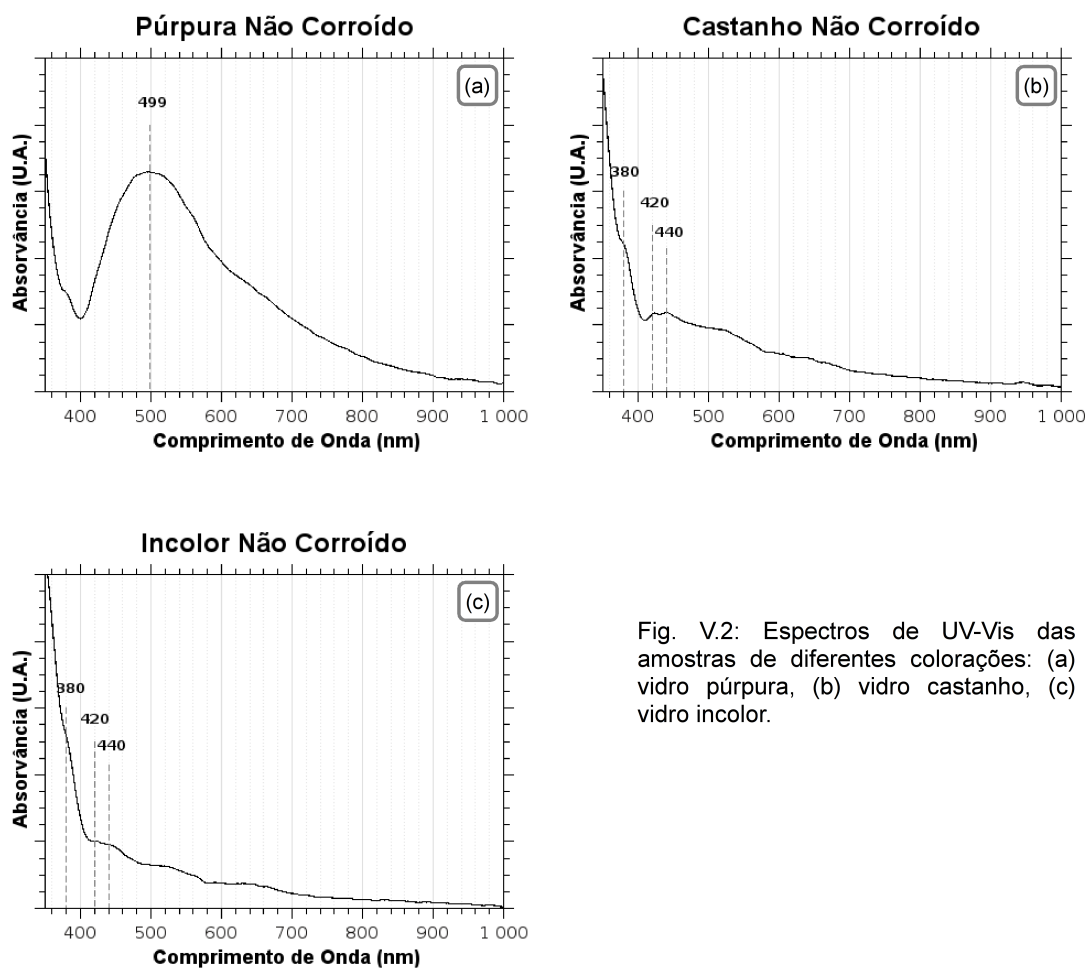


Fig. V.2: Espectros de UV-Vis das amostras de diferentes colorações: (a) vidro púrpura, (b) vidro castanho, (c) vidro incolor.

Microscopia Óptica

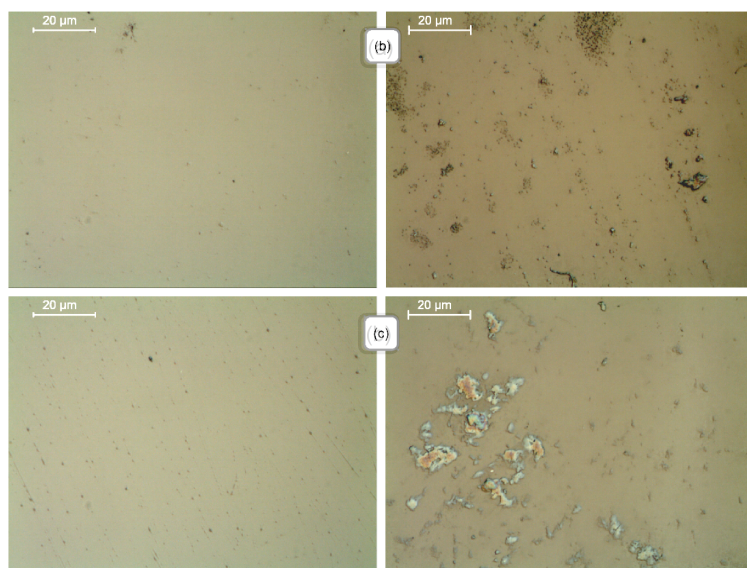


Fig. V.3: Microfotografia digital obtida em condições de contraste de interferência (IC) e ampliação 1000× para superfícies de:

(a) vidro púrpura;
(b) vidro castanho.

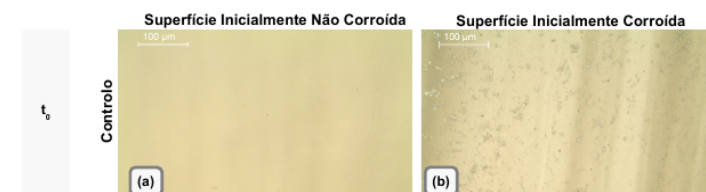


Fig. V.4.1: Estado inicial (t_0).

Observa-se:

→ que a amostra (b) apresenta rede de microfissuras

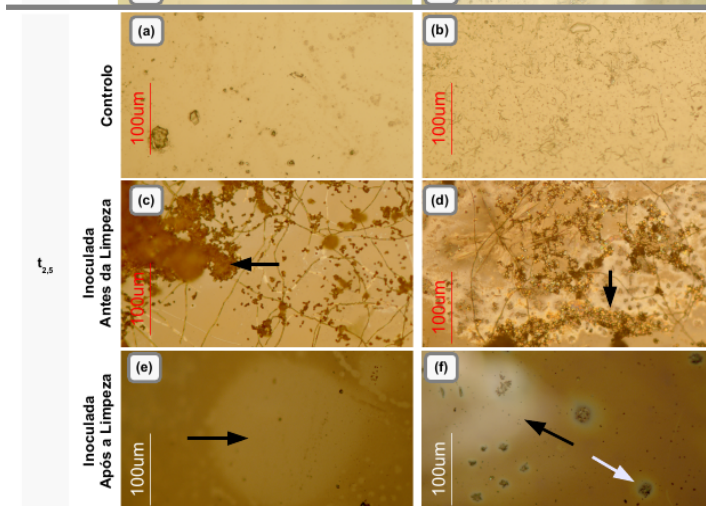


Fig. V.4.2: Tempo de incubação = $t_{2,5}$.

Observa-se:

→ superfícies de controlo (a) e (b) mais deterioradas;

→ desenvolvimento de hifas sobre as duas superfícies inoculadas (c) e (d), que se estende até às extremidades (antes da limpeza);

→ marcas e manchas deixadas pelos fungos sobre as superfícies (e) e (f) e cristais anteriormente cobertos pelas zonas mais densas de organismos (após a limpeza)

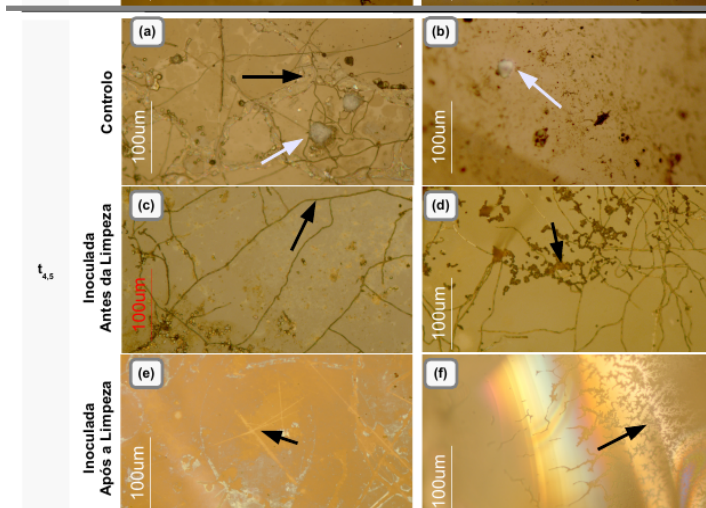


Fig. V.4.3: Tempo de incubação = $t_{4,5}$.

Observa-se:

→ superfícies de controlo (a) e (b) mais deterioradas, evidenciando colonização biológica e estruturas cristalinas;

→ micélio desenvolvido sobre as duas superfícies inoculadas (c) e (d) (antes da limpeza);

→ marcas e manchas deixadas pelos fungos sobre as superfícies (e) e (f) e aparente iridiscência (após a limpeza)

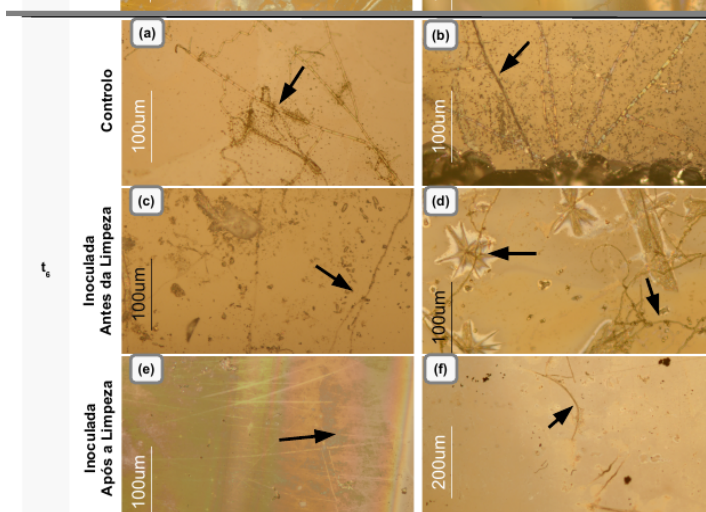


Fig. V.4.4: Tempo de incubação t_6 .

Observa-se:

→ desenvolvimento da colonização biológica em (a) e (b)

→ micélio desenvolvido e estruturas ou marcas sobre as superfícies (c) e (d) (antes da limpeza);

→ marcas e manchas deixadas pelos fungos em (e) e (f), aparente iridiscência e, ainda, vestígios de organismos (após a limpeza)

Fig. V.4: Microfotografias ópticas de ampliação 200× das superfícies de vidro castanho (setas brancas indicam cristais e setas pretas organismos e danos consequentes).

μ-Raman

Devido ao facto de, na gama de 800-1200 cm^{-1} , as bandas correspondentes aos vários componentes Q_n se encontrarem significativamente sobrepostas, e ao facto de os espectros possuírem algum ruído, característico da situação experimental, as soluções apresentadas para os centros não são unívocas.

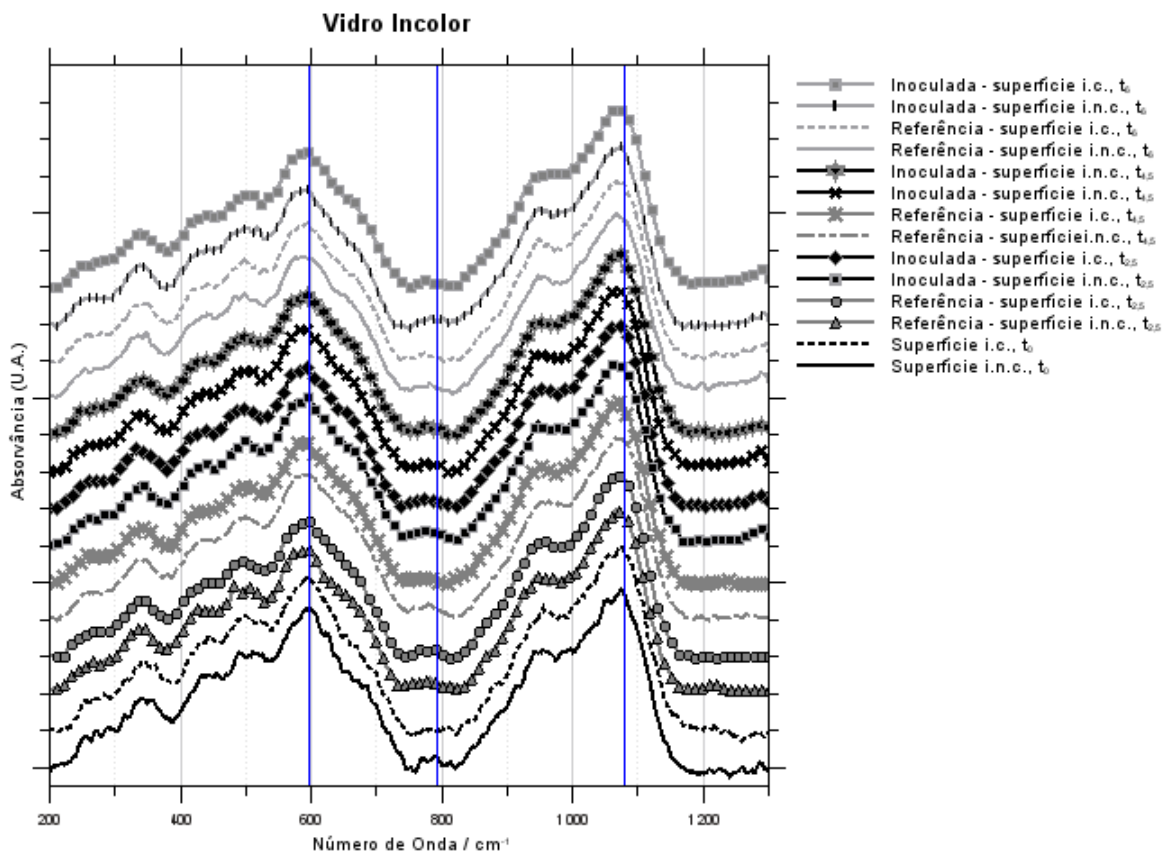


Fig. V.5: Espectros obtidos para as superfícies das amostras incolores (de t_0 a t_6), por μ -Raman.

Tabela V.3 – Centros aproximados dos componentes Q_n de cada amostra incolor estudada (posições em números de onda em cm^{-1} , admitindo um erro de $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$ em todos os casos não indicados).

Pico	Amostras t_0		Amostras $t_{2,5}$				Amostras $t_{4,5}$				Amostras t_6			
	Não Inoculadas		Não Inoculadas		Inoculadas		Não Inoculadas		Inoculadas		Não Inoculadas		Inoculadas	
	n.c.	c	n.c.	c	n.c.	c	n.c.	c	n.c.	c	n.c.	c	n.c.	c
$Q^{0'}$	266	266	261	263	264	264	263	263	263	262	262	264	264	264
$Q^{1'}$	341	345	336	338	339	339	338	337	338	338	338	339	338	338
$Q^{2'}$	432	433	425	427	429	426	426	426	427	425	427	425	426	428
$Q^{3'}$	498	497	496	493	495	492	492	491	492	491	491	492	491	492
$Q^{4'}$	<u>591</u>	<u>594</u>	<u>585</u>	<u>586</u>	<u>586</u>	<u>587</u>	<u>586</u>	<u>587</u>	<u>587</u>	<u>586</u>	<u>587</u>	<u>588</u>	<u>586</u>	<u>588</u>
?	685	687	670	674	673	672	674	673	674	672	674	674	673	674
Q^0	782	788	782	782	779	778	778	778	780	781	783	778	779	778
Q^1	869	891	891	868	872	878	872	882	873	875	876	882	879	875
Q^2	944	949	947	945	951	945	946	948	947	945	946	946	947	945
Q^3	1017	1005	1052	1019	1020	1009	1019	1016	1015	1013	1018	1009	1011	1010
Q^4	1077	1075	1096	1078	1079	1076	1079	1078	1076	1076	1079	1075	1075	1076

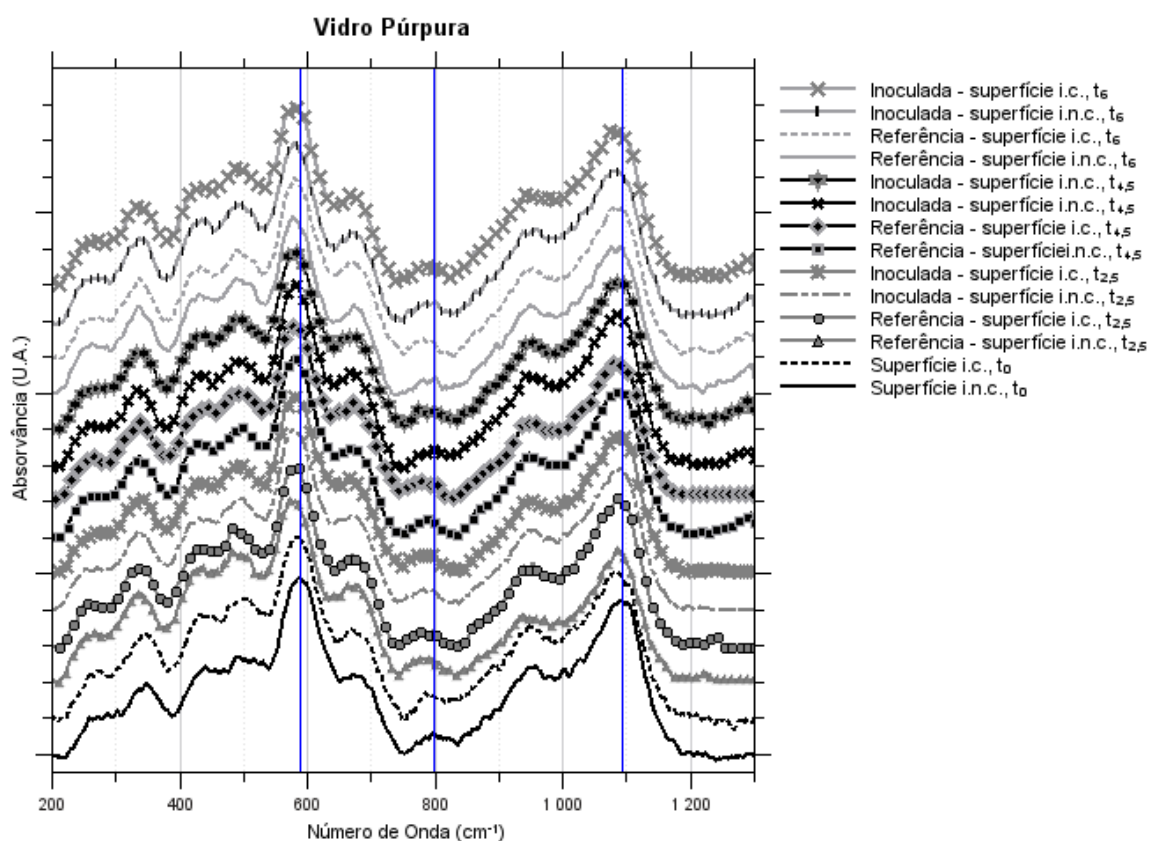


Fig. V.6: Espectros obtidos das análises de μ -Raman realizadas às superfícies das amostras púrpura.

Tabela V.4 – Centros aproximados dos componentes Q_n de cada amostra castanha estudada (posições em números de onda em cm^{-1} , admitindo um erro de $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$ em todos os casos não indicados a cinzento).

Pico	Amostras t_0		Amostras $t_{2,5}$				Amostras $t_{4,5}$				Amostras t_6			
	1a	1b	1a–3a	1b–3b	4a–6a	4b–6b	1a–3a	1b–3b	4a–6a	4b–6b	1a–3a	1b–3b	4a–6a	4b–6b
Q^0	266	260	261	259	261	263	261	261	261	261	263	262	261	262
$Q^{1'}$	343	338	336	338	337	338	338	337	337	337	337	338	338	338
Q^2	428	422	425	421	426	423	424	423	424	423	426	424	423	423
$Q^{3'}$	499	493	496	491	498	495	496	495	497	494	498	496	495	494
Q^4	589	585	585	586	584	585	584	584	584	584	584	585	584	583
?	681	671	670	672	671	671	670	671	671	672	671	672	672	671
Q^0	784	788	782	783	786	785	785	783	786	785	783	784	783	786
Q^1	904	891	928	930	890	881	880	881	883	889	880	881	889	881
Q^2	946	948	947	949	946	946	945	944	945	949	924	946	947	946
Q^3	1044	1022	1052	1018	1052	1027	1055	1052	1052	1017	1052	1057	1053	1057
Q^4	1094	1092	1096	1088	1096	1093	1097	1094	1096	1087	1097	1096	1092	1095

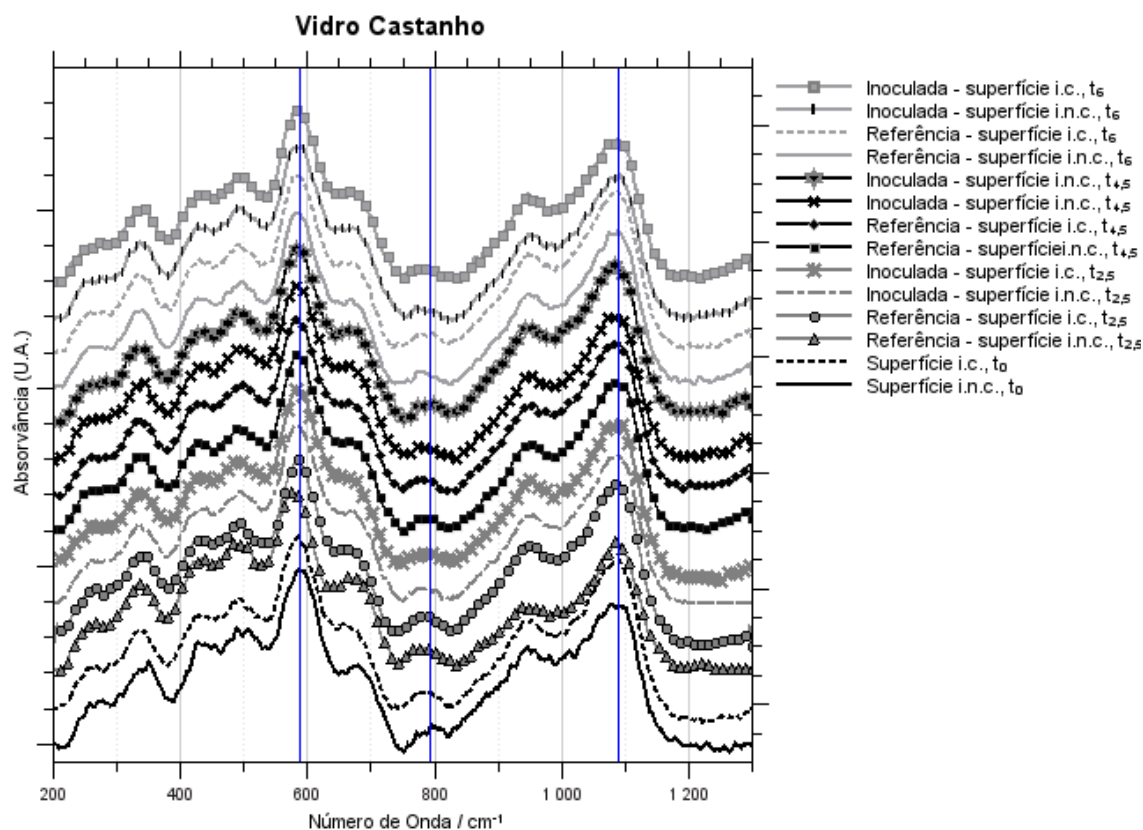


Fig. V.7: Espectros obtidos das análises de μ -Raman realizadas às superfícies das amostras castanhas.

Tabela V.5 – Centros aproximados dos componentes Q_n de cada amostra púrpura estudada (posições em números de onda em cm^{-1} , admitindo um erro de $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$ em todos os casos não indicados a cinzento).

Pico	Amostras t_0		Amostras $t_{2,5}$				Amostras $t_{4,5}$				Amostras t_6			
	1a	1b	1a–3a	1b–3b	4a–6a	4b–6b	1a–3a	1b–3b	4a–6a	4b–6b	1a–3a	1b–3b	4a–6a	4b–6b
Q^0	271	268	260	261	261	262	261	262	261	262	261	263	262	262
Q^1	346	344	336	335	336	336	337	336	336	336	337	336	337	337
Q^2	435	430	425	426	427	427	426	427	426	427	426	428	427	427
Q^3	502	498	493	494	495	495	495	496	494	494	496	496	495	495
Q^4	<u>587</u>	<u>585</u>	<u>581</u>	<u>580</u>	<u>582</u>	<u>581</u>	<u>581</u>	<u>582</u>	<u>581</u>	<u>582</u>	<u>581</u>	<u>581</u>	<u>581</u>	<u>581</u>
?	683	679	673	674	672	673	673	673	673	675	675	674	674	674
Q^0	793	789	786	785	786	786	787	786	788	787	785	785	786	786
Q^1	878	916	870	873	876	891	876	881	884	877	890	873	881	887
Q^2	946	951	947	946	946	946	945	947	948	946	946	948	948	950
Q^3	1057	1023	1024	1019	1024	1048	1026	1023	1017	1020	1046	1024	1015	1014
Q^4	1101	1093	1088	1087	1091	1092	1092	1092	1089	1089	1092	1090	1087	1085

Em seguida, apresentam-se os espectros de cristais e outros tipos material estranho encontrados sobre a superfície de vidro das diversas amostras (os espectros de referência foram retirados de bases de dados [e.g. 49,50]):

$t_0 \rightarrow$ não encontrados quaisquer cristais ou outro material estranho

t_{2,5}

t_{2,5} - Vidro Incolor e Púrpura inicialmente Não Corroídos Inoculados

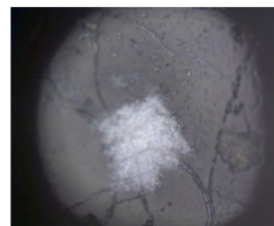
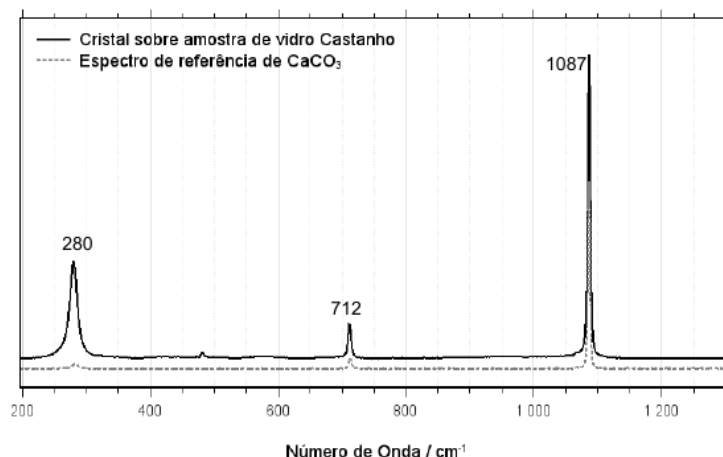


Fig. V.8: Espectro obtido por μ -Raman após t_{2,5}, sobre cristais na superfície de vidro incolor e púrpura inicialmente não corroída e corroída inoculadas, como ilustrado no exemplo para o caso de vidro incolor.

t_{4,5}

t_{4,5} - Vidro Incolor inicialmente Não Corroído Inoculado

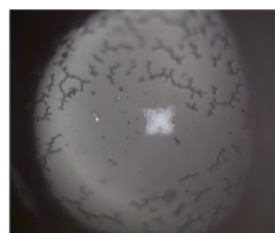
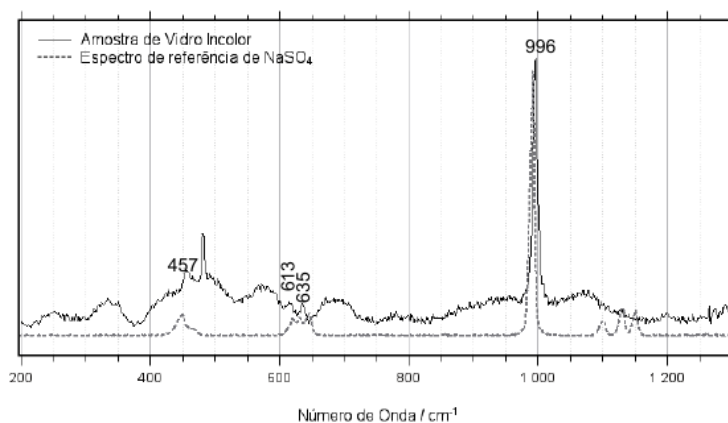


Fig. V.9: Espectro obtido por μ -Raman após t_{4,5}, sobre cristais na superfície de vidro incolor inicialmente não corroído (i.n.c.) inoculada, como ilustrado.

t_{4,5} - Incolor i.c. Não Inoculado

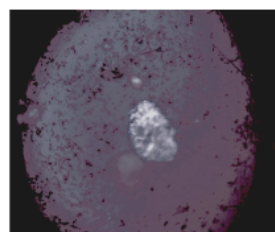
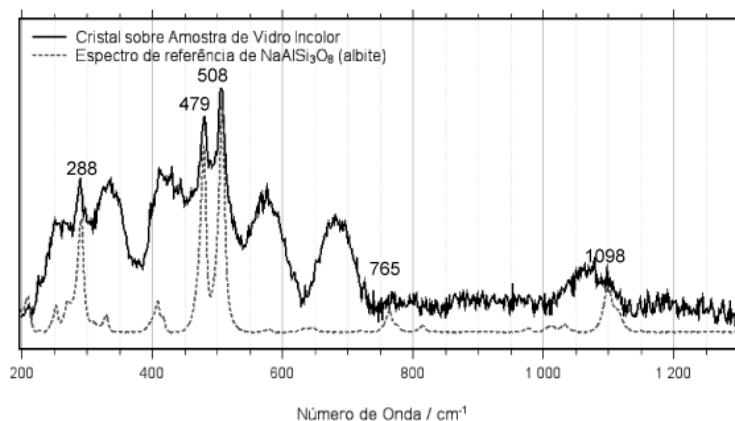


Fig. V.10: Espectro obtido por μ -Raman após t_{4,5}, sobre cristais na superfície de vidro incolor inicialmente corroído (i.c.) não inoculada e inoculada, como se ilustra no exemplo para o primeiro caso.

$t_{4,5}$ - Castanho i.c. Não Inoculado

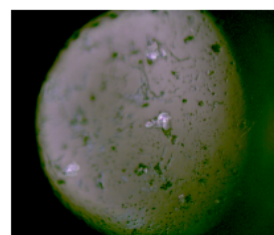
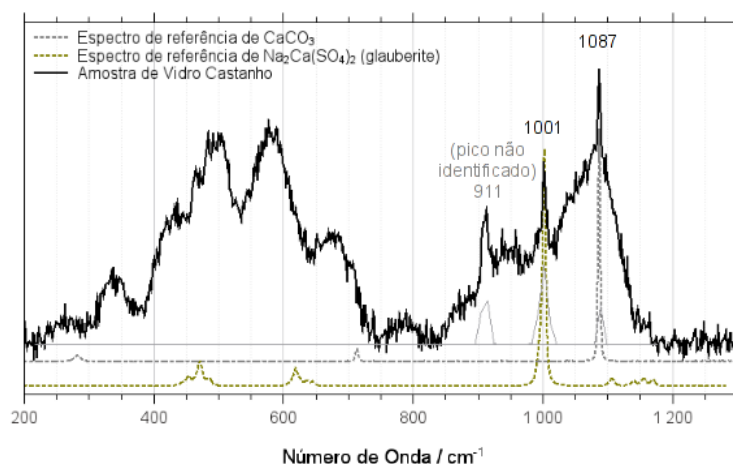


Fig. V.11: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{4,5}$, sobre superfície de vidro castanho inicialmente corroído não inoculada, onde se identificam picos potencialmente correspondentes a cristais na superfície, como ilustrado.

$t_{4,5}$ - Castanho n.c. Não Inoculado

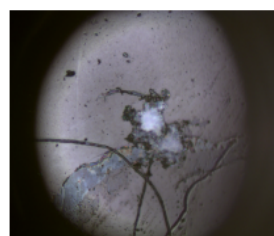
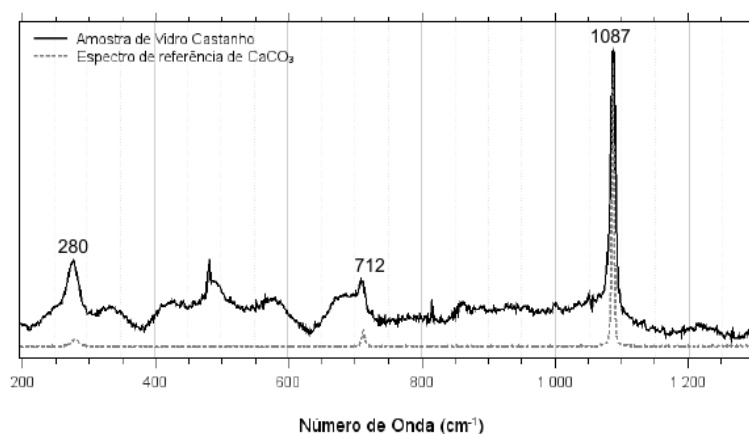


Fig. V.12: Espectro obtido por μ -Raman após $t_{4,5}$, sobre cristais em vidro castanho inicialmente não corroído (i.n.c.) não inoculado, como ilustrado. Foi também obtido para vidro incolor e púrpura inicialmente não corroído não inoculado e púrpura corroído não inoculado.

t_6

t_6 - Incolor i.c. Inoculado

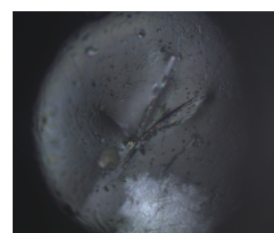
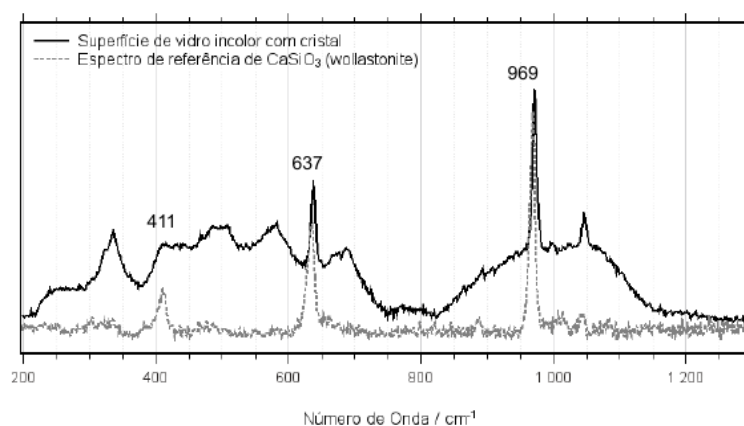


Fig. V.13: Espectro obtido por μ -Raman após t_6 , sobre formações cristalinas em vidro incolor inicialmente corroído (i.c.) não inoculado, como ilustrado.

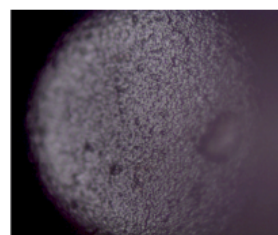
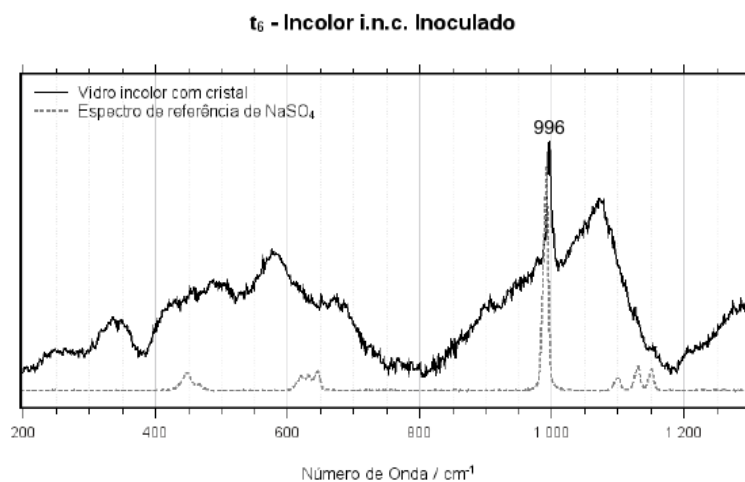


Fig. V.14: Espectro obtido por μ -Raman após t₆, sobre formações cristalinas em vidro incolor inicialmente não corroído (i.n.c.) e inoculado, como ilustrado, e no púrpura não corroído inoculado.

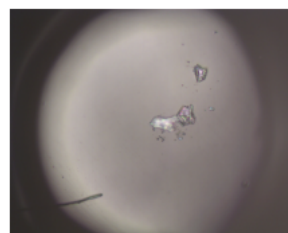
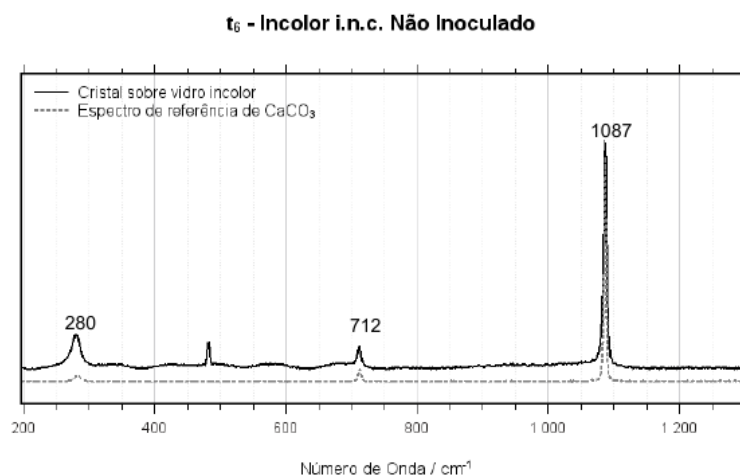


Fig. V.15: Espectro obtido por μ -Raman após t₆, sobre formações cristalinas em vidro incolor e púrpura inicialmente não corroído (i.n.c.) não inoculado, como ilustrado para o primeiro caso.

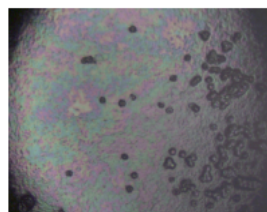
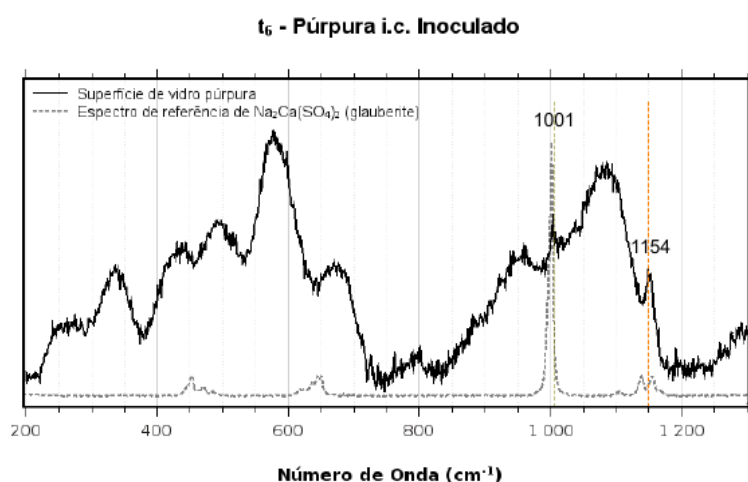


Fig. V.16: Espectro obtido por μ -Raman após t₆, sobre vidro púrpura inicialmente corroído (i.c.) inoculado, como ilustrado.

t₆ - Castanho i.c. Não Inoculado

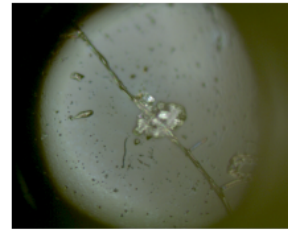
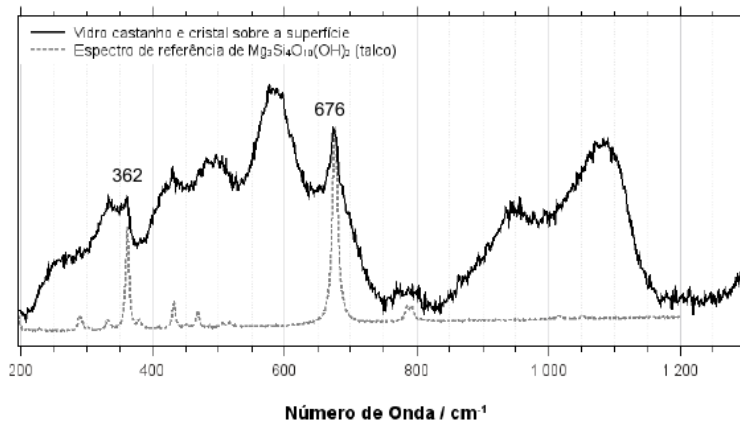


Fig. V.17: Espectro obtido por μ -Raman após t_{4,5}, sobre cristais na superfície de vidro castanho inicialmente corroído (i.c.) e não inoculado, como ilustrado.

t₆ - Castanho i.c. Inoculado

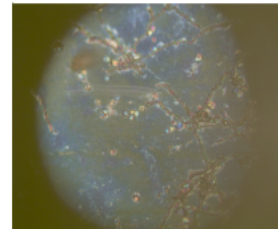
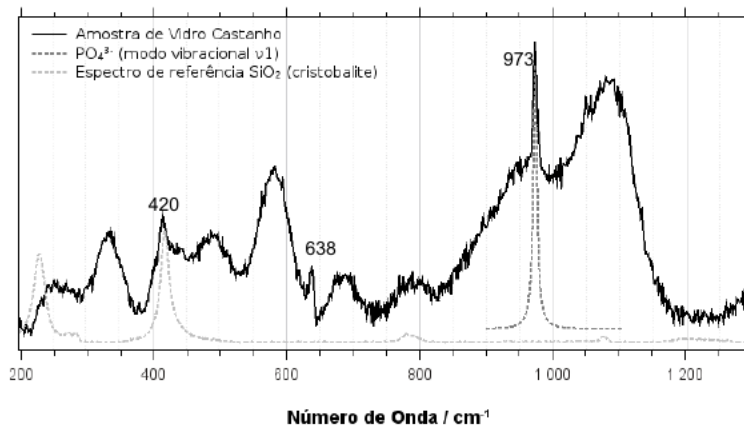


Fig. V.18: Espectro obtido por μ Raman após t₆, sobre uma das superfícies de vidro castanho, inicialmente corroído (i.c.) e inoculada, como ilustrado, onde se observa uma película superficial.

μ-FTIR

Tabela V.6 – Centros aproximados dos componentes vibracionais ν Si–O–Si e ν Si–O⁻ e correspondentes áreas dos picos, obtidos por ajustes lorentzianos.

				t₀		t_{2,5}		t_{4,5}		t₆	
				centro	área	centro	área	centro	área	centro	área
Incolor	n.corr.	Controlo	ν Si–O ⁻	909	119	908	131	907	104	900	121
			ν Si–O–Si	1014	208	1020	224	998	213	1005	223
		Inoculada	ν Si–O ⁻	–	–	941	53	902	159	908	105
			ν Si–O–Si	–	–	1023	267	1027	209	996	170
	corr.	Controlo	ν Si–O ⁻	904	106	903	107	–	–	904	120
			ν Si–O–Si	996	197	1002	229	–	–	1010	210
		Inoculada	ν Si–O ⁻	–	–	909	126	907	107	908	148
			ν Si–O–Si	–	–	1012	213	999	168	1032	214
Castanho	n.corr.	Controlo	ν Si–O ⁻	917	89	914	100	915	80	900	98
			ν Si–O–Si	998	191	1009	202	990	192	1031	236
		Inoculada	ν Si–O ⁻	–	–	912	138	918	150	918	93
			ν Si–O–Si	–	–	1046	228	1046	213	1002	198
	corr.	Controlo	ν Si–O ⁻	911	111	914	90	916	91	900	147
			ν Si–O–Si	1022	228	1003	216	1003	205	1058	221
		Inoculada	ν Si–O ⁻	–	–	906	113	915	87	916	153
			ν Si–O–Si	–	–	1040	226	1009	226	1053	247

Tabela V.7 – Razão entre as áreas dos picos, auxiliar à avaliação da variação das intensidades relativas.

Razão			t₀	t_{2,5}	t_{4,5}	t₆
Incolor	n.c.	Controlo	0,57	0,58	0,49	0,54
		Inoculada	–	0,20	0,76	0,61
	c.	Controlo	0,53	0,48	–	0,57
		Inoculada	–	0,59	0,63	0,69
Castanho	n.c.	Controlo	0,47	0,50	0,42	0,42
		Inoculada	–	0,61	0,70	0,47
	c.	Controlo	0,49	0,42	0,44	0,67
		Inoculada	–	0,50	0,38	0,62

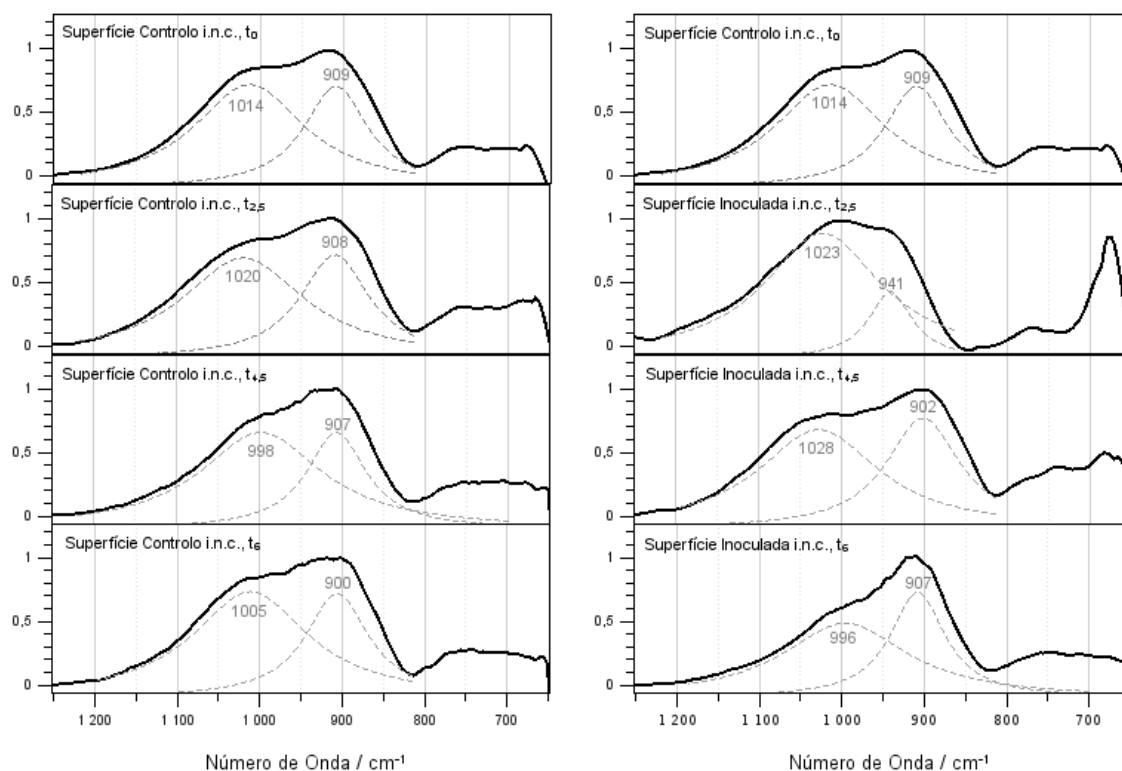


Fig. V.19: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies incolores inicialmente não corroídas (i.n.c.).

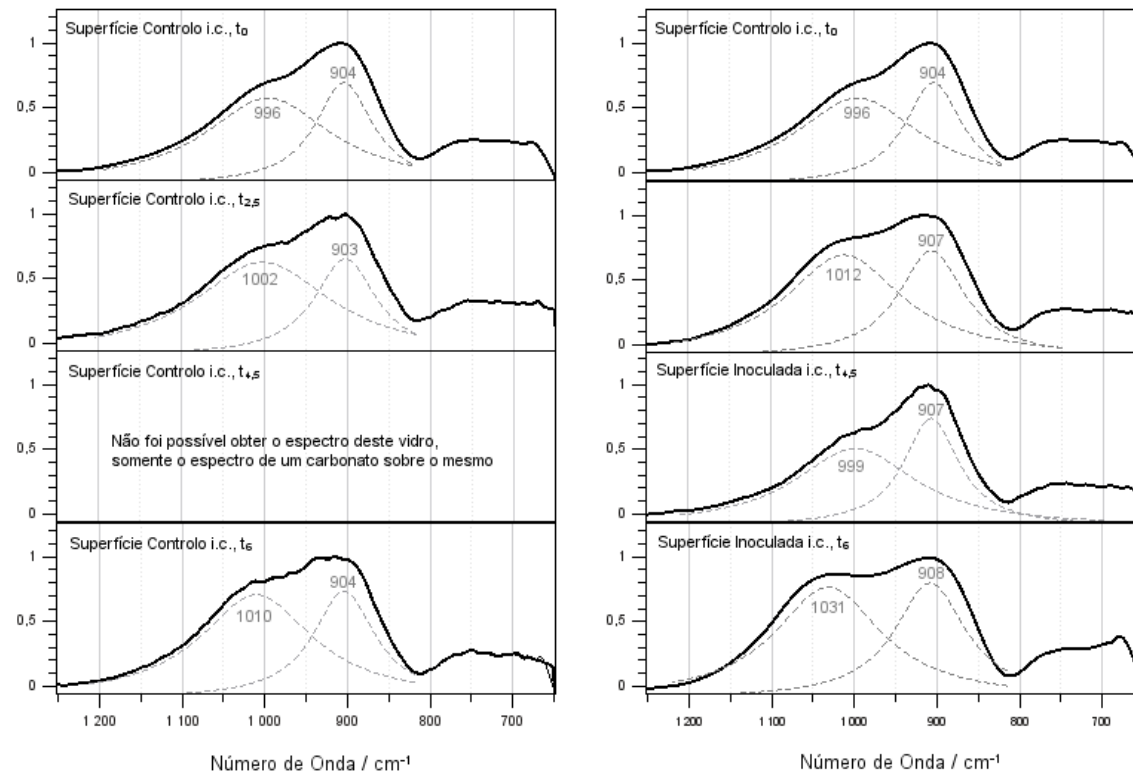


Fig. V.20: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies incolores inicialmente corroídas (i.c.).

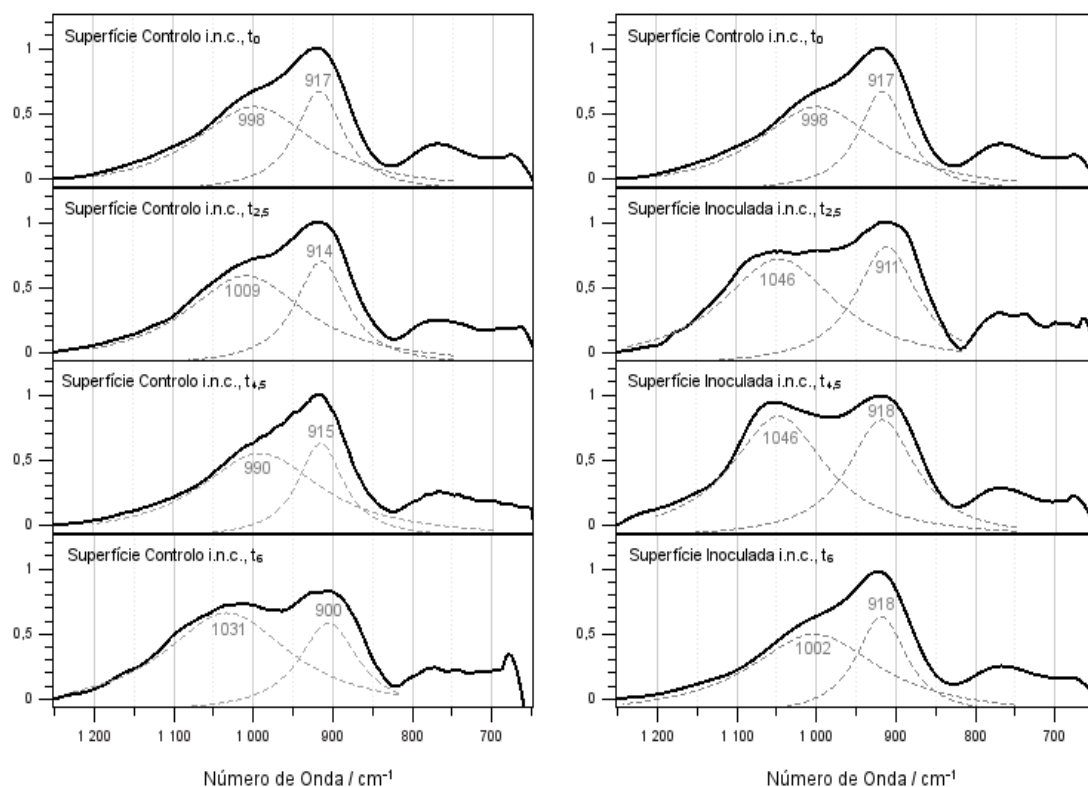


Fig. V.21: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies castanhas inicialmente não corroídas (i.n.c.).

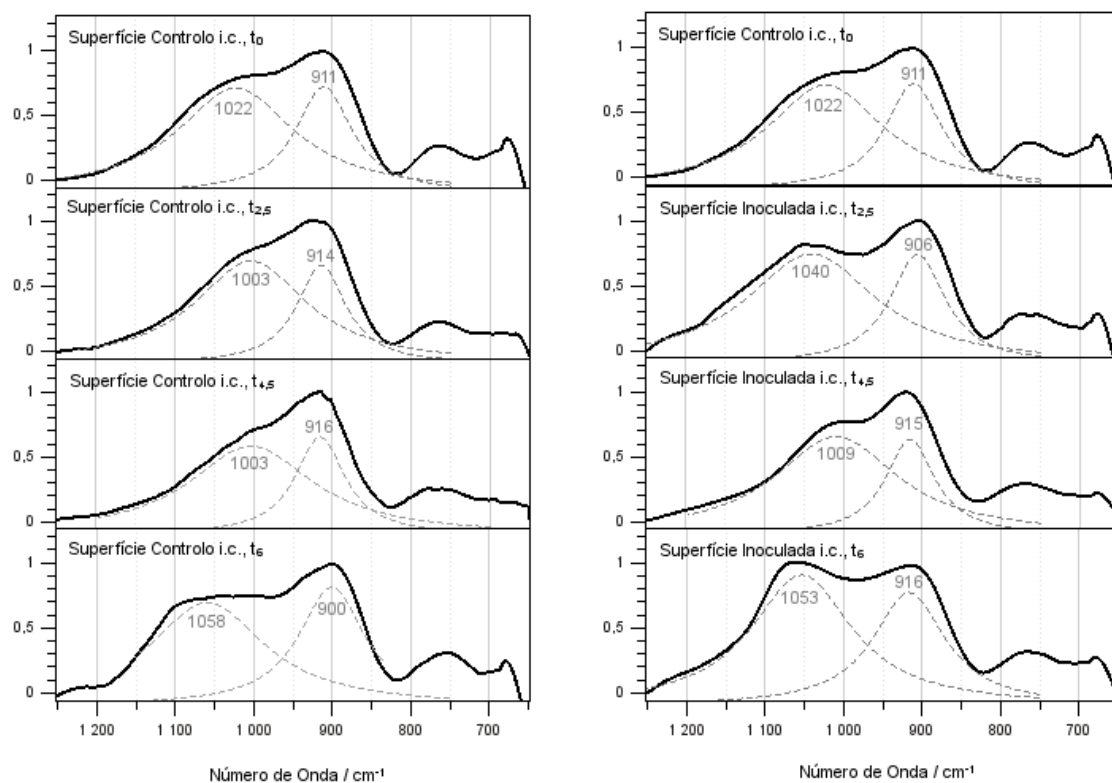


Fig. V.22: Espectro obtido por μ -FTIR para as superfícies castanhas inicialmente corroídas (i.c.).

SEM

EDS → Cristais e/ou outros Produtos sobre as superfícies

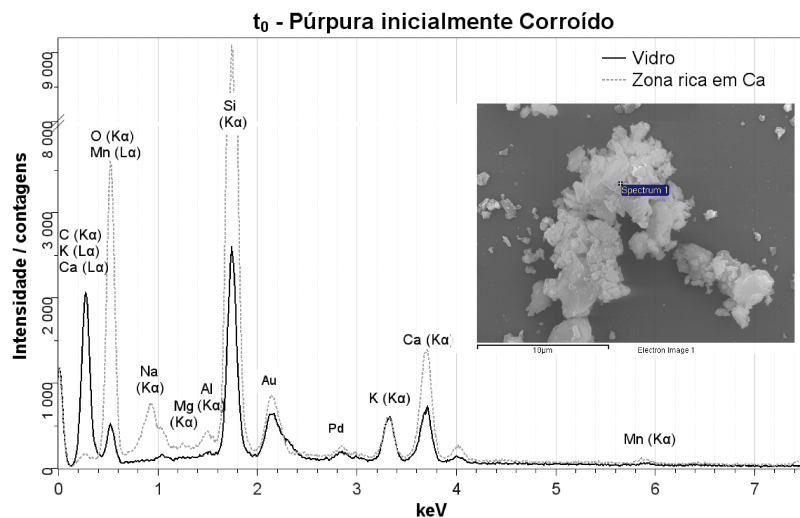


Fig. V.23: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em t₀ e a um dos aglomerados ricos em Ca sobre o mesmo.

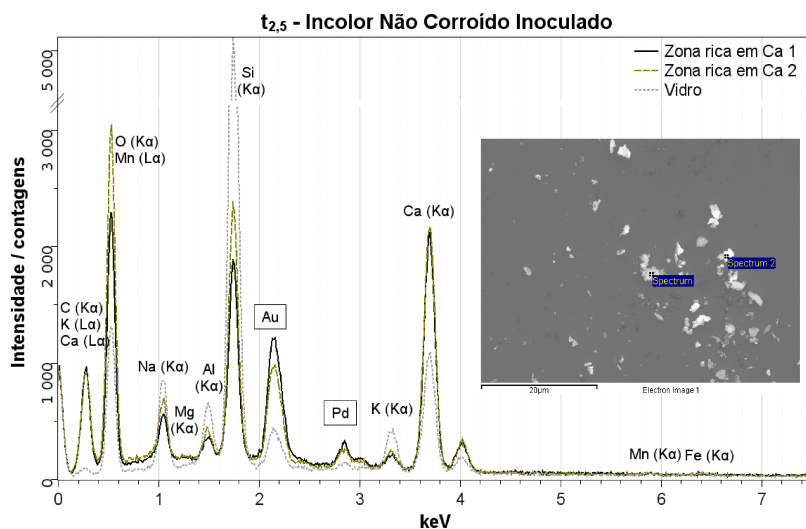


Fig. V.24: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro incolor em t_{2,5} e a dois dos aglomerados ricos em Ca sobre o mesmo.

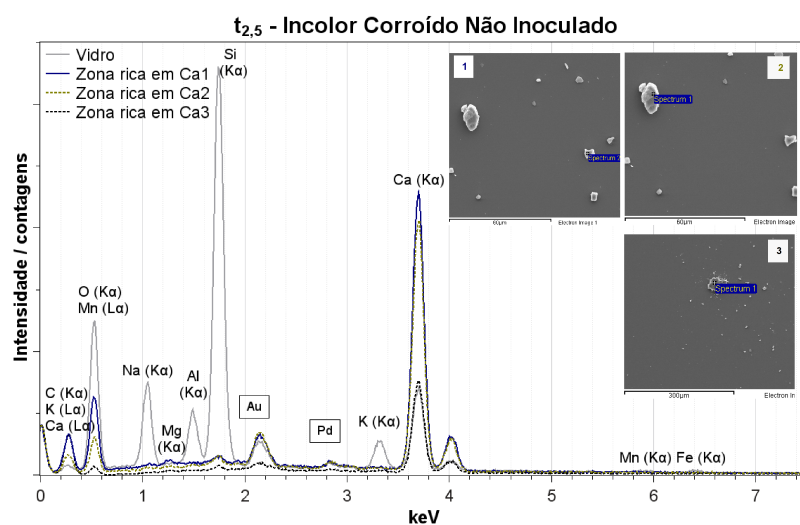


Fig. V.25: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro incolor em t_{2,5} e a dois dos aglomerados ricos em Ca e a um outro enriquecido em Na, sobre o mesmo.

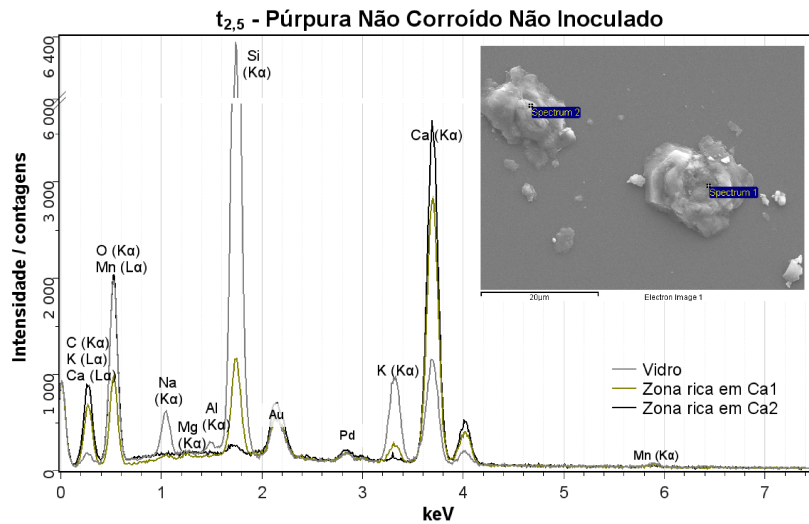


Fig. V.26: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em t_{2,5} não corroído e não inoculado, a dois dos aglomerados ricos em Ca encontrados.

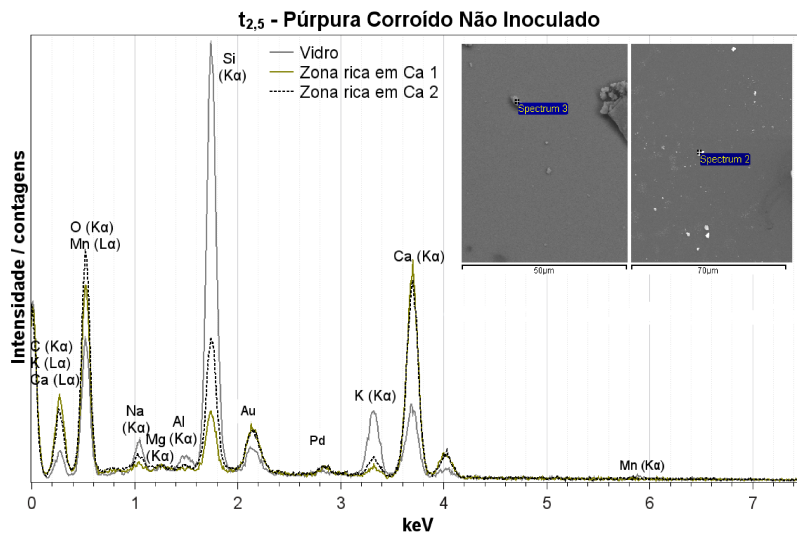


Fig. V.27: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em t_{2,5} inicialmente corroído e não inoculado que apresenta, como ilustrado, zonas enriquecidas em Ca

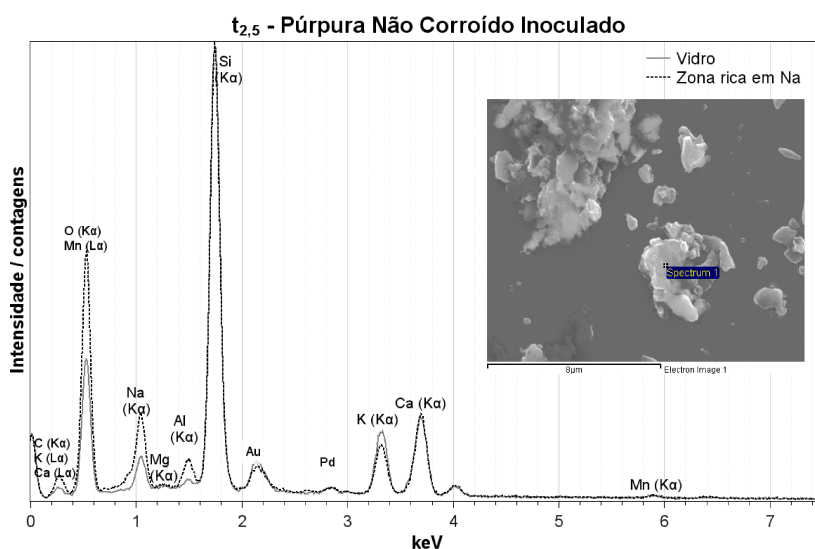


Fig. V.28: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em t_{2,5} inicialmente corroído e inoculado que apresenta, como ilustrado, estruturas enriquecidas em Na e Al.

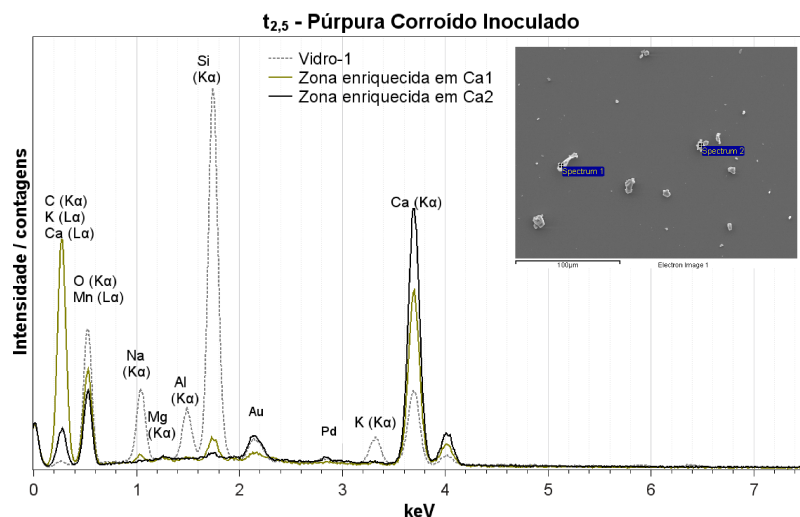


Fig. V.29: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em t_{2,5} inicialmente corroído e inoculado, a dois dos aglomerados ricos em Ca encontrados.

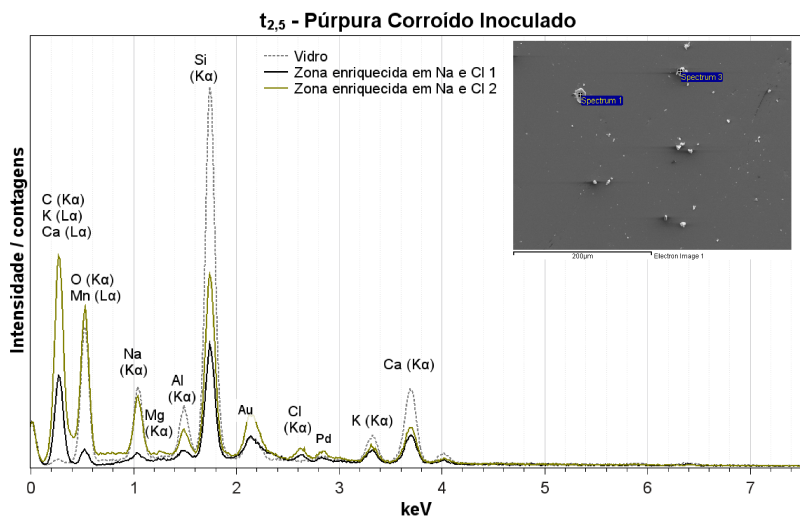


Fig. V.30: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro púrpura em t_{2,5} inicialmente corroído e inoculado, a dois dos aglomerados ricos em Na e Cl encontrados.

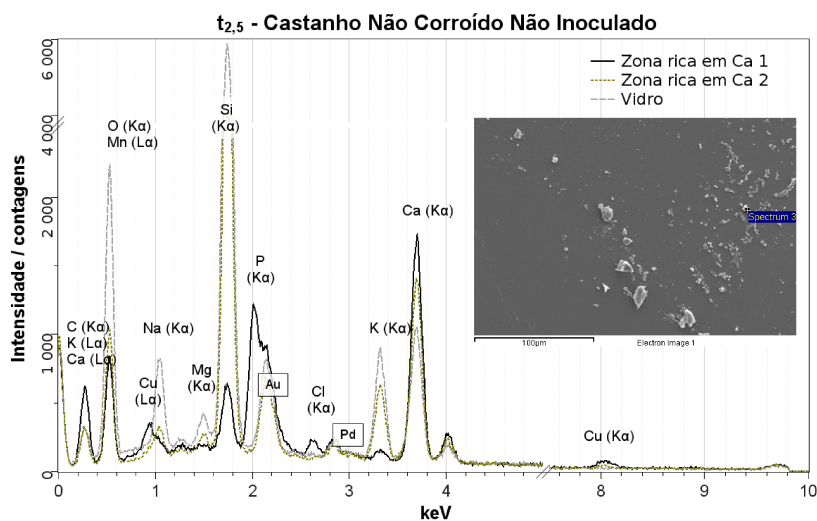


Fig. V.31: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t_{2,5} inicialmente não corroído e não inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.

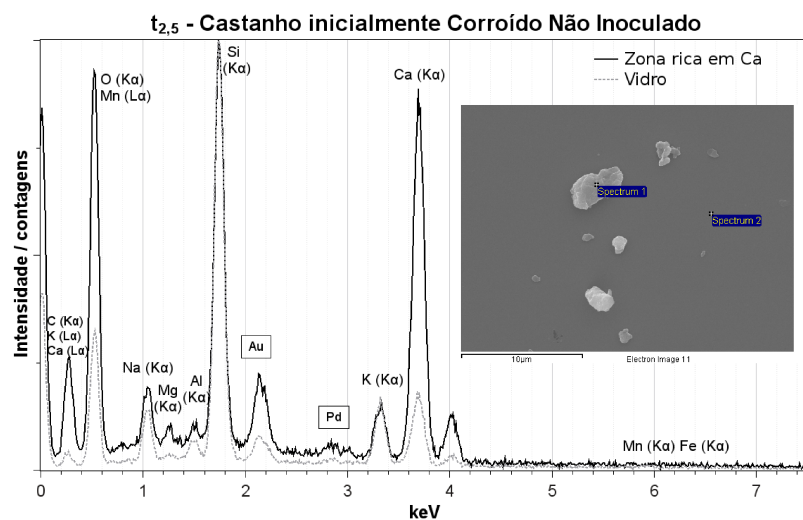


Fig. V.32: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t_{2,5} inicialmente corroído e não inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.

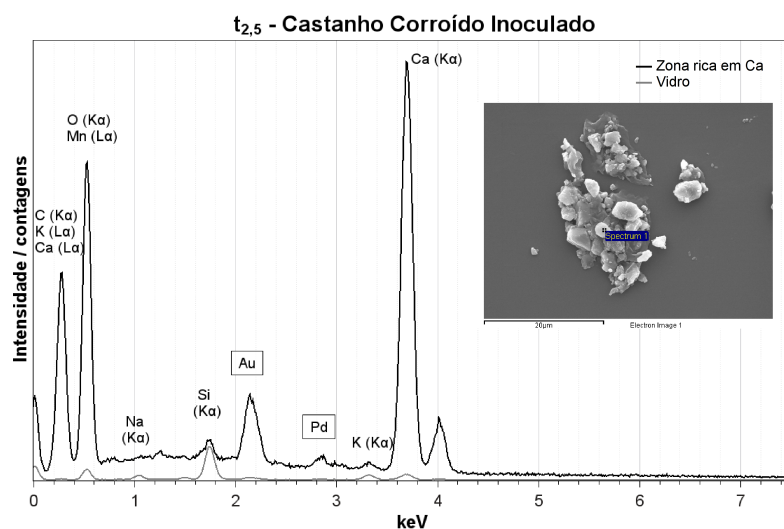


Fig. V.33: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t_{2,5} inicialmente não corroído e inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.

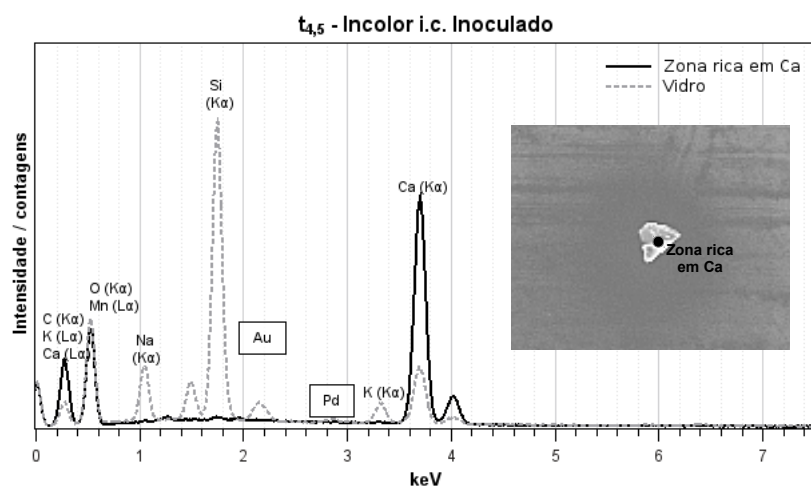


Fig. V.34: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro incolor em t_{4,5} inicialmente corroído (i.c.) e inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.

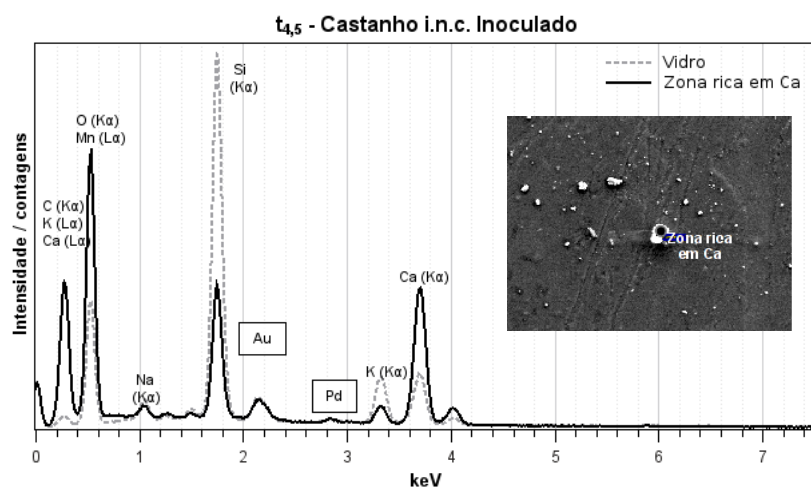


Fig. V.35: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t_{4,5} inicialmente não corroído (i.n.c.) e inoculado a uma das zonas ricas em Ca sobre o mesmo.

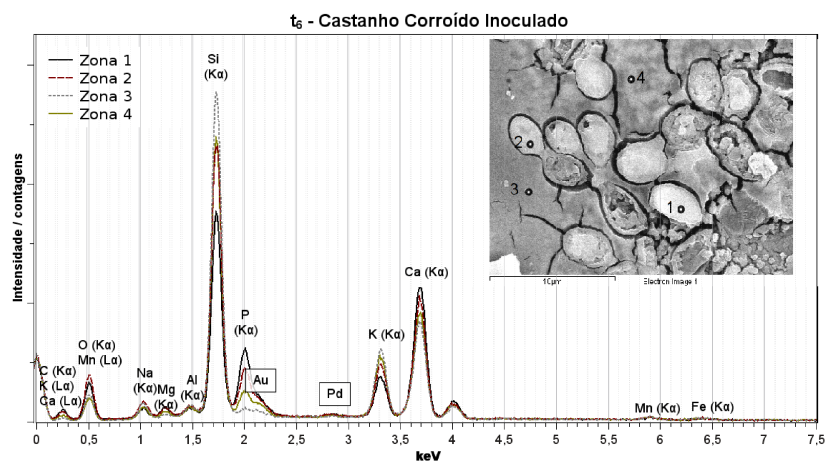


Fig. V.36: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t₆ a uma zona de alteração com clara variação das intensidades relativas de elementos como Si, Ca, K, Na e P.

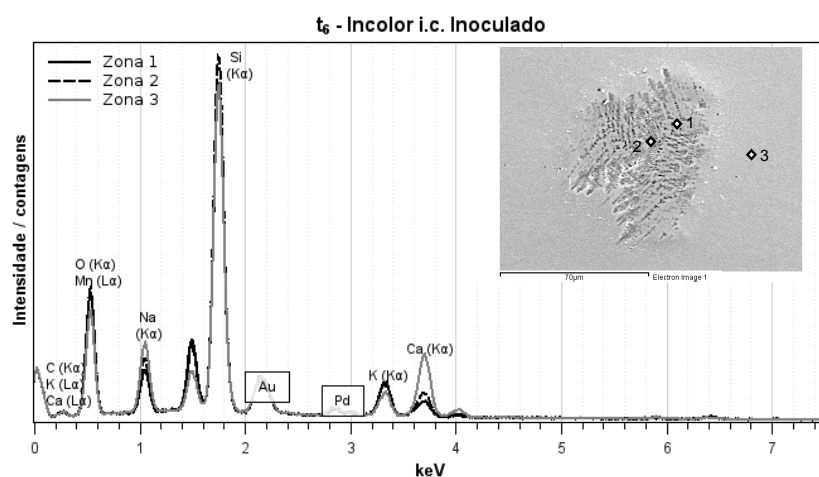


Fig. V.37: Espectro obtido das análises de SEM-EDS realizadas ao vidro castanho em t₆ a uma zona de alteração com clara variação das intensidades relativas de elementos como Si, Ca, K e Na.

EDS → Variação da composição em profundidade

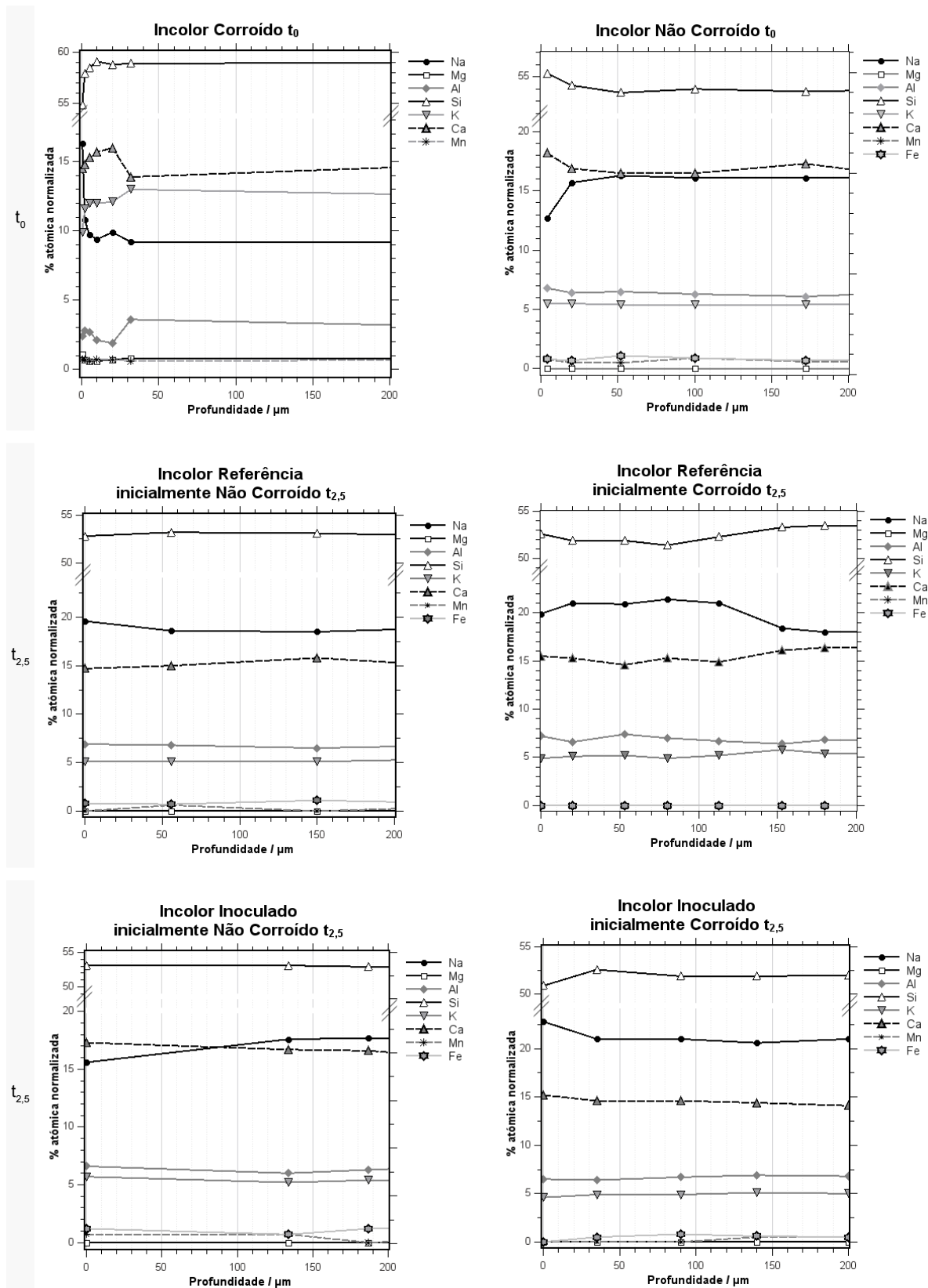


Fig. V.38: Gráficos de variação da concentração elementar do vidro incolor em função da profundidade (t_0 - $t_{2.5}$).

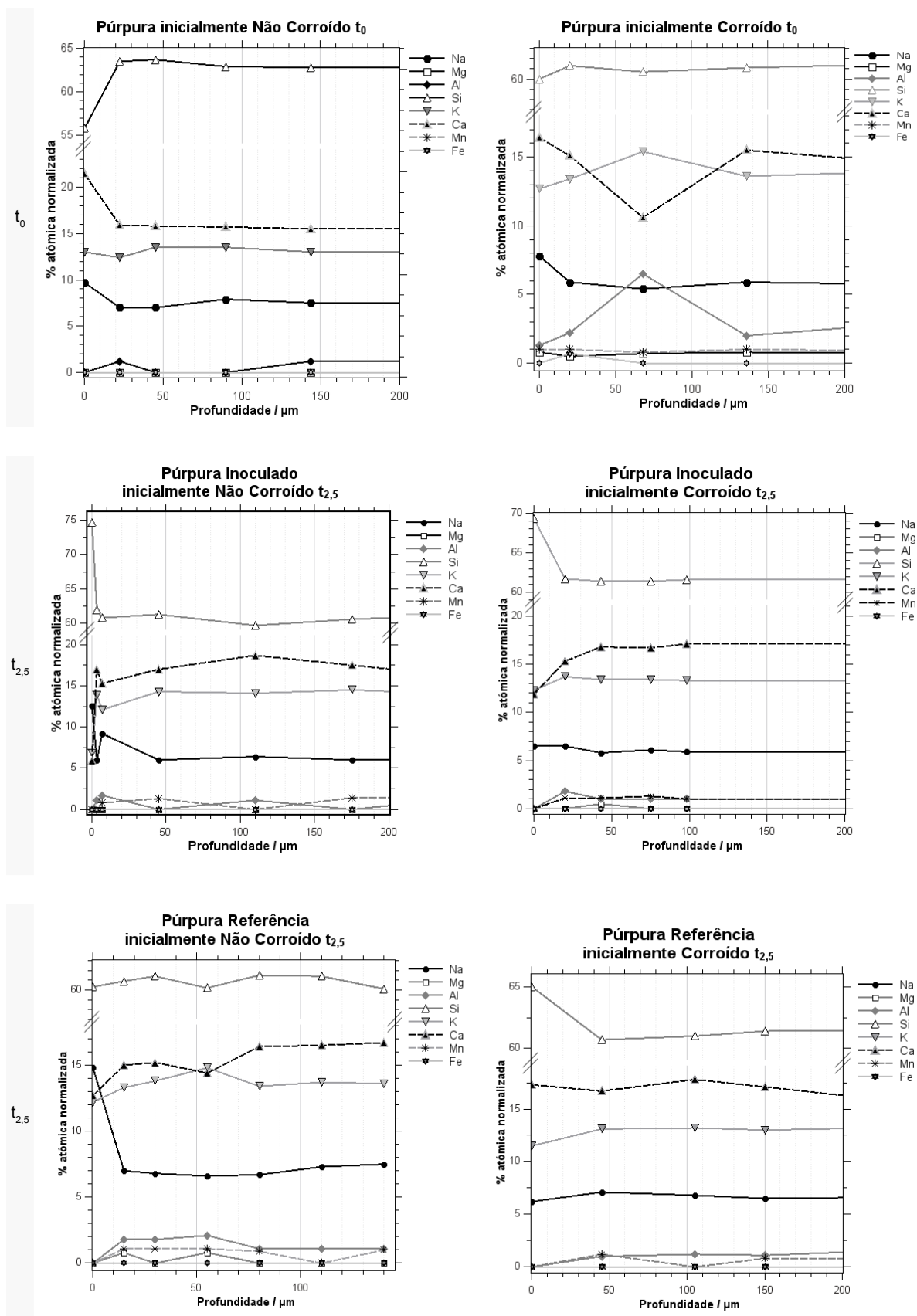


Fig. V.39: Gráficos de variação da concentração elementar do vidro púrpura em função da profundidade (t_0 - $t_{2,5}$).

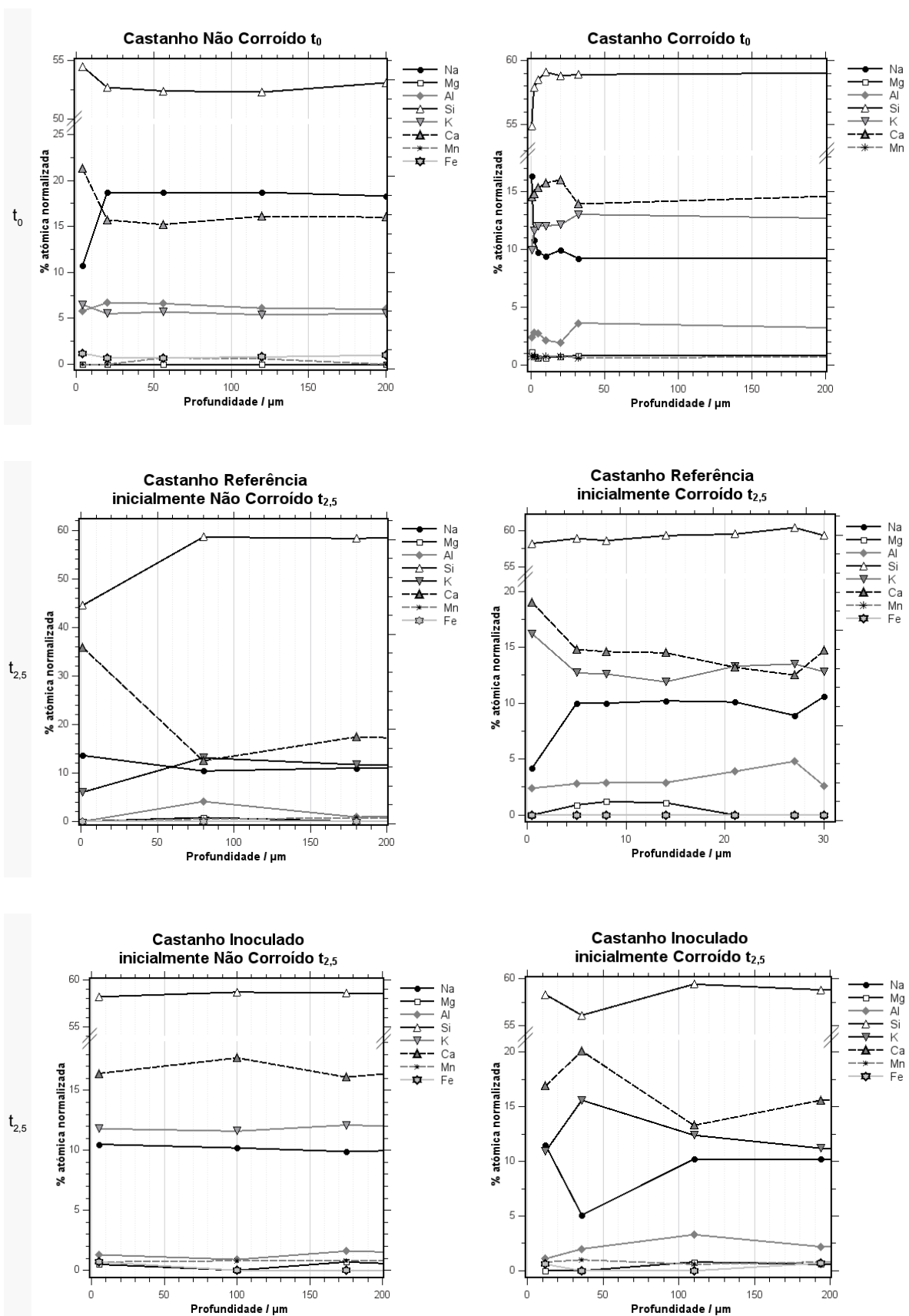


Fig. V.40: Gráficos de variação da concentração elementar do vidro castanho em função da profundidade (t_0 - $t_{2.5}$).