

Pedro Fernandes¹

Departamento de Engenharias e Ciências
Naturais, Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias
Centro de Engenharia Biológica e Química,
Instituto Superior Técnico
E-mail: pedro.fernandes@mail.ist.utl.pt

A biotecnologia na conservação do património cultural

The role of biotechnology in the preservation of cultural heritage

Resumo

O papel da biotecnologia na sociedade contemporânea está habitualmente associado às áreas da medicina e da agricultura e ao desenvolvimento de processos de produção à escala industrial, menos poluentes e tão ou mais eficientes que os processos químicos existentes.

Verificou-se recentemente que o potencial e as ferramentas da biotecnologia podem ser

aplicados com grande eficiência nas complexas tarefas associadas à conservação e restauro de obras de arte. O presente trabalho visa ilustrar os campos específicos nos quais já se estabeleceu uma eficiente interação entre arte e biotecnologia. Com efeito, a contribuição desta última para a conservação do património cultural já se efectiva ao nível de:

- Identificação de agentes biológicos causadores de degradação.
- Desenvolvimento de estratégias e ferramentas adequadas ao combate e erradicação dos agentes degradativos sem prejuízo da qualidade da obra tratada.
- Identificação por métodos de biologia molecular dos materiais de origem biológica utilizados em obras de arte.

A par das abordagens já implementadas, pretende-se ainda apresentar perspectivas de desenvolvimentos futuros desta estratégia, nomeadamente ao nível do desenvolvimento de biosensores para a monitorização e controlo do estado de preservação e restauro de obras de arte.

Palavras-chave: Património cultural, biorestauroação, biodeterioração, análise não-invasiva.

Abstract

Biotechnology is currently associated to medicine and health, to agriculture, to the development of commercial scale production processes that are less pollutant and are at least as efficient as their chemical counterparts.

Recently, however, innovative approaches evidenced the potential of biotechnological tools and know-how in the preservation of artworks, thus opening a pathway that had remain ignored hitherto, mostly due to the prejudice that science

¹ - Prof. Doutorado com bolsa de pós doutoramento pela FCT.

and art are worlds totally apart. The present work aims to contribute to the dissemination of relevant examples of recognized works, which clearly illustrate the feasibility and advantages of the overlapping of these two areas of human knowledge. Actually, a biotechnological approach has clearly demonstrated its feasibility in the following fields related to the preservation of our cultural heritage:

- Ribotyping techniques for fast and accurate identification of artworks biological degradation agents.
- Development of strategies and protocols for the preservation of artworks and eradication of biological agents, yet innocuous for the artwork itself.
- Use of molecular biology tools to identify biological raw materials used in artworks.

Along with these already well-established approaches that configure a promising expansion in the interaction of art and biotechnology, further exciting ground-breaking approaches are on the pipe-line, namely such as the development of biosensors for the monitoring and control of the preservation of artworks.

Keywords: Cultural heritage, biorestitution, biodeterioration, noninvasive analysis.

Introdução

O nosso património cultural está incorporado em matrizes de diversas origens, como sejam a pedra, a madeira, metais, papiro, pergaminho, papel ou polímeros de síntese. Todos estes materiais são passíveis de deterioração, em particular os expostos à acção de agentes ambientais. A acção da água, nas suas diferentes formas, do vento, da luz solar, os gradientes de temperatura, são factores que induzem a deterioração físico-química destes

materiais. Com o advento do desenvolvimento industrial, esta acção degradativa natural tem sido significativamente incrementada e acelerada, dado o crescente número de agentes poluentes que potenciam a acção dos processos naturais, para além de criarem novos mecanismos de deterioração. A par destes, ainda que talvez com menor destaque mediático, mas não necessariamente menor impacto, ocorre também degradação de origem biológica (Ciferri et al 2000, Warscheid e Braams 2000; Gu 2003, Cappitelli e Sorlini, 2005). A identificação destes agentes biológicos permite o desenvolvimento de estratégias eficazes para o seu combate e erradicação. Por outro lado tem-se verificado que a utilização correcta de determinados microorganismos ou enzimas pode contribuir para a protecção e restauro de obras de arte, uma estratégia relativamente desconhecida do grande público, mas que tem conhecido significativos desenvolvimentos recentemente (Ciferri et al 2000, Ramirez et al 2005). Este trabalho pretende ilustrar os aspectos mais significativos das abordagens que têm sido seguidas para implementar estas áreas, apresentando alguns casos concretos.

1. Biodeterioração do património cultural

A acção biodegradativa do património cultural deve-se essencialmente à acção de insectos, fungos e bactérias (Ramirez et al 2005). A acção de insectos, nomeadamente térmitas, na deterioração da madeira, em particular em climas tropicais, é provavelmente o exemplo mais conhecido. A actividade das térmitas é entretanto facilmente detectável, graças à sua elevada taxa de multiplicação, o que facilita o combate à infestação. Outras situações relacionadas com a colonização por insectos de crescimento mais lento, ou/e apresentando

longos períodos na forma de larva, como sucede com o escaravelho, podem ter desfechos repentinos, dado que a infestação progride de forma quase imperceptível até que ocorre a destruição súbita do objecto de madeira (Ramirez et al 2005). As condições climáticas típicas dos países tropicais, quentes e húmidas, tendem a potenciar este padrão de degenerescência. A bioterioração não se esgota todavia com os insectos, como facilmente se evidencia através da consulta da Tabela 1.

A deterioração de artigos em pedra, monumentos e edifícios, induzida pela acção de agentes biológicos é um fenómeno cujos efeitos são conhecidos, mas cujo estudo aturado apenas se iniciou recentemente (Mansch e Bock 1998, Kumar e Kumar 1999, Warscheid e Braams 2000, May 2003). Aliás, e até recentemente, considerava-se que a acção biológica ocorria subsequentemente a um processo deteriorativo desencadeado por agentes inorgânicos, os quais alteram a estrutura da rocha e fornecem os nutrientes necessários ao processo de colonização microbiana. Estudos recentes permitiram verificar que o processo de biodegradação se torna visível no período inicial de exposição da pedra à acção de agentes externos (Gaylarde e Morton 1999). A acção dos agentes biológicos evidencia-se quer pela pigmentação da pedra, pela formação de exopolissacáridos excretados pelo material celular, que se depositam e alteram a estrutura porosa da pedra e perturbam o natural escoamento de fluidos e de calor, pela formação e excreção de ácidos orgânicos e inorgânicos resultantes do metabolismo celular (ver Tabela 2) que exercem acção corrosiva, e pela sinergia entre os biofilmes formados e a deposição de poluentes atmosféricos na pedra, o que potencia o efeito destes últimos. Para além dos microorganismos, há ainda que considerar a acção de

agentes biológicos não microscópicos, tais como líquens (formados por associação entre um fungo e uma alga verde), insectos, musgos e até animais e vegetais superiores (Mansch e Bock 1998, Kumar e Kumar 1999, Warscheid e Braams 2000). Para evitar e contrariar a bioterioração da pedra foram estabelecidas estratégias, as quais são resumidamente apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Outros suportes são igualmente alvo da acção de agentes biológicos. O papiro é um material onde se registaram extensas e valiosas crónicas; infelizmente é constituído à base de celulose, e assim sendo particularmente apetecível para a colonização e degradação por fungos, que usam a celulose como fonte de carbono. O pergaminho, fabricado a partir de peles de animais é mais resistente e duradouro que o papiro, além de poder ser escrito nas duas faces. Não obstante, é igualmente passível de colonização microbiana, por bactérias e fungos que apresentem actividade degradativa de colagénio, cujas fibras constituem o principal componente do pergaminho (Zyska 1997, Cappitelli e Sorlini 2005). O papel é o material à base de celulose cuja biodeterioração se encontra mais documentada, sendo diversas as estirpes bacterianas e de fungos que proliferam à custa da deterioração do papel (Zyska 2002). Os materiais fotográficos não estão imunes ao ataque de agentes biológicos, em particular fungos, nomeadamente devido à incorporação de material de origem biológica, como a albumina e a gelatina, na constituição daqueles materiais, (Zyska 1997, Abrusci et al 2005, Cappitelli e Sorlini 2005). O crescimento de fungos foi igualmente observado em fitas magnéticas e em discos ópticos, em particular devido à presença de lecitina no primeiro destes suportes, e a despeito da composição à base de policarbonatos aromáticos destes últimos, considerada extremamente resistente e fazem

do com que os fabricantes de CD's não considerem a eventualidade da biodegradação (Zyska 1997, Cappitelli e Sorlini 2005). Esta poderá todavia verificar-se caso sejam reunidas condições ambientais tipicamente tropicais, como sejam temperaturas de 30°C e elevada humidade relativa, facto descrito por Garcia-Guinea e colaboradores (2001).

As estratégias de prevenção das contaminações biológicas passam pela conservação dos materiais em ambientes de luz, humidade e temperatura controladas. A erradicação de contaminações é feita com recurso a agentes biocidas (Zyska 1997, Zyska 2002, Cappitelli e Sorlini 2005). Todavia nem sempre estas estratégias são exequíveis, dado que gerar um ambiente controlado é dispendioso e é apenas aplicável a peças de pequenas dimensões, e o uso de biocidas pode originar efeitos adversos na matriz da obra. Existe assim a necessidade de desenvolver novas estratégias, em particular para as obras expostas ao meio ambiente, para as quais a biotecnologia pode e tem contribuído.

2. A biotecnologia na preservação e restauro de obras de arte

Feita a exposição de aspectos chave ligados à biodeterioração da herança cultural, cabe agora apresentar o reverso da medalha, ou seja, apresentar as áreas em que a biotecnologia contribui para a conservação do património cultural.

2.1. Identificação do agente de biodeterioração

A identificação do agente causador de biodeterioração é uma etapa chave para o desenvolvimento de uma estratégia visando a sua erradicação. Os métodos tradicionais de

identificação de microorganismos é feita com base na morfologia e em testes bioquímicos e de coloração. No caso de insectos, os métodos taxonómicos tradicionais são igualmente baseados na morfologia. Estes métodos são morosos, em particular quando envolvem microorganismos de crescimento lento, e a recolha de material para a identificação de insectos pode ser danosa para a obra em estudo (Ramirez et al 2005). Acresce que apenas cerca de 1% dos microorganismos pode ser identificado por métodos convencionais que envolvem plaqueamento (Pace 1996). A aplicação de novas metodologias, desenvolvidas com base nos avanços de biologia molecular e baseadas no ADN, dispensando a etapa da cultura do organismo, têm sido vindo a ser aplicadas com sucesso (Rölleke et al. 1998, Schabereiter-Gurtner et al 2001, Schabereiter-Gurtner et al 2004), eventualmente conjugadas com a metodologia tradicional (Saiz-Jimenez e Laiz 2000). A aplicação de métodos de identificação baseados nas ferramentas disponibilizadas pela biologia molecular tem sido fortemente apoiada pela UE, através do financiamento de projectos de investigação, como por ex. o projecto intitulado "Novel molecular tools for the analysis of unknown microbial communities of mural paintings and their implementation into the conservation /restoration practice", (ENV4-CT98-0705 - MICROCORE).

A tecnologia de análise de material biológico baseada no ADN tem sido igualmente utilizada para identificação de colas de origem animal ou vegetal, madeira ou pigmentos naturais utilizadas em obras de arte, o que contribui para uma melhoria das operações de restauro e de manutenção, ao facultar ao restaurador informação correcta quanto aos materiais utilizados na elaboração de cada obra em particular (Rodriguez et al 2005), facultando simulta-

neamente uma útil ferramenta no combate a mistificações e fraudes.

2.2. Os agentes biológicos como arma de defesa

O potencial de microorganismos e enzimas pode ser aproveitado no combate aos agentes de deterioração do património cultural. Um exemplo paradigmático é o uso de toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis* para eliminar uma vasta gama de insectos responsáveis pela colonização e deterioração da madeira, e actuar como agente de imunização da madeira, prevenindo assim futuras infecções (Rodriguez et al 2005). Uma estratégia mais arrojada, e que mereceu a atenção da UE através do projecto “BIOBRUSH: BIOremediation for Building Restoration of the Urban Stone Heritage, Contract No. EVK4-CT-2001-00055, 2002-2005”, reside na possibilidade de aferir as condições que permitem a utilização *in-situ* de microorganismos identificados e seleccionados, também no âmbito do mesmo projecto, para fins de bioremediação do património deteriorado, essencialmente com base na capacidade microbiana para a biomineralização, e a aferição do efeito do tratamento nos materiais processados.

2.3. Biomineralização

Por forma a obviar à acção do ambiente na deterioração da pedra recorre-se a várias estratégias, desde o recobrimento do material com uma camada sacrificial até ao uso de agentes químicos. Estes são habitualmente aplicados em baixas concentrações numa formulação integrando solventes orgânicos, do que resulta uma forte carga poluente devido à disseminação destes últimos. Uma estratégia “verde” e simultaneamente biológica, favore-

cida quando se trata de uma rocha carbonatada, consiste em recorrer à capacidade apresentada por diversos microorganismos não patogénicos de induzir a formação de depósitos de cálcio, na forma de calcite, nomeadamente *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp. e *Myxococcus* spp., formando assim o sal formado uma camada protectora da pedra (Stocks-Fischer et al 1999, Tiano et al 1999, Rodriguez-Navarro et al 2003, Rodriguez et al 2005). As bactérias são inoculadas na pedra, juntamente com nutrientes, acumulando cálcio. Uma vez esgotados os nutrientes, regista-se a morte celular, sem prejuízo da camada de calcite protectora entretanto formada. Embora já tenha sido aplicada com sucesso na recuperação de monumentos, esta abordagem carece ainda de estudos complementares e a sua aplicação pode apresentar algumas desvantagens, nomeadamente eventuais reacções entre minérios da rocha e produtos do metabolismo celular e a eventual contaminação com fungos devido à presença de nutrientes (Tiano et al 1999, Castanier et al 2000, Rodriguez et al 2005). Uma outra estratégia para induzir o processo de biomineralização consiste no uso de macromoléculas orgânicas extraídas de conchas como agente de indução da precipitação de calcite (Tiano et al 2006). A possibilidade de produzir calcite por via enzimática foi também já demonstrada, embora ainda não tenha sido aplicada ao restauro (Nemati e Voordouw 2003).

2.4. Restauro de frescos

O restauro de pinturas sobre parede é uma área em que a biotecnologia tem conhecido igualmente sucesso. A imobilização de um enzima proteolítico (Alcalase ®) numa membrana de acetato de celulose permitiu a remoção de um filme à base de caseína

depositada sobre frescos medievais que impedia a visualização das obras (Beutel et al 2002). A mesma abordagem, mas recorrendo a uma suspensão de *Pseudomonas stutzeri*, foi utilizada na recuperação de um fresco cujo tratamento químico prévio havia deixado a pintura coberta por uma camada de cola, à base de colagénio e caseína, entretanto reticulada com o formaldeído utilizado quando da tratamento. A suspensão celular permitiu a digestão daquela capa de cola endurecida, graças à adequada actividade proteolítica exibida pelo microorganismo (Antonioli et al 2005, Ranalli et al 2005).

3. Conclusões

A contribuição dos agentes biológicos na conservação do património cultural é inegavelmente significativa. Se a sua actividade degradativa é infelizmente reconhecida, as novas metodologias da biologia molecular, permitem uma identificação mais detalhada e rápida da sua origem e natureza, abrindo caminho para eficazes métodos de combate e prevenção. O desenvolvimento de biosensores, capazes de avaliar o estado de viabilidade do agente contaminante de forma não intrusiva, complementando a identificação do mesmo pelas técnicas baseadas no ADN, encontra-se em fase de implementação, perspectivando rápidos desenvolvimentos desta temática. Por outro lado, só agora começa a ser reconhecido e explorado o potencial dos microorganismos para a bioremediação da nossa herança cultural. Como corolário desta abordagem têm surgido publicações em revistas científicas demonstrativas da viabilidade do conceito, maioritariamente resultantes de trabalhos de campo, e não exclusivamente de ensaios em ambiente laboratorial. A validade do conceito é aliás sustentado pelo investimento da UE

através do financiamento de projectos de investigação de grande dimensão. Os resultados promissores configuram uma crescente expansão desta estratégia e recomendam uma estreita conjugação com abordagens de restauro e de preservação de índole físico-química. O efeito sinérgico configura igualmente possibilidades de êxito crescente na óptica da conservação do património cultural.

Agradecimentos
Pedro Fernandes agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia a atribuição da bolsa de pós doutoramento SFRH/BPD/20416/2004/401E

Tabela 1. Exemplos de bioterioração do património cultural

Biodeterioração da madeira: acção de fungos e de bactérias, sendo a acção dos primeiros mais significativa, e de insectos
Biodeterioração de papel, pergaminho, papiro, material fotográfico, fitas magnéticas, discos ópticos: acção de bactérias, insectos e fungos, com forte incidência destes
Bioterioração da pedra: algas, fungos, bactérias, cianobactérias, líquens (associação entre fungo e cianobactéria), insectos, musgos e vegetais superiores

Tabela 2. Tipos de organismos influentes na biodegradação da pedra.

Organismos fotolitotróficos: usam CO₂ atmosférico e obtêm energia da luz solar (algas e cianobactérias). Constituem a primeira etapa da colonização biológica da pedra, construindo um biofilme protector.
Organismos quimiorganotrófico: obtêm energia através do consumo de moléculas orgânicas, libertam ácidos orgânicos, cítrico, fumárico, glucónico,

oxálico, oxo-glucónico, oxo-glutárico, bem com ácido carbónico (inorgânico) resultante da respiração. Acção quelante sobre catiões Al, Ca, Fe, Mg, Mn, Si, dos minerais, formando complexos estáveis. Oxidação de Fe e Mn.

Organismos quimiolitotróficos: usam CO₂ atmosférico como fonte de carbono e compostos inorgânicos (enxofre, ferro, sulfureto de hidrogénio, amónia) como fonte de energia através da oxidação destes. Libertação de ácidos nítrico (*Nitrobacter* spp.), nitroso (*Nitrosomonas* spp.), sulfúrico (*Thiobacillus* spp.)

Tabela 3. Estratégias de prevenção dabiodegradação da pedra.

Redução do teor de humidade. O uso de agentes hidrofóbicas pode constituir uma fonte de carbono criando condições para o crescimento de microorganismos. Optimização de sistemas de drenagem

Uso de biocidas. Amónias quaternárias, eficientes mas podendo deixar depósitos. Compostos contendo estanho, eficazes mas susceptíveis à acção de radiação UV e apresentando carga poluente para o ambiente. Ester etílico do ácido p-hydroxi-benzoico.

Irradiação UV ou ionizante, fumigação (aoplicável em objectos de pequenas dimensões e/ou passíveis de serem transportados)

Tabela 4. Metodologias para limpeza de pedra (adaptado de Warscheid e Braams 2000)

Lavagem com água da superfície contaminada. Soluciona o problema a curto prazo, mas a longo prazo favorece e incrementa a disseminação de agentes biológicos devido à humidade acumulada

Tratamento com lixívias (hipocloritos). Erradica os micoorganismos mas aumenta o teor de sais na

pedra. Outros agentes de lixiviação, como o peróxido de hidrogénio, cloro ou cloramina são desaconselhados por poderem promover reacções de oxidação indesejadas com metais presentes no mineral.

Tratamento com uma mistura de sulfureto de hidrogénio, na presença de bicarbonato de sódio ou de amónio, tendo uma amónia quaternária como agente biocida.

Bibliografia

Abrusci C, Martín-González A, Del Amo A, Catalina F, Collado J, Platas G (2005) Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56: 58–68.

Paolo Antonioli / Giacomo Zapparoli / Pamela Abbruscato / Claudia Sorlini / Giancarlo Ranalli / Pier Giorgio Righetti (2005) Art-loving bugs: the resurrection of Spinello Aretino from Pisa's cemetery. *Proteomics* 5: 2453-2459.

Beutel S, Klein K, Knobbe G, Konigfeld P, Petersen K, Ulber R, Scheper T (2002) Controlled enzymatic removal of damaging casein layers on medieval wall paintings. *Biotechnol Bioeng* 80:13-21.

Cappitelli F, Sorlini C (2005) From papyrus to compact disc: the microbial deterioration of documentary heritage. *Critical Rev. Microbiol.* 31:1–10.

Castanier S, Le Metayer-Levrel G, Orial G, Loubier JF, Perthuisot JP (2000) Bacterial carbonatogenesis and applications to preservation and restoration of historic property. In: *Of Microbes and Art. The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. O. Ciferri, P. Tiano, G. Mastromei (eds.), Kluwer Academic-Plenum Publisher, New York, pp. 203-218.

Ciferri O, Tiano P, Mastromei G (eds) (2000) *Of microbes and art: the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage*. Springer, New York, 2000.

Garcia-Guinea J, Cárdenes V, Martínez AT, Martínez M (2001) Fungal bioturbation paths in a compact disk. *Naturwissenschaften*. 88: 351-354.

Gaylarde, C.C., Morton, L.H.G., 1999. Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review. *Biofouling* 14: 59-74.

Kumar R, Kumar AV (1999) Biodeterioration of stone in tropical environments: an overview. *The Getty Conservation*

Institute, Los Angeles.

Mansch R, Bock E (1998) Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* 9: 47-64.

May E (2003) Microbes on building stone – for good or ill? *Culture* 24:5-8.

Gu J-D (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52: 69–91.

Nemati M, Voordouw G (2003) Modification of porous media permeability, using calcium carbonate produced enzymatically in situ. *Enzyme Microb Technol* 33: 635–642.

Pace NR (1996) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 62: 463-469.

Ramírez JL, Santana MA, Galindo-Castro I, Gonzalez A (2005) The role of biotechnology in art preservation. *Tibtech* 23: 584-588.

Rodriguez-Navarro C, Rodriguez-Gallego M, Chekroun KB, Gonzalez-Munoz MT (2003) Conservation of Ornamental Stone by *Myxococcus xanthus*-Induced Carbonate Biomineralization. *Appl Environment Microbiol* 69: 2182–2193.

Rolleke, S. / Witte, A. / Wanner, G. / Lubitz, W. (1998) Medieval wall paintings—a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA in a medieval wall painting. *International Biodeterioration & Biodegradation* 41: 85-92

Saiz-Jimenez C, Laiz L (2000) Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 319-326

Schabereiter-Gurtner C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S (2001) Analysis of fungal communities on historical church window glass by denaturing gradient gel electrophoresis and phylogenetic 18S rDNA sequence analysis. *J Microbiol Methods* 47: 345-354.

Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñara G, Lubitz W, Rölleke S (2004) Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma). *FEMS Microbiol Ecol* 47: 235-247

Stocks-Fischer S, Galinat JK, Bang SS (1999) Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biol Biochem* 31: 1563-1571.

Tiano P, Biagiotti L, Mastromei G (1999) Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *J Microbiol Methods* 36: 139–145

Tiano P, Cantisani E, Sutherland I, Paget JM (2006) Biomediated reinforcement of weathered calcareous stones. *J Cultural Heritage* 7: 49–55.

Warscheid T, Braams J (2000) Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46: 343-368.

Zyska BJ (1997) Fungi Isolated from Library Materials: A Review of the Literature. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40: 43-51.

Zyska BJ (2002) Problems of microbial deterioration of materials in Eastern Europe. *International Biodeterioration & Biodegradation* 49: 73-83.