



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Envelhecimento artificial de papel por metais e microrganismos e sua caracterização por técnicas analíticas

Cátia Sofia Mira Relvas

Orientação: Professora Doutora Teresa Ferreira

Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Conservadora-restauradora Francisca Figueira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Envelhecimento artificial de papel por metais e microrganismos e sua caracterização por técnicas analíticas

Cátia Sofia Mira Relvas

Orientação: Professora Doutora Teresa Ferreira

Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Conservadora-restauradora Francisca Figueira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Prof. Dra. Teresa Ferreira pela excelente orientação, por todo o apoio, compreensão e disponibilidade demonstrado e pelas palavras de ânimo que sempre me transmitiu. Agradeço também à minha co-orientadora Prof. Dra. Ana Teresa Caldeira que sempre se mostrou disponível na realização deste projeto, pela ajuda e pelas palavras de ânimo. Quero deixar um muito obrigada à Dra. Francisca Figueira, igualmente minha co-orientadora, e à Dra. Joana Campelo pela ajuda na seleção de amostras e disponibilização das mesmas, assim como na disponibilidade demonstrada ao longo de todo o trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Biotecnologia, à Dona Helena, Dona Esperança, Tânia Rosado, Cátia Salvador, Mara Silva, um muito obrigada, assim como a todos os que trabalham no Laboratório Hercules e que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar. Obrigada também ao Prof. Dr. António Candeias pela sua disponibilidade.

Agradeço ao Laboratório de conservação e restauro José de Figueiredo, em especial à Dra. Maria José Oliveira.

Um muito obrigada à Margarida Nunes, que foi minha colega de estágio, pela força, paciência e compreensão, mas acima de tudo porque demonstrou ser uma grande amiga e que esteve sempre presente quando precisei.

Agradeço à Juliana Agostinho pela sua amizade e pelas palavras de otimismo. À Camilla Maia que sempre se demonstrou disponível para me ajudar.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, à minha irmã, à minha avó e a toda a minha família, em especial ao meu namorado Flávio, pela paciência que teve comigo, pelas palavras de força e ânimo e especialmente por não me deixar desistir.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

Agradecimentos	i
Índice geral	iii
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	xiii
Índice de abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
Caracterização do problema	xxi
Objetivos do trabalho	xxiii
1. Introdução	1
1.1. Breve história do papel	3
1.2. Composição do papel	5
1.2.1. Celulose, hemicelulose e lenhina	6
1.2.2. As cargas minerais	10
1.2.3. A encolagem	11
1.3. Degradação de papel	12
1.3.1. Degradação enzimática da celulose	14
1.3.2. <i>Foxing</i>	16
1.4. Técnicas de caracterização	18
1.4.1. Microscopia ótica	18
1.4.2. Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta/visível (UV/VIS)	19
1.4.3. Análise colorimétrica	20
1.4.4. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS)	22

1.4.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (FT-IR-ATR)	23
2. Metodologia	25
2.1. Estratégia adotada	27
2.2. Diagrama de trabalho	29
2.3. Procedimento experimental	30
2.3.1. Seleção de papéis contendo <i>foxing</i>	30
2.3.2. Estudo microbiológico dos papéis P1 a P8	31
2.3.2.1. Caracterização microbiológica	31
2.3.2.2. Isolamento microbiano	31
2.3.2.3. Identificação microbiana	32
2.3.2.4. Avaliação da atividade celulolítica	32
2.4. Seleção de papéis contemporâneos	34
2.5. Indução de manchas de <i>foxing</i>	35
2.6. Técnicas de análise	35
2.6.1. Microscopia ótica	35
2.6.2. Análise colorimétrica	36
2.6.3. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-x por dispersão em energias (MEV-EDS)	37
2.6.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (FT-IR-ATR)	38
2.6.5. Espectroscopia de absorção molecular no UV/VIS	38
3. Resultados e discussão	41
3.1. Caracterização microbiológica	43

3.1.1. Isolamento e identificação das estirpes fúngicas	45
3.1.2. Avaliação da atividade celulolítica	46
3.2. Indução de manchas de <i>foxing</i> em papéis contemporâneos	49
3.3. Caracterização química e morfológica de papéis contemporâneos e manchas de <i>foxing</i> artificialmente induzidas	55
3.3.1. Análise colorimétrica	55
3.4. Caracterização de papéis contemporâneos por microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia	63
3.5. Caracterização de papel por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	70
4. Comentários finais e perspectivas futuras	83
5. Referências bibliográficas	87
6. Anexos	95

1. Introdução

Fig. 1.1. Estrutura química da celulose	6
Fig. 1.2. Regiões cristalinas e amorfas que compõem a estrutura das microfibrilas	7
Fig. 1.3. Representação esquemática da hemicelulose	8
Fig. 1.4. Estrutura química da lenhina	9
Fig. 1.5. Álcoois ρ -cumarílico, sinapílico e coniferílico, respectivamente, da esquerda para a direita	10
Fig. 1.6. Diagrama esquemático representando a degradação enzimática da celulose	16
Fig. 1.7. Representação tridimensional do espaço de cor CIELAB 1976	21

2. Metodologia

Fig. 2.1. Culturas mistas	31
Fig. 2.2. a) lupa binocular; b) microscópio ótico	36
Fig. 2.3. Colorímetro	36
Fig. 2.4. Microscópio eletrônico de varrimento com detetor de EDS	37
Fig. 2.5. Espectrómetro de IV com módulo de refletância total atenuada	38
Fig. 2.6. Espectrofotômetro de absorção molecular no UV/VIS	39
Fig. 2.7. Leitor de microplacas	39

3. Resultados e discussão

- Fig. 3.1.** Atividade celulolítica específica de culturas em meio Mandels de a) 47
Penicillium sp1; b) *Penicillium* sp2; c) *Penicillium* sp3; d) *Penicillium* sp4; e)
Trichoderma harzianum CCMI 783. Letras diferentes indicam diferenças
significativas ($p < 0,05$)
- Fig. 3.2.** Atividade celulolítica específica de culturas em meio BCSL de a) 48
Penicillium sp1; b) *Penicillium* sp2; c) *Penicillium* sp3; d) *Penicillium* sp4; e)
Trichoderma harzianum CCMI 783. Letras diferentes indicam diferenças
significativas ($p < 0,05$)
- Fig. 3.3.** Variação da cromaticidade do papel para aguarela envelhecido e não 56
envelhecido, com manchas induzidas por ião a) Fe^{2+} e b) Cu^{2+}
- Fig. 3.4.** Variação da cromaticidade da cartolina duplex envelhecida e não 57
envelhecida, com manchas induzidas por ião a) Fe^{2+} e b) Cu^{2+}
- Fig. 3.5.** Variação da cromaticidade do papel para gravura envelhecida e não 57
envelhecida, com manchas induzidas por ião a) Fe^{2+} e b) Cu^{2+}
- Fig. 3.6.** Variação da cromaticidade do cartão madeira envelhecida e não 58
envelhecida, com manchas induzidas por ião a) Fe^{2+} e b) Cu^{2+}
- Fig. 3.7.** Variação da cromaticidade do papel para aguarela com manchas 59
induzidas por culturas mistas de fungos em papel a) natural e b) envelhecido
- Fig. 3.8.** Variação da cromaticidade da cartolina duplex com manchas induzidas 59
pela CM4 em papel a) natural e b) envelhecido
- Fig. 3.9.** Variação da cromaticidade do papel para gravura com manchas induzidas 59
pela CM4 em papel a) natural e b) envelhecido
- Fig. 3.10.** Variação da cromaticidade do cartão madeira com manchas induzidas 59
pela CM4 em papel a) natural e b) envelhecido

Fig. 3.11. Variação da cromaância do papel para aguarela com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido da CM4 e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4	61
Fig. 3.12. Variação da cromaância da cartolina duplex com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido de culturas mistas de fungos e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4	61
Fig. 3.13. Variação da cromaância do papel para gravura com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido de culturas mistas de fungos e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4	62
Fig. 3.14. Variação da cromaância do cartão madeira com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido de culturas mistas de fungos e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4	62
Fig. 3.15. a) imagem de MEV evidenciando a utilização de diatomito; b) mapa de EDS da zona da imagem anterior, onde se observa a distribuição de Ca, Si e C; c) análise composicional (EDS) da partícula indicada em a)	64
Fig. 3.16. Imagem de microscopia ótica (esquerda) e imagem de MEV (direita) evidenciando fungos inoculados a partir da cultura mista CM5	65
Fig. 3.17. Imagem de MEV e análise por EDS da face branca da cartolina duplex	65
Fig. 3.18. Imagens de MEV evidenciando fungos inoculados a partir da cultura mista CM6	66
Fig. 3.19. Imagem de MEV e análise por EDS do papel para gravura	67
Fig. 3.20. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas ricas em Al, Si e Fe	67
Fig. 3.21. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas contendo Ca e S	68
Fig. 3.22. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas ricas em Ca e S	68
Fig. 3.23. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas ricas em Al, Si e Ca	69
Fig. 3.24. Imagem de MEV e análise por EDS do cartão madeira de partículas	69

ricas em cálcio

Fig. 3.25. Espectro de FT-IR-ATR do papel para aguarela natural (não modificado) e na zona de manchas induzidas por CM4 72

Fig. 3.26. Espetros de FT-IR-ATR obtidos com o papel para aguarela nas seguintes condições: a) papel natural (controlo) e papel envelhecido (controlo envelhecido); b) papel com CM4, natural, com ião Fe^{2+} e com ião Cu^{2+} na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; c) papel natural com ião Fe^{2+} em duas concentrações; d) papel envelhecido com ião Fe^{2+} em duas concentrações; e) papel natural com ião Cu^{2+} em duas concentrações; f) papel envelhecido com ião Cu^{2+} em duas concentrações; g) papel com ião Fe^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Fe^{2+} e CM4; h) papel com ião Cu^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Cu^{2+} e CM4 73

Fig. 3.27. Espectros de FT-IR-ATR da cartolina duplex (natural) e na zona de manchas induzidas por CM4 na face da frente (branca) 74

Fig. 3.28. Espetros de FT-IR-ATR das faces da frente e do verso da cartolina duplex 75

Fig. 3.29. Espetros de FT-IR-ATR obtidos com a cartolina duplex nas seguintes condições: a) papel natural (controlo) e papel envelhecido (controlo envelhecido); b) papel com CM4, natural, com ião Fe^{2+} e com ião Cu^{2+} na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; c) papel natural com ião Fe^{2+} em duas concentrações; d) papel envelhecido com ião Fe^{2+} em duas concentrações; e) papel natural com ião Cu^{2+} em duas concentrações; f) papel envelhecido com ião Cu^{2+} em duas concentrações; g) papel com ião Fe^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Fe^{2+} e CM4; h) papel com ião Cu^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Cu^{2+} e CM4 76

Fig. 3.30. Espectros de FT-IR-ATR do papel para gravura natural e na zona de manchas induzidas por CM4 77

Fig. 3.31. Espectros de FT-IR-ATR obtidos com o papel para gravura nas seguintes condições: a) papel natural (controlo) e papel envelhecido (controlo envelhecido); b) papel com CM4, natural, com ião Fe^{2+} e com ião Cu^{2+} na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; c) papel natural com ião Fe^{2+} em duas concentrações; d) papel envelhecido com ião Fe^{2+} em duas concentrações; e) papel natural com ião Cu^{2+} em duas concentrações; f) papel envelhecido com ião Cu^{2+} em duas concentrações; g) papel com ião Fe^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Fe^{2+} e CM4; h) papel com ião Cu^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Cu^{2+} e CM4 79

Fig. 3.32. Espectros de FT-IR-ATR do cartão madeira natural e na zona de manchas induzidas por CM4 80

Fig. 3.33. Espectros de FT-IR-ATR obtidos com o cartão madeira nas seguintes condições: a) papel natural (controlo) e papel envelhecido (controlo envelhecido); b) papel com CM4, natural, com ião Fe^{2+} e com ião Cu^{2+} na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; c) papel natural com ião Fe^{2+} em duas concentrações; d) papel envelhecido com ião Fe^{2+} em duas concentrações; e) papel natural com ião Cu^{2+} em duas concentrações; f) papel envelhecido com ião Cu^{2+} em duas concentrações; g) papel com ião Fe^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Fe^{2+} e CM4; h) papel com ião Cu^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Cu^{2+} e CM4 82

2. Metodologia

Tabela 2.1. Descrição dos papéis P1 a P8 contendo <i>foxing</i> natural	30
Tabela 2.2. Imagens de microscopia ótica e descrição dos quatro papéis	34

3. Resultados e discussão

Tabela 3.1. Imagens fotográficas de crescimento fúngico referente às amostras de papel contendo <i>foxing</i> , P1 a P8	44
Tabela 3.2. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas F _I a F _{IV}	45
Tabela 3.3. Manchas de <i>foxing</i> induzidas em papel para aguarela. Utilizou-se a cultura mista CM4	51
Tabela 3.4. Manchas de <i>foxing</i> induzidas em cartolina duplex. Utilizou-se a cultura mista CM4	52
Tabela 3.5. Manchas de <i>foxing</i> induzidas em papel para gravura. Utilizou-se a cultura mista CM4	53
Tabela 3.6. Manchas de <i>foxing</i> induzidas em cartão madeira. Utilizou-se a cultura mista CM4	54

- A - absorvância
- AKD - dímero de alquil ceteno
- AN - abertura numérica
- ASA - anidrido alquenil succínico
- BSA - albumina sérica bovina
- CBH - celobiohidrolases
- CBR - rosa de Bengala cloranfenicol
- CIE – *Commission International d’Eclairage*
- CM – cultura mista
- CSL - *corn steep liquor*
- DNS - ácido dinitrossalicílico
- EC - *Enzyme Comission*
- EG – endoglucanases
- ES - elétrões secundários
- ER - elétrões retrodifundidos
- EX – exoglucanases
- FPA- *filter paper activity*
- FT-IR-ATR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada
- GH - glucanohidrolase
- HR – humidade relativa
- IV - infravermelho
- $L^*a^*b^*$ - coordenadas cartesianas
- $L^*C^*_{ab}h^o_{ab}$ – coordenadas cilíndricas
- MEA - malte extrato agar
- MEV-EDS – microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de raios-x por dispersão em energias
- NA – nutriente agar
- P - radiação transmitida
- P0 - potência da radiação incidente
- SCE - componente especular excluída
- SCI - componente especular incluída

T - transmitância

UV/VIS – ultravioleta/visível

UFC – unidades formadoras de colónias

β G - β -glucosidades

Envelhecimento artificial de papel por metais e microrganismos e sua caracterização por técnicas analíticas

O *foxing* é uma descoloração do papel ou de outros materiais fibrosos e refere-se a manchas de pequenas dimensões que ocorrem de forma dispersa e que normalmente tem uma coloração alaranjada ou tonalidades entre o amarelo e o castanho-escuro.

Neste trabalho, utilizaram-se quatro tipos de papel contemporâneo (papel para aguarela, cartolina duplex, papel para gravura e cartão madeira) envelhecido e não envelhecido, nos quais foram induzidas manchas de *foxing* com culturas mistas de fungos e com iões metálicos Fe^{2+} ou Cu^{2+} em duas concentrações diferentes, sozinhos ou em conjugação com as culturas mistas. Foi determinada a atividade celulolítica de cinco estirpes fúngicas após 24h, 48h, 72h, 96h, 168h e 336h.

Para a caracterização dos papéis e das manchas induzidas foram utilizadas técnicas de análise não destrutivas, como microscopia ótica, análise colorimétrica, microscopia eletrónica de varrimento em modo de pressão variável e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (FT-IR-ATR).

Artificial aging of paper for metals and microorganisms and their characterization by analytical techniques

Foxing is a discolouration of paper or other fibre-based materials and refers to small stains that occur in a dispersed and that usually have an orange color or yellowish to dark brown hues.

In this work, four types of paper support (watercolour paper, duplex paperboard, gravure paper and wood cardboard) aged and non-aged were used, in which *foxing* stains were induced by the presence of mixed cultures of fungi obtained in papers containing *foxing* and by Fe^{2+} or Cu^{2+} metal ions in two different concentrations, alone or in conjunction with mixed cultures. Enzymatic activity of cellulase of five different species of fungi was analysed after 24h, 48h, 72h, 96h, 168h and 336h.

For the paper characterization and induced stains were used non-destructive analysis techniques, such as light microscopy, colourimetric studies, scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDS) and ATR-Fourier-transformed infrared spectroscopy (ATR-FTIR).

O *foxing* é uma patologia típica do papel, embora possa ser observado noutros substratos como o tecido. Refere-se a manchas de pequenas dimensões, que ocorrem de forma dispersa e que normalmente tem uma coloração alaranjada ou tonalidades entre o amarelo e o castanho-escuro. O aparecimento destas manchas tem sido ativamente estudado desde 1930. No entanto, a sua origem continua a não estar completamente definida mas as consequências da sua presença podem ser devastadoras. De facto, é possível observar obras de arte onde as mesmas se encontram profundamente perturbadas pela presença de *foxing*. Assim, os estudos que contribuem para o esclarecimento das causas e consequências do *foxing* e para o conhecimento das diferentes tipologias são evidentemente importantes.

Não existe consenso entre os autores mas pensa-se que as principais causas de *foxing* se devem à oxidação da celulose, à presença de iões metálicos e à presença de microrganismos, que atuam em separado ou sinergeticamente. A contaminação por iões metálicos pode resultar do processo de produção do papel ou de poeiras existentes no ar, sendo os iões ferro e cobre os mais frequentemente encontrados nestas manchas e os mais ativos cataliticamente. Outra das causas de *foxing* é o crescimento de fungos que provocam deteriorações estéticas graves. Alguns fungos filamentosos são capazes de degradar as fibras de celulose por ação de enzimas celulolíticas. Pensa-se ainda que existe uma dupla atividade entre a presença de metais e a de fungos. Os fungos produzem ácido na celulose e o ácido reage com os sais de ferro, formando assim sais orgânicos que se decompõem com o tempo por oxidação. Objetos de arte em museus e o património em geral são seriamente ameaçados pelo aparecimento de *foxing*. Estudos que conduzem à sua prevenção e que contribuem para a realização de trabalhos de restauro eficazes são um desafio para cientistas e conservadores-restauradores.

GERAIS

Este trabalho teve como principal objetivo induzir manchas semelhantes às de *foxing* recorrendo a parâmetros considerados como causas naturais desta patologia, nomeadamente, soluções de ião Fe^{2+} ou de Cu^{2+} , atuando isoladamente ou em conjunto com culturas mistas de fungos, provenientes de papéis contaminados naturalmente. A ação isolada dos fungos foi ainda avaliada e usou-se como material suporte deste estudo quatro tipos de papel contemporâneo com características/constituintes diferentes e pretendeu-se testar a sua tendência para uma maior ou menor formação de *foxing*. Foram ainda utilizadas diferentes técnicas analíticas com o objetivo de estabelecer os parâmetros para a sua utilização nesta problemática e avaliar a sua contribuição para estudos de caracterização de papel natural e afetado por *foxing*.

ESPECÍFICOS

CONHECER

- manchas de *foxing*
- composição de diferentes tipos de papel
- técnicas não destrutivas utilizadas na caracterização do papel

COMPREENDER

- alterações morfológicas e cromáticas no papel
- causas de degradação do papel
- aparecimento e causas de manchas de *foxing*
- influência dos fungos celulolíticos na degradação de papel

VALORIZAR

- objetos de património cultural

APLICAR

- isolar fungos filamentosos de papéis contendo manchas naturais de *foxing*

- estudar a atividade celulolítica de espécies fúngicas
- utilizar técnicas analíticas não destrutivas na caracterização de papel
- induzir manchas de *foxing* em 4 tipos de papel contemporâneo, natural ou artificialmente envelhecido, adicionando quantidades conhecidas de iões Fe^{2+} e Cu^{2+}
- avaliar a influência dos fungos filamentosos isolados no desenvolvimento de manchas de *foxing* para os 4 tipos de papel contemporâneo

Introdução

1.1. BREVE HISTÓRIA DO PAPEL

A necessidade do Homem comunicar, registando informação sobre os acontecimentos que presenciamos, levou-o a servir-se dos mais diversos materiais que pudessem ser utilizados para esse efeito (CELPA, 2013). Antes do fabrico do papel e até já durante o período de existência do mesmo, muitos povos utilizaram formas variadas de se expressarem através da escrita, nomeadamente, folhas de palmeiras, ossos de baleia, dentes de foca, conchas, carapaças de tartaruga e, mais posteriormente, bambu e seda. Também era comum o uso de pedra, barro e até mesmo de cascas de árvores (Reis, 2009). A pedra, elemento natural do seu “habitat” nos tempos mais remotos, foi o primeiro meio de comunicação, como o testemunham as pinturas rupestres e as gravuras que ainda hoje podem ser apreciadas em vários pontos do mundo (CELPA, 2013).

O papel é um elemento essencial à vida quotidiana. É o material básico de comunicação escrita mais utilizado pela Humanidade, podendo ser usado de várias formas com diversos fins. A invenção do papel é atribuída aos chineses e durante seis séculos este segredo foi muito bem guardado de forma a garantir o monopólio. Atualmente pensa-se que, na realidade, o fabrico de papel ocorreu na China no século II a.C., na antiga Dinastia de Han, 200 anos antes do registo histórico oficial, no qual se menciona a invenção por Ts'ai Lun em 105 d.C. (Enami *et al.*, 2010). O papel inicialmente era feito de cascas de plantas e árvores como o cânhamo e o bambu (fibras vegetais), redes de pesca e desperdícios têxteis, usados como fonte de fibras e cal para ajudar no desfibramento (Williams, 2006). O procedimento utilizado consistia na desintegração de fibras vegetais por fracionamento e na remoção da pasta resultante de um molde de madeira revestido de seda. Esta operação era repetida sendo as novas folhas colocadas sobre as anteriores e, posteriormente, prensadas e colocadas em muros aquecidos para secagem (Richard, 2010). Progressivamente foram feitas melhorias como a utilização de material macio no revestimento do molde de madeira, amido como encolagem e um corante amarelo que funcionava como um repelente de insetos (Williams, 2006).

O processo de fabrico foi levado posteriormente da China para a Coreia, no século VI, e em 610 um monge coreano chamado Don-cho compartilhou o seu conhecimento sobre esta técnica no Japão (Williams, 2006). Devido aos abundantes recursos vegetais existentes neste país, os japoneses rapidamente introduziram inovações e encontraram uma planta local, o *kozo* (*Broussonetia kazinoki*), da família da amoreira, para fabricar o

papel (Enami *et al.*, 2010). Tanto no Japão como na Coreia, as técnicas utilizadas eram artesanais, seguindo um processo de formação de uma pasta, em que as fibras longas não eram cortadas mas simplesmente preparadas por batimento, conferindo uma aparência característica e excelente qualidade ao papel produzido.

No ano 751 os chineses foram derrotados na batalha entre as tropas do império Tang e os árabes do rio Talas. Dos prisioneiros que caíram em mãos árabes encontravam-se artesãos que, levados para Samarcanda, transmitiram os seus conhecimentos sobre o fabrico de papel (Bracelpa, 2010; Navarro *et al.*, 2007). De aí, este segredo espalhou-se rapidamente por Bagdad, Damasco, Egito e Marrocos mas só no século XII é que chegou à Europa (Williams, 2006).

Na Europa, as fibras de trapo utilizadas como matéria-prima eram o linho, o cânhamo e a juta. Os trapos eram submetidos a um processo de maceração ou de fermentação, imprescindível para a obtenção de um bom papel. O processo durava de 5 a 30 dias, utilizando-se recipientes de pedra e amolecendo os trapos em água (Navarro *et al.*, 2007). Em virtude desse processo ser duro e penoso, em meados do século XVII, os holandeses começaram a aplicar a força hidráulica para mover grandes pedras que, em movimento umas contra as outras, decompunham as fibras. Essas máquinas refinadoras, chamadas “holandesas”, produziam em quatro ou cinco horas a mesma quantidade de pasta que se podia obter em vinte e quatro horas com um antigo moinho de martelos com cinco pedras (Navarro *et al.*, 2007; Bracelpa, 2010). No ano de 1774, o químico alemão Scheele descobriu o efeito branqueador do cloro, permitindo com isso aumentar a brancura do papel e empregar como matéria-prima trapos mais grossos e coloridos (Navarro *et al.*, 2007). A primeira máquina utilizada na produção de papel foi inventada em França, por Nicholas-Louis Robert, em 1799. Pouco tempo depois, os irmãos Fourdrinier apresentaram o método de produção contínua, aperfeiçoado em Inglaterra, e a tecnologia foi sendo melhorada ao longo do tempo (Bracelpa, 2010). Com as alterações introduzidas no processo de impressão, houve um grande aumento de procura de papel, o que levou a uma escassez considerável de matéria-prima, os trapos, começando assim a ser utilizadas fibras vegetais (Enami *et al.*, 2010). Em 1884, Friedrich G. Keller produziu pasta de fibras obtidas a partir de madeira pelo processo de desfibramento, mas adicionou ainda trapos à mistura. A pasta obtida era formada por fibras de celulose impregnadas com lenhina (Navarro *et al.*, 2007). Na segunda metade do século XIX, quando a madeira substituiu definitivamente os trapos na produção de papel, as máquinas “Fourdrinier” sofreram mudanças importantes (Bracelpa, 2010). Progressivamente, o processo de

produção tornou-se totalmente automatizado em todas as suas fases: desde a preparação de celulose, à formação da folha de papel, até ao uso de encolagens e acabamentos. A indústria de papel desenvolveu fábricas adequadas para produzir papel à base de madeira, em escala industrial, de forma a satisfazer a procura deste substituto dos trapos (CEPI, 2012).

Atualmente, o processo de produção de papel consiste em três etapas principais, que não se diferenciam em muito do processo de produção inicialmente seguido: preparação da pasta, formação da folha e secagem. Dependendo da utilização que terá o papel, assim será o tratamento efetuado antes, durante e após a sua produção. A primeira fase consiste no desfibramento para soltar as fibras, na depuração destinada a manter a pasta livre de impurezas e no refinamento que irá proporcionar as qualidades exigidas ao papel através da moagem das fibras. Na preparação da pasta é importante considerar alguns fatores como o tingimento, a encolagem, a correção de pH e aditivos. A segunda fase de produção é a formação da folha. As fibras de celulose são suspensas em água e colocadas sobre uma tela metálica. A água escoar através desta e as fibras são mantidas, formando uma espécie de tecido, com os fios muito pequenos e ligeiramente traçados entre si. A terceira e última fase é a secagem, na qual a folha é prensada para retirar toda a água e depois é passada por cilindros de ferro aquecidos, ocorrendo a evaporação da água (Bracelpa, 2010).

1.2. COMPOSIÇÃO DO PAPEL

O papel é um sistema complexo, de multicomponentes, constituído por fibras de celulose, vestígios de iões metálicos, cargas minerais e diferentes encolagens, dependendo da técnica de produção utilizada e da função que o papel irá desempenhar. Os subprodutos do envelhecimento natural podem também ser encontrados ao fim de algum tempo e dependem das condições ambientais a que o papel foi sujeito (Missori *et al.*, 2006). A seguir desenvolve-se brevemente alguns dos componentes principais do papel.

1.2.1. CELULOSE, HEMICELULOSE E LENHINA

✓ ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE

A celulose (Fig. 1.1) é um polímero natural formado por cadeias lineares de D-glucose (300 a 15000 monómeros) com ligações glucosídicas β (1 \rightarrow 4) que, juntamente com outros polímeros (hemicelulose, pectina), glucoproteínas (extensina) e lenhina (polímero fenólico), formam a base estrutural das plantas, constituindo as paredes celulares (Quintas *et al.*, 2008; Voet *et al.*, 2004). A estrutura química da celulose apresenta um número elevado de grupos hidroxilo que conferem às fibras celulósicas propriedades notáveis, nomeadamente, resistência e flexibilidade (Quintas *et al.*, 2008; Voet *et al.*, 2004):

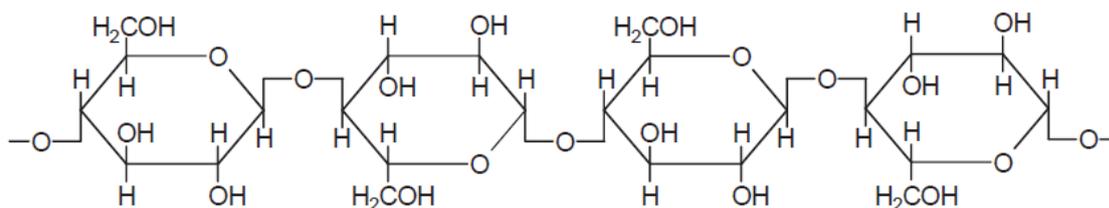


Figura 1.1. Estrutura química da celulose (Heldt, 2005)

A celulose é insolúvel em água devido ao elevado tamanho da sua cadeia, embora seja uma substância hidrófila. A ligação β (1 \rightarrow 4), ao contrário da ligação α (1 \rightarrow 4) dos polímeros de reserva, favorece a conformação linear das moléculas de celulose que se agregam em fibras através de ligações intermoleculares de hidrogénio (Quintas *et al.*, 2008).

As ligações β (1 \rightarrow 4) da celulose podem ser cataliticamente hidrolisadas pela celulase, um enzima produzido por microrganismos. A hidrólise ácida da celulose dá origem a D-glucose e celobiose, esta última no caso de a hidrólise ser incompleta. Estes glúcidos suportam o metabolismo de bactérias e de fungos (Konkol *et al.*, 2012). A quebra da ligação β -glucosídica pode promover a descoloração do papel e enfraquecer a sua resistência. A degradação da celulose é um processo lento pois as cadeias glucano com ligações de hidrogénio não são facilmente acessíveis às celulasas e não se separam facilmente, mesmo após a maioria das suas ligações glucosídicas terem sido hidrolisadas (Quintas *et al.*, 2008; Voet *et al.*, 2004).

✓ ESTRUTURA FÍSICA E MORFOLÓGICA DA CELULOSE

As cadeias de celulose estão associadas por ligações de hidrogénio numa estrutura denominada por microfibrilas. As microfibrilas apresentam uma elevada resistência à degradação química e biológica e são de tal forma estáveis que dificilmente hidrolisam, embora muitos fungos e bactérias produzam celulases, enzimas hidrolisantes (Heldt, 2005). As microfibrilas que compõem as fibras, resultantes do arranjo espacial das cadeias de celulose, possuem regiões cristalinas e amorfas alternadas (Fig. 1.2):

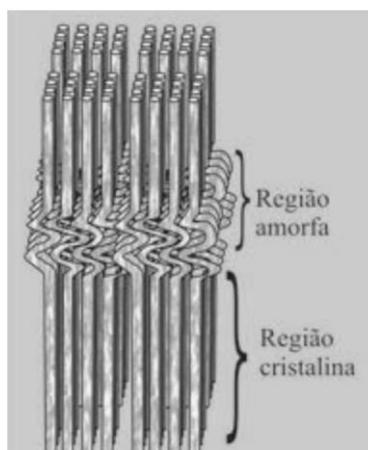


Figura 1.2. Regiões cristalinas e amorfas que compõem a estrutura das microfibrilas (Silva *et al.*, 2009)

A primeira região é altamente ordenada e resulta da ação da biopolimerização e da cristalização da celulose através de processos enzimáticos. Esta região apresenta um maior número de interações químicas, nomeadamente, as ligações de hidrogénio e forças de van der Waals, o que torna a celulose insolúvel e mais resistente à ação enzimática, à tração e a agentes químicos. A região amorfa é desordenada e deve-se a imperfeições nas microfibrilas resultantes de alterações no processo de cristalização. Esta região é mais facilmente hidrolisável e ocorrem menos interações de hidrogénio, sendo facilmente hidratada e mais acessível aos enzimas. A proporção entre as regiões cristalina e amorfa, que determina o grau de cristalinidade e as características dimensionais dos domínios cristalinos, segundo o tipo de microfibrilas é variável (Silva *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006).

✓ **HEMICELULOSE**

As hemiceluloses (Fig. 1.3) ocorrem normalmente associadas à celulose e são importantes constituintes da parede celular. Consistem numa variedade de polímeros que contêm, para além da D-glucose, outros glúcidos tais como hexoses (D-manose, D-galactose, D-fucose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácido 4-O-metilglucorónico (Heldt, 2005; Silva *et al.*, 2009).

Na Fig. 1.3 pode ver-se o xiloglucano, a hemicelulose mais abundante da parede vegetal de algumas espécies. A sua estrutura é constituída por uma cadeia de β -1,4-glucano na qual os resíduos de D-xilose estão ligados entre si através de ligações glucosídicas β (1 \rightarrow 4) (Heldt, 2005; Silva *et al.*, 2009).

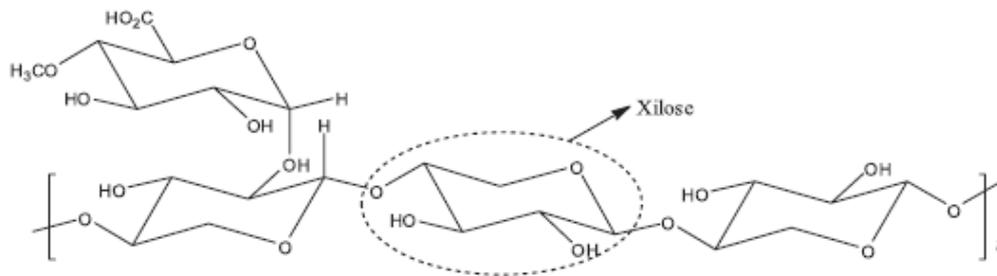


Figura 1.3. Representação esquemática da hemicelulose (Santos *et al.*, 2012)

As hemiceluloses são estruturalmente mais semelhantes à celulose do que à lenhina; no entanto, são mais suscetíveis à hidrólise devido ao seu carácter amorfo (Santos *et al.*, 2012). O papel biológico mais importante das hemiceluloses é a contribuição para o reforço da parede celular por interação com a celulose e com a lenhina, conferindo-lhe estabilidade mecânica (Scheller *et al.*, 2010).

✓ **LENHINA**

A lenhina (Fig. 1.4), depois da celulose, é o polímero natural mais abundante e encontra-se covalentemente ligada à celulose na parede celular de quase todas as plantas utilizadas na indústria papeleira. As suas principais funções são proporcionar rigidez,

impermeabilidade e resistência a ataques biológicos e mecânicos (Heldt, 2005; Vanholme *et al.*, 2010). A lenhina é um polímero hidrofóbico, com estrutura tridimensional, altamente ramificada, podendo ser classificado como um polifenol de arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano e que pode apresentar grupos hidroxilo e metoxilo como substituintes do grupo fenilo (Silva *et al.*, 2009). Assim, a estrutura química da lenhina é menos precisa do que a de outros polímeros naturais e sintéticos (Lignoworks, 2013).

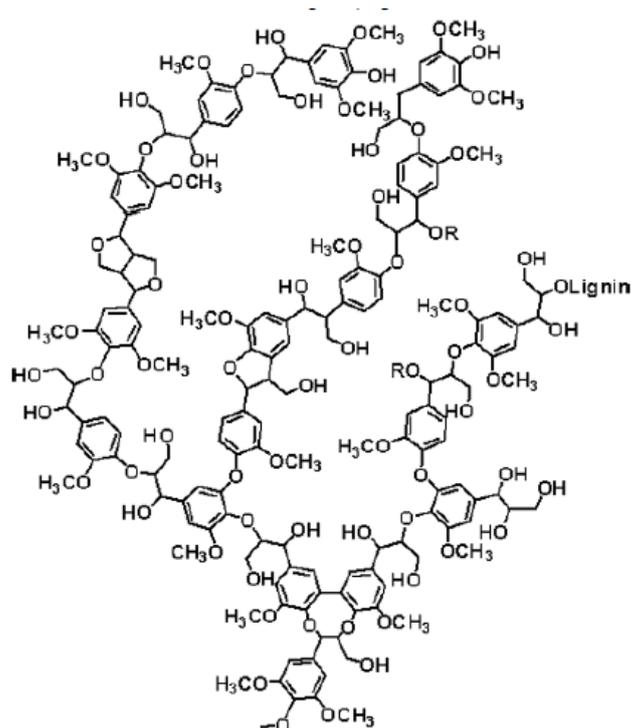


Figura 1.4. Estrutura química da lenhina (Lignoworks, 2013)

Os componentes básicos da lenhina são os álcoois *p*-cumarílico, sinapílico e coniferílico que, coletivamente, são designados por monolignóis (Fig 1.5). A síntese dos monolignóis requer a redução do grupo carboxílico dos respectivos ácidos a álcool (Heldt, 2005).

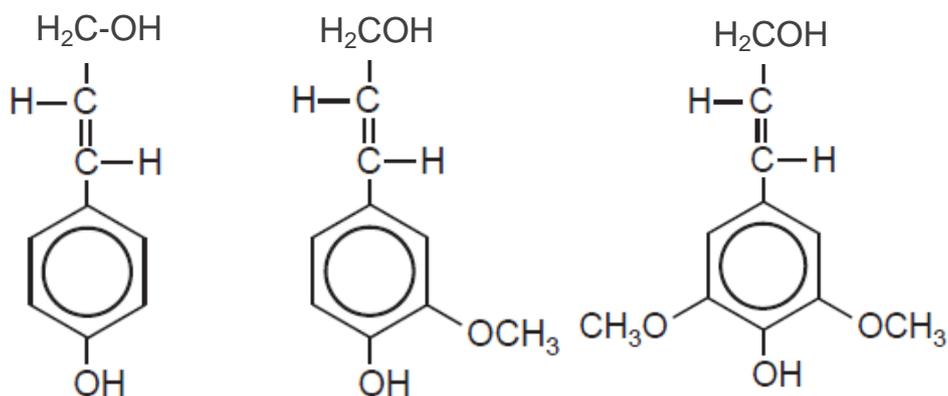


Figura 1.5. Álcoois p-cumarílico, sinapílico e coniferílico, respectivamente, da esquerda para a direita (Heldt, 2005)

1.2.2. AS CARGAS MINERAIS

As cargas são pigmentos minerais, que são incorporadas nas fibras de celulose e preenchem os espaços entre elas. Atuam como cargas funcionais e influenciam, geralmente de forma positiva, as propriedades do papel, embora também possam ter efeitos negativos sobre as mesmas. A escolha da carga é determinante pois cada uma apresenta propriedades que as diferencia, conferindo propriedades específicas ao papel (Velho, 2002). As cargas minerais melhoram certas propriedades como as óticas (luminosidade, dispersão de luz, opacidade, brilho), as estruturais (maciez, volume, permeabilidade ao ar), as mecânicas (resistência, rutura, rigidez), entre outras. A utilização de cargas pode, porém, provocar a disrupção das fibras e, quando utilizadas em quantidade excessiva, podem comprometer a resistência da superfície. Estes problemas são minimizados alterando as propriedades físicas da carga, como o tamanho e a forma das partículas (Beazley, 1991; Velho, 2002).

As principais cargas minerais para papéis ácidos são o talco, o caulino hidratado, o caulino calcinado, as sílicas precipitadas e os silicatos e o dióxido de titânio. Para papéis neutros/alcalinos são usados, além das cargas atrás referidas, o carbonato de cálcio em pó e o carbonato de cálcio precipitado. Existem ainda outras cargas como a barite, a pirofilite, a mica, o gesso e a alumina. As mais utilizadas no papel são o carbonato de

cálcio, o caulino, o carbonato de cálcio precipitado, o talco e o dióxido de titânio (Wilson, 2006).

A necessidade de produção de papel alcalino ou neutro em vez de ácido, por motivos de conservação, e a procura de papel mais brilhante e volumoso têm sido os principais fatores para uma maior utilização de carbonato de cálcio no lugar do caulino. O carbonato de cálcio melhora a opacidade e é utilizado simultaneamente com outras cargas, substituindo o dióxido de titânio que é mais caro. O talco é mais caro do que alguns pigmentos, mas melhora a qualidade do papel, nomeadamente, a suavidade, a qualidade de impressão, acentua a cor em papéis coloridos e tem menor impacto sobre as propriedades relacionadas com a resistência química e mecânica do papel. O dióxido de titânio, devido ao seu elevado preço, é raramente usado de modo frequente e serve especificamente para conferir determinadas propriedades ao papel, nomeadamente, brancura. O gesso (sulfato de cálcio) é um mineral abundante, obtido naturalmente ou como subproduto industrial e tem a desvantagem de possuir uma elevada solubilidade (Wilson, 2006). O diatomito ou terra de diatomáceas torna o papel altamente absorvente devido à sua estrutura macroporosa e baixa densidade (Tsai *et al.*, 2006).

1.2.3. A ENCOLAGEM

A encolagem é uma etapa no processo de fabrico do papel na qual é aplicada uma substância que tem como finalidade permitir a escrita, evitando que a tinta se espalhe, proteger as fibras da desagregação e aumentar a resistência a agentes externos (Panucarmi, 2008, LaCour, 2001-2003).

Inicialmente, o papel produzido no Oriente não era encolado. Os chineses recorreram a um processo semelhante ao revestimento de uma superfície utilizando gesso e, mais tarde, usaram uma substância adesiva feita de líquenes. Posteriormente, utilizaram amido, sendo este adicionado à pasta de celulose depois da formação da folha de papel. Os papéis árabes, por seu lado, embora mantivessem a encolagem com amido, posteriormente eram acetinados para produzir uma superfície altamente polida, semelhante ao pergaminho (Garlick, 1986). Em meados do século XIII, em Itália, a gelatina foi utilizada pela primeira vez como encolagem e passou a ser amplamente usada na Europa. A encolagem

de gelatina forma uma película uniforme bastante impermeável à humidade. A utilização desta solução proteica apresenta ainda outras vantagens como melhorar a sua superfície em termos de escrita e aumentar a resistência físico-química do papel por diminuir a velocidade de degradação da celulose, evitar a descoloração do papel, proteger dos poluentes ambientais e minimizar os efeitos negativos das variações de humidade relativa. O principal problema gerado com a encolagem de gelatina era a sua rápida deterioração em meio líquido, durante o processo de fabrico, especialmente a temperaturas elevadas. Com a finalidade de melhorar a qualidade e resistência da encolagem de gelatina foi adicionado alúmen (sulfato de alumínio e potássio). O alúmen estabiliza a viscosidade da solução, aumenta a capacidade de resistência mecânica da folha e controla o crescimento de microrganismos (Barrett, 2011; Garlick, 1986).

Atualmente, o dímero de alquil ceteno (AKD) e o anidrido alquenil succínico (ASA) são os agentes de encolagem interna mais comuns na indústria de fabrico de papel e são utilizados para melhorar as suas propriedades. O AKD e o ASA têm um efeito predominantemente hidrófugo, atribuído a uma reação de esterificação com os grupos hidroxilo da fibra de madeira. A principal diferença entre estes dois agentes de encolagem é a menor reatividade e capacidade de hidrólise do AKD (Hundhausen *et al.*, 2009).

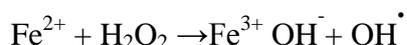
1.3. DEGRADAÇÃO DE PAPEL

A degradação de papel é um processo de alterações físico-químicas, condicionada por agentes internos e externos. Os agentes internos estão diretamente relacionados com a composição do papel, ou seja, com o tipo de fibras, encolagens, resíduos químicos e iões metálicos presentes. Os agentes externos são os agentes físicos e biológicos, nomeadamente, a temperatura, a humidade relativa, a radiação ultravioleta, a poluição atmosférica e os microrganismos (Costa, 2003; Pinzari *et al.*, 2006).

A degradação hidrolítica e térmica é uma forma de degradação de papel e depende do teor de humidade, temperatura, acidez e das condições de armazenamento (Manso *et al.*, 2006). Variações de temperatura e de humidade relativa levam à contração e alongamento das fibras de papel e favorecem a proliferação de agentes biológicos. Quanto mais baixa for a temperatura, maior será a durabilidade do papel (Costa, 2003). A radiação natural ou

artificial é tendencialmente nociva para o papel, pois sobretudo a ação da radiação ultravioleta é irreversível e prolonga-se mesmo após o período de irradiação ter terminado, contribuindo assim para a oxidação da celulose. As fibras de papel rompem-se em unidades cada vez menores, até se tornarem insuficientes para manterem a folha unida (Costa, 2003).

Como se referiu anteriormente, o papel contém muitas vezes vestígios de iões metálicos, nomeadamente, de metais de transição, provenientes do processo de produção ou de contaminação. Estes iões metálicos podem ser responsáveis por outro processo de deterioração do papel: a degradação oxidativa da celulose. De entre os iões de metais de transição, o cobre parece ser um dos mais ativos cataliticamente, seguido do ferro, cobalto e crómio (Šelih *et al.*, 2007; Malešič *et al.*, 2012). A reação principal, através da qual os iões destes elementos contribuem para a degradação da celulose pode ser comparada à reação de Fenton, na qual são formadas espécies reativas de oxigénio, incluindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Kreiner *et al.*, 2002; Lushchak, 2011; Malešič *et al.*, 2012). O H_2O_2 é reduzido por um ião de um metal de transição, sendo produzida uma espécie reativa, como um radical hidroxilo:



A espécie oxidante será o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) embora alguns investigadores refiram que Fe (IV) pode ser na verdade essa espécie (Šelih *et al.*, 2007)

A formação de H_2O_2 é um dos produtos de degradação do papel e está associada principalmente à presença de iões metálicos, mas também à presença de fungos (Peter, 2000).

A biodegradação é um problema frequentemente abordado na conservação de bens culturais, sendo as espécies fúngicas a principal causa destes danos. A presença de esporos e de células vegetativas na superfície de documentos gráficos pode indicar uma possível degradação no futuro (Choi, 2007). Por vezes, o ataque biológico pode ser facilmente detetado a olho nu sob luz rasante, tornando possível o isolamento microbiológico, o crescimento da cultura e a identificação de microfungos mas, em alguns casos, a origem biótica das manchas pode ser inferida apenas com análises microscópicas (Zotti *et al.*, 2011). Alguns fungos filamentosos, frequentemente

associados à degradação de papel, são capazes de dissolver as fibras de celulose através da ação de enzimas celulolíticas ou produzir ácidos orgânicos causando descoloração e danos graves em materiais com uma grande importância cultural e histórica. Os fungos utilizam materiais orgânicos como fonte de nutrientes e a água contida no ar. O micélio dos fungos consegue invadir os espaços entre as fibras que constituem o papel (Michaelsen *et al.*, 2009).

Dentro do processo degradativo do papel, a degradação da celulose é um aspecto particularmente importante do ponto de vista bioquímico. Adicionalmente, existe um processo degradativo particularmente interessante e importante e que tem sido objeto de intensa investigação nos últimos anos: o *foxing*. Seguidamente, falaremos brevemente destes dois aspetos.

1.3.1. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA CELULOSE

As espécies fúngicas são um agente muito importante na degradação de património cultural. Conhecem-se mais de 200 espécies com atividade degradativa, nomeadamente, na área do papel, e muitas delas têm uma ação parcialmente celulolítica. O substrato em papel de documentos gráficos, como livros e obras de arte, é frequentemente colonizado por grupos específicos de microrganismos representando mais do que um simples problema estético (Pinzari *et al.*, 2006). Na verdade, a atividade microbiana afeta não só a aparência dos objetos com a formação de manchas mas, geralmente, consiste numa profunda modificação da sua estrutura física e química, produzindo degradação irreversível das fibras de celulose, a qual pode ser degradada por enzimas celulolíticas produzidos por fungos (Konkol *et al.*, 2012).

As celulasas são enzimas celulolíticas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo a sua hidrólise. Estes enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a libertação de glúcidos, dos quais a glucose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade da sua conversão em etanol. As celulasas têm a capacidade de hidrolisar as ligações glucosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ da celulose e são designadas de acordo com a sua especificidade para o substrato pela União Internacional de Bioquímica e Biologia

Molecular (IUBMB). Assim, são agrupadas como hidrolases *O*-glucosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a designação E.C.3.2.1.x (Lynd *et al.*, 2002).

As celulasas classificam-se em endoglucanases (EG), que clivam ligações internas da fibra celulósica, exoglucanases (EX) ou celobiohidrolases (CBH), que atuam na região externa da celulose e β -glucosidases (β G) que hidrolisam oligossacáridos solúveis em glucose (Zhang *et al.*, 2006).

As endoglucanases (E.C.3.2.1.4) são enzimas do complexo celulolítico que quebram aleatoriamente as ligações internas da fibra celulósica, preferencialmente nas regiões amorfas, dando origem a glúcidos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais. A EG é o enzima celulolítico responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização) devido à sua fragmentação em oligossacáridos (Castro *et al.*, 2010; Metzler, 2003; Pérez *et al.*, 2002). As exoglucanases (E.C.3.2.1.91) iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose. O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucanohidrolase (GH). A CBH (EC 3.2.1.91), cujo nome sistemático é 1,4-b-D-glucana-celobio-hidrolase, participa na hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogénese que promove o aumento de hidrólise da celulose por tornar amorfas as regiões cristalinas, deixando a celulose mais exposta às celulasas. A CBH ainda pode ser dividida em celobiohidrolase I e celobiohidrolase II que atuam na extremidade redutora e não redutora da cadeia de celulose, respetivamente, libertando como produtos principais glucose (glucanohidrolases) ou celobiose e rompendo as ligações glucosídicas β -(1-4) (Lynd *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4-b-D-glucana-glucano-hidrolase é capaz de libertar glucose diretamente do polímero, hidrolisando eficazmente a fibra celulósica (Castro *et al.*, 2010). As exoglucanases são os únicos enzimas capazes de degradar eficazmente a celulose cristalina (Pérez *et al.*, 2002). O processo de hidrólise da celulose é finalizado através da ação da β -glucosidase (EC 3.2.1.21), que quebra a celobiose, libertando duas moléculas de glucose (Gottschalk *et al.*, 2010). Na Fig. 1.6. é apresentada a ação sinérgica destes enzimas de modo esquemático:

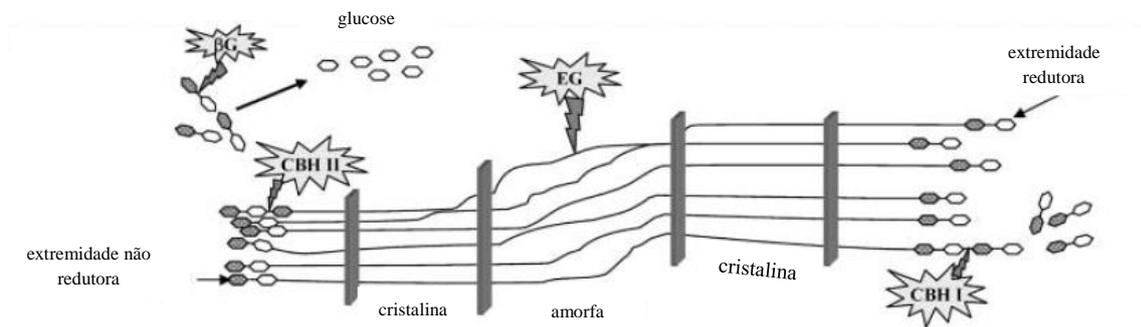


Figura 1.6. Diagrama esquemático representando a degradação enzimática da celulose (Pérez *et al.*, 2002)

Os enzimas do complexo celulolítico, quando atuam conjuntamente, apresentam um melhor rendimento do que quando atuam isoladamente. Assim, são conhecidas três formas de sinergia entre as celulases: a sinergia EG-EX em que a endoglucanase, atua nas regiões amorfas da fibra e disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente; a sinergia CBH I-CBH II em que atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores libertados por ação da endoglucanase; e as sinergias EG-βG e EX-βG em que há a liberação de celobiose e de oligossacarídeos, que são substratos para a β-glicosidase (Castro *et al.*, 2010).

1.3.2. FOXING

O termo *foxing* é utilizado por conservadores e restauradores de papel e refere-se a manchas de pequenas dimensões que ocorrem de forma dispersa em diferentes tipos de documentos gráficos cujo suporte é de papel, como desenhos, manuscritos, livros, papéis de arquivo. Estas manchas apresentam frequentemente uma coloração alaranjada ou com tonalidades entre o amarelo e o castanho-escuro (Boruvka, 2008; Choi, 2007; Manso *et al.*, 2009).

O aparecimento de manchas de *foxing* tem sido ativamente estudado desde 1930. No entanto e apesar de intensas pesquisas, a sua origem é ainda desconhecida, não existindo consenso entre os investigadores (Bicchieri *et al.*, 2002).

Segundo Boruvka (2008), as manchas de *foxing* são devidas à oxidação da celulose. No entanto, Rebrikova e Manturovskaya (2000) consideram que os íons metálicos devem ser considerados os principais responsáveis pelo *foxing*. Para Choi (2007), além do ferro e do cobre, o estanho é também um elemento frequentemente encontrado nestas manchas. Buzio e colaboradores (2004) estão entre os que atribuem o aparecimento destas manchas ao crescimento de fungos, à presença de íons metálicos e também aos materiais de encolagem do papel, enquanto para Choi (2007) referindo-se ao trabalho de Meyenell e Newsan (1978) a origem do *foxing* deve-se exclusivamente à presença de microrganismos. A cor observada pode ter a sua origem no próprio organismo, nos metabolitos fúngicos ou na reação entre os metabolitos e o papel. Os microrganismos mais comuns nestas manchas são os géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* (Choi, 2007).

As principais causas de *foxing*, segundo Manso (2009) são a contaminação por metais que pode ocorrer no processo de fabrico do papel ou de poeiras existentes no ar. Estas poeiras podem conter uma quantidade de ferro até 15% (Manso *et al.*, 2009). Segundo Bicchieri (2002) o ião férrico desloca íons de cálcio da celulose, provocando o enfraquecimento do polímero (Bicchieri *et al.*, 2002). Malešič e colaboradores (2012) afirmam que o ferro e o cobre são os íons que mais contribuem para o envelhecimento do papel levando à formação de *foxing* (Malešič *et al.*, 2012). Pensa-se que existe uma dupla atividade entre a presença de metais e a presença de fungos. Os fungos produzem ácido na celulose, e o ácido reage com os sais de ferro, formando assim sais orgânicos que se decompõem com o tempo por oxidação (Choi, 2007).

1.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

A caracterização de uma amostra é um aspeto essencial na medida em que permite obter informação sobre a sua composição química, morfológica e estrutural. Foram usadas diferentes técnicas para caracterizar as amostras de papel e as manchas de *foxing*, natural e induzido, sobre as quais se faz uma pequena abordagem teórica a seguir.

1.4.1. MICROSCOPIA ÓTICA

A microscopia ótica é utilizada para ampliar objetos de pequenas dimensões ou zonas particulares de outros de maiores dimensões e fornece informação estrutural e morfológica sobre os objetos em estudo (Stuart, 2007). Esta técnica envolve a interação da radiação com a matéria. É uma técnica rápida para a identificação de uma ampla gama de materiais, incluindo minerais, metais, cerâmicas, fibras, pinturas, entre outras. Existe uma variedade de técnicas de microscopia ótica que podem ser utilizadas. De facto, as amostras podem ser examinadas por luz transmitida ou refletida, esta última em estereomicroscopia onde é obtida uma imagem tridimensional. O microscópio pode também ser de campo claro, o modo mais frequente de operar em microscopia ótica, de campo escuro, de contraste de fase, de fluorescência e de ultravioleta (Stuart, 2007).

O microscópio é constituído por dois conjuntos de lentes: a objetiva e a ocular. A objetiva projeta uma imagem ampliada, mas invertida, e a ocular fornece uma imagem virtual da que foi obtida pela objetiva. A ampliação é uma das características óticas essenciais da objetiva e é determinada a partir das ampliações da objetiva e da ocular. A abertura numérica (AN) é a quantidade de luz recebida de um objeto e é dada pela equação:

$$AN = n \sin \alpha$$

em que o n é o índice de refração do meio que se interpõe entre o objeto e a lente e o α é o ângulo que forma o raio mais externo captado pela lente da objetiva (Araújo, 2007).

Outra das características do microscópio é o seu poder de resolução, ou seja, a capacidade que o microscópio tem de distinguir dois pontos adjacentes. O poder de resolução é expresso pelo limite de resolução, ϵ , que é definido como a distância mínima entre dois pontos de modo a que as respetivas imagens, fornecidas pelo sistema ótico, sejam distintas (Bittencourt, 2008) e é dado pela equação:

$$\epsilon = 0,61 \lambda / n \sin \alpha$$

em que λ é o comprimento de onda utilizado na observação (Araújo, 2007). Assim, quanto menor for o limite de resolução da objetiva, maior será o poder de resolução

(Bittencourt, 2008). É possível uma resolução elevada, dependendo da capacidade do equipamento e da natureza da amostra.

1.4.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV/VIS)

A espectroscopia de absorção molecular no UV/VIS é uma técnica analítica baseada na capacidade de espécies poliatômicas, iônicas ou moleculares, absorverem determinados comprimentos de onda da radiação eletromagnética na região do ultravioleta/visível (UV/VIS). As moléculas quando excitadas pela radiação ultravioleta e visível promovem a transição de elétrons de uma orbital molecular de baixa energia para outra orbital, de energia mais elevada. No processo de absorção, a energia dos fótons é transferida (totalmente ou em parte) para as espécies constituintes da amostra originando transições eletrônicas associadas a transições vibracionais e rotacionais. Tendo em vista que os níveis energéticos das moléculas são quantizados, apenas os comprimentos de onda cujos fótons têm energia idêntica à de uma transição permitida são absorvidos. Assim, a absorção pode ser considerada como um processo específico relacionado com a estrutura da espécie absorvente, que determina a energia envolvida na transição, e com a probabilidade de que a transição ocorra (Leal *et al.*, 2007; Skoog, 2007).

A intensidade da absorção não é diretamente mensurável mas a atenuação da radiação que incide na amostra pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente. Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução contendo uma espécie absorvente, uma parte da energia radiante é absorvida, e a parte restante atravessa o meio. Chama-se potência radiante à quantidade de energia transportada por segundo através de uma unidade de seção transversal. A razão entre a potência da radiação transmitida (P) e a potência da radiação incidente (P₀) é denominada transmitância (T), e representa a fração da potência da radiação incidente que é transmitida pela solução:

$$T = P / P_0$$

Em geral, esta técnica é de rápida execução, embora a preparação de amostra possa ser mais demorada. A lei que rege o processo de absorção de radiação é a Lei de Lambert-Beer, que estabelece a relação entre a absorvância (A), que corresponde ao inverso do logaritmo decimal da transmitância (T), e a concentração da espécie absorvente:

$$\log P_0 / P = \log (1/T) = A = \epsilon bc$$

onde ϵ é a absortividade molar do analito, b o percurso ótico e c a concentração da espécie absorvente (Leal *et al.*, 2007; Stuart, 2007).

1.4.3. ANÁLISE COLORIMÉTRICA

A colorimetria fornece uma maneira mais precisa para definir a cor do que a espectrofotometria. Em colorimetria, a sensibilidade do olho humano à luz em toda a região do visível é medida, obtendo-se uma descrição numérica da cor, em vez de bandas num espectro de absorção, característico em espectroscopia. Existem três atributos para descrever a cor. O primeiro identifica a cor pela sua localização na sequência espectral, isto é, o comprimento de onda associado a cada cor, a que se chama tom ou tonalidade, e é o comprimento de onda onde ocorre o contraste máximo. O segundo atributo, relativo ao nível de branco e/ou de preto, é chamado saturação. O terceiro atributo é o brilho ou luminância. A luminância fornece informações sobre a transparência de uma amostra em toda a faixa do visível (Mortimer *et al.* 2008).

Em 1931, a *Commission Internationale d'Eclairage* (CIE), o órgão responsável pelas normas internacionais para a ciência da cor, criou os primeiros modelos de cor cujo princípio se baseia na definição de três componentes essenciais para a percepção de cor: a fonte de iluminação, o objeto e o observador. Neste modelo, qualquer cor pode ser descrita por um conjunto de três valores X, Y, Z que resultam da mistura de três cores primárias (vermelho, verde e azul). Posteriormente, em 1976, a CIE recomendou a utilização de duas fórmulas padrão para a diferença de cor (CIELAB e CIELUV), sendo a CIELAB a mais utilizada na discussão sobre as cores. Estas fórmulas fornecem um espaço de cor uniforme para descrever todas as cores perceptíveis ao olho humano. O

modelo CIELAB utiliza dois tipos de coordenadas: as cartesianas e as cilíndricas (Fig. 1.7) (Luo, 2006).

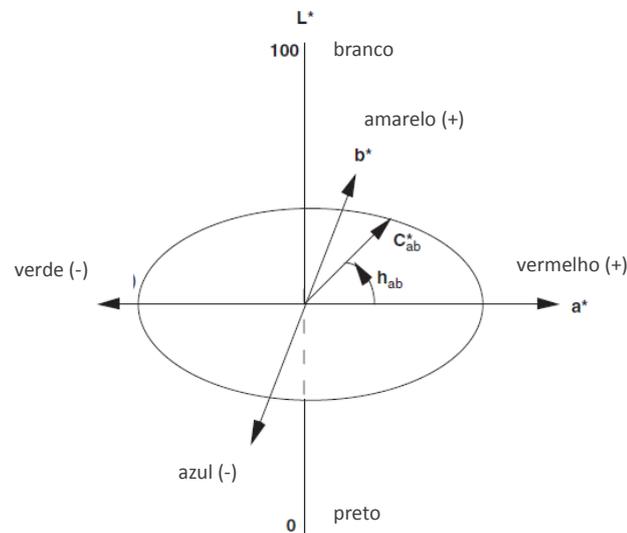


Figura 1.7. Representação tridimensional do espaço de cor CIELAB 1976 (Luo, 2006)

As coordenadas cartesianas ($L^*a^*b^*$) são representadas num espaço tridimensional e têm preferência para as cores acromáticas, como os brancos, pretos e cinzas. As coordenadas cilíndricas ($L^*C^*_{ab}h^0_{ab}$) representam as componentes psicofísicas qualitativas e quantitativas da cor, como a luminosidade (L^*), a saturação (C^*) e a tonalidade (h^0). A luminosidade varia entre 0 (preto) e 100 (branco), a coordenada a^* representa a cor na escala de vermelho-verde (vermelho [+], verde [-]), e a coordenada b^* a cor na escala amarelo-azul (amarelo [+], azul [-]). C^*_{ab} corresponde à saturação de cor ($C^*_{ab} = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$), e refere-se ao comprimento da linha que une o ponto (0,0) e o ponto de amostragem no plano a^*b^* . Quanto ao parâmetro h^0_{ab} , é o ângulo de tonalidade ($h^0_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$) e refere-se ao comprimento de onda dominante. A diferença ou variação de cor pode ser estimada pela equação clássica CIELAB: $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$, em que ΔL^* , Δa^* e Δb^* representam as diferenças entre dois valores de L^* , a^* e b^* . As coordenadas $L^*a^*b^*C^*_{ab}h^0_{ab}$ são definidas em relação a um branco de referência, em geral o iluminante CIE Standard D65, que representa a luz natural (Prieto *et al.*, 2011; Ohno, 2000).

1.4.4. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO E ESPECTROSCOPIA DE RAIOS-X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (MEV-EDS)

O princípio de funcionamento do microscópio eletrónico de varrimento (MEV) baseia-se na incidência de um feixe de elétrons acelerados num ponto da superfície da amostra e na subsequente recolha dos sinais eletrónicos emitidos por essa amostra. A amostra é percorrida sequencialmente por um feixe de elétrons acelerados por uma diferença de potencial que varia entre 0 e 50 KV, finamente focado através de um sistema de lentes eletromagnéticas (Stuart, 2007). Da interação do feixe eletrónico com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e elétrons, entre os quais elétrons secundários (ES) (com energias inferiores a 50 eV) utilizados na formulação de uma imagem da amostra. Os elétrons secundários são elétrons da amostra que sofrem excitação e “escapam” da superfície. Outro modo importante de deteção são os elétrons retrodifundidos (ER), que emergem da superfície com uma energia elevada, próxima da dos elétrons primários (interações elásticas ou pequenas perdas de energia do feixe primário). A dependência da intensidade da emissão de ER do número atómico permite estimar o número atómico médio local de uma amostra (composição química da amostra) a partir do registo em condições calibradas da intensidade desta emissão. Da interação do feixe eletrónico com a amostra resulta também a emissão de raios X. A análise qualitativa compreende a identificação dos elementos presentes num “ponto” ou numa região alargada da superfície da amostra. A identificação das riscas características é realizada com referência a bases de dados e com o apoio do sistema informático associado ao espectrómetro (Sá, 2001; Stuart, 2007).

O MEV pode ampliar objetos na ordem de 300 000 vezes e produzir imagens tridimensionais detalhadas. Além disso, pode ser combinado com a espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS), a fim de realizar a análise elementar. O EDS pode ser utilizado para a análise química de elementos presentes num ponto determinado ou numa região alargada da superfície da amostra (Stuart, 2007).

As amostras para poderem ser estudadas por microscopia eletrónica de varrimento têm de apresentar boa condutividade elétrica superficial ou serem metalizadas, utilizando um revestimento ultrafino de ouro ou de carbono, suportar as condições de vácuo

necessárias no modo de operação desta técnica e apresentar estabilidade física e química nas condições de observação/interação com o feixe eletromagnético (Sá, 2001).

A análise simultânea dos sinais recolhidos pelos detetores permite caracterizar cada ponto da amostra em termos de topografia (ES e ER), número atômico (ER e EDS); composição química elementar (EDs e ER) e campos magnéticos (ER) (Sá, 2001).

1.4.5. ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER EM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FT-IR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma das técnicas mais importantes na identificação e caracterização de materiais. Atualmente, os espectrómetros de infravermelho com transformada de Fourier não utilizam nenhum elemento dispersivo e todos os comprimentos de onda são detetados e medidos simultaneamente. Em vez de um monocromador, é usado um interferómetro de Michelson para produzir padrões de interferência que contêm a informação espectral do infravermelho. Para se obter a potência radiante em função do comprimento de onda, o interferómetro descodifica o sinal da fonte por uma técnica matemática denominada transformada de Fourier, através do auxílio de um computador que realiza os cálculos necessários. Para se obter o espectro analítico, primeiro traça-se um espectro de *background* e depois o espectro da amostra. O sinal analítico é a razão entre os dois sinais.

As vantagens do FT-IR são a sua elevada sensibilidade, o melhor aproveitamento da potência luminosa e melhor precisão e exatidão em termos de valores de comprimento de onda (Skoog *et al.*, 2007).

A espectroscopia de infravermelho em modo de reflexão total atenuada (FT-IR-ATR) é utilizada para analisar de amostras em diferentes estados físicos e de naturezas distintas, como pastas, líquidos, adesivos, pós, pastilhas, entre outros.

O fundamento da espectroscopia baseia-se no facto de que quando um feixe de radiação passa de um meio com um elevado índice de refração e baixa absorção no IV (cristal de ATR) para um meio com um índice de refração mais baixo (amostra), ocorre reflexão (Pineda *et al.*, 2008). A fração do feixe de radiação incidente que é refletida

aumenta conforme aumenta o ângulo de incidência e quando excede um determinado ângulo crítico a reflexão é completa. No ponto de reflexão o feixe atua como se penetrasse a uma pequena distância dentro da amostra. A radiação de penetração é chamada onda evanescente. Se a amostra absorve num certo comprimento de onda evanescente, há uma atenuação do feixe a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho, originando o espectro. A técnica ATR tem grande utilidade para examinar materiais densos ou com absorção elevada (Stuart, 2007).

Metodologia

2.1. ESTRATÉGIA ADOTADA

A concretização dos objetivos deste trabalho obedeceu ao seguinte plano:

LOCAL DE REALIZAÇÃO

- Laboratório HERCULES, Palácio do Vimioso
- Laboratório de Biotecnologia, Fase III, Colégio Luís António Verney
- Laboratório de Conservação e Restauro José de Figueiredo

DURAÇÃO

Ano letivo de 2012/2013

PAPÉIS EM ESTUDO

- oito papéis diferentes contendo manchas de *foxing* natural (P1 a P8) (Tabela 2.1)
- papel para aguarela da Canson (Arches (56x66) cm)
- cartão madeira da Canson
- cartolina duplex da Fabriano (Rosaspina Ivory (50x70) cm)
- papel para gravura da Fabriano (Rosaspina Ivory (50x70) cm)

MODELO BIOLÓGICO

- culturas mistas de fungos obtidas a partir dos papéis contendo *foxing* natural
- estirpes fúngicas isoladas dos papéis contendo *foxing* natural
- estirpe com atividade celulolítica conhecida *Trichoderma harzianum* CCM1 783

ENSAIOS

- envelhecimento artificial dos quatro papéis contemporâneos em estudo
- indução artificial de manchas de *foxing*
- atividade enzimática da celulase ao fim de 24h, 48h, 72h, 98h, 168h e 336h

PARÂMETROS

Neste trabalho selecionaram-se oito papéis de natureza distinta e envelhecidos naturalmente, contendo manchas de *foxing* de diferentes tipologias, e isolaram-se fungos filamentosos desses papéis. Estas espécies fúngicas foram identificadas e avaliadas quanto à sua atividade celulolítica. Foram também induzidas manchas de *foxing* em

papéis contemporâneos de forma a avaliar a influência que os fungos filamentosos e os iões Fe^{2+} e Cu^{2+} podem ter na origem destas manchas.

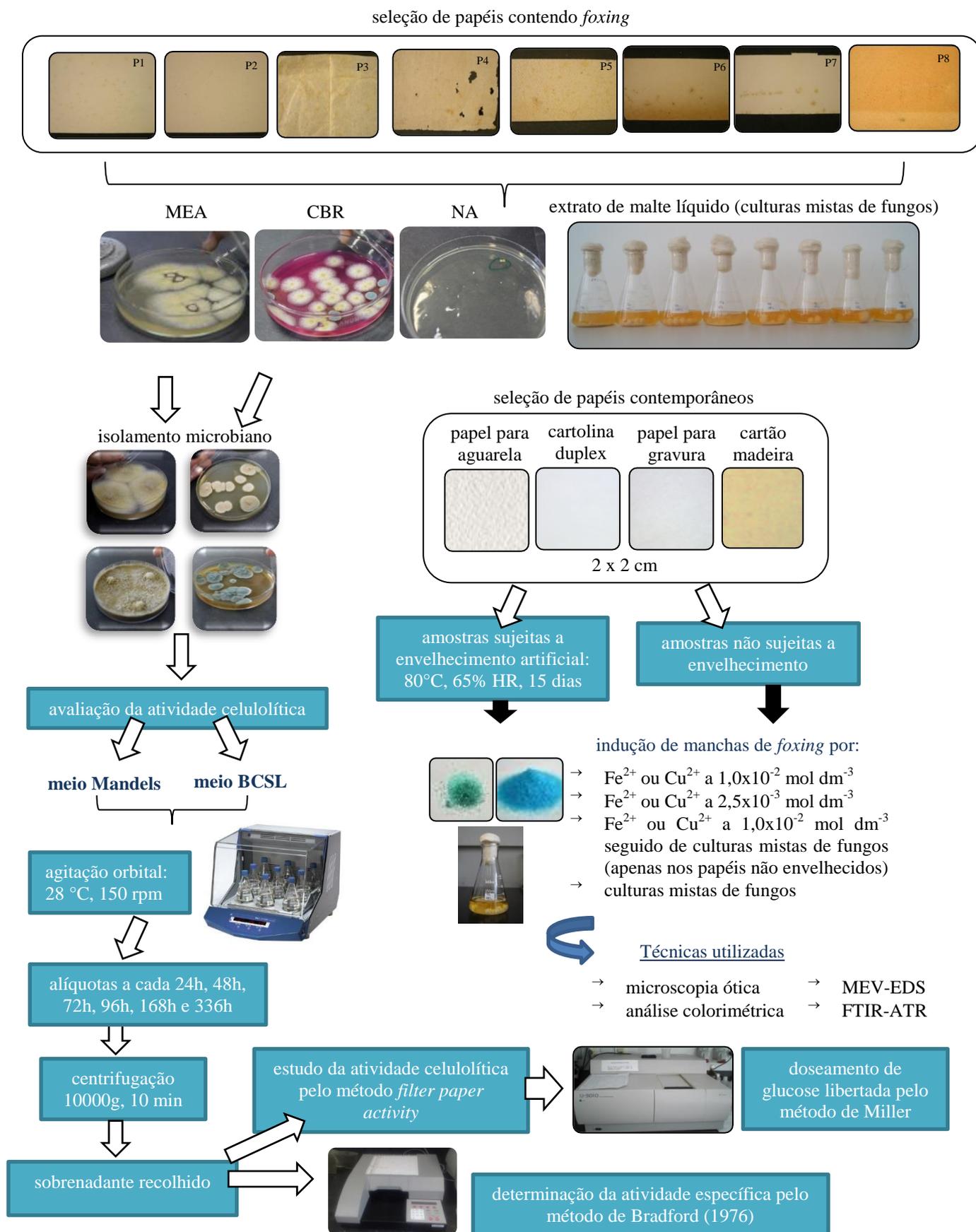
TÉCNICAS UTILIZADAS

Para a caracterização dos papéis e das manchas induzidas foram utilizadas técnicas de análise não destrutivas, como a microscopia ótica, a análise colorimétrica, a microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada. Iniciaram-se ainda estudos de difração de raios-X para avaliar o grau de cristalinidade da celulose no papel natural e na zona das manchas, mas que não são apresentados neste trabalho revelando, no entanto, as potencialidades da aplicação desta técnica a esta problemática. Na determinação da atividade celulolítica foi utilizado um espectrofotómetro de absorção molecular no UV/VIS.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Na validação estatística dos resultados enzimáticos utilizou-se o programa SPSS para Windows, versão 20, Copyright[©], Microsoft Corporation. Foram estudadas as diferenças encontradas nos níveis de atividade do enzima, para todos tempos das culturas, recorrendo ao teste de análise de variância (ANOVA). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Levene e a comparação múltipla das médias foi realizada com o teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

2.2. DIAGRAMA DE TRABALHO

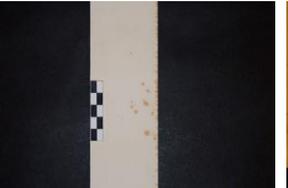


2.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1. SELEÇÃO DE PAPÉIS CONTENDO *FOXING*

Foram seleccionados oito papéis (P1 a P8) contendo *foxing*, guardados para estudos desta natureza no Laboratório José de Figueiredo. Estes papéis têm natureza e funções diversas e apresentam manchas de *foxing* com tipologias distintas. Na Tabela 2.1. é feita uma descrição da função de cada um dos papéis e é apresentada uma imagem fotográfica obtida com luz branca.

Tabela 2.1. Descrição dos papéis P1 a P8 contendo *foxing* natural

P1	P2	P3	P4
			
<p>passe-partout (séc. XX) , de um quadro J.Glamma Stroberke</p>	<p>papel cartonado, (séc. XX), utilizado como parte posterior do retrato de “Sra D. Ana de Sotto Maior”</p>	<p>papel de cenário antigo (séc. XX)</p>	<p>papel de seda (séc. XX)</p>
P5	P6	P7	P8
			
<p>cartão grosso (séc. XX) sem acabamento superficial, utilizado como parte posterior do quadro “O Semeador”</p>	<p>cartão fino (séc. XX), utilizado como parte posterior da aguarela “João de Deus”</p>	<p>passe-partout de 3 fotos (séc. XX)</p>	<p>papel madeira (séc. XX), produzido com pasta mecânica. Museu Nacional Soares dos Reis</p>

2.3.2. ESTUDO MICROBIOLÓGICO DOS PAPÉIS P1 A P8

2.3.2.1. CARATERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

De cada papel indicado na Tabela 2.1 cortou-se uma amostra de (1x1) cm de uma zona contendo *foxing* e que foi colocada num tubo de ensaio estéril contendo 2000 μL de soro estéril. Os tubos foram submetidos a agitação orbital a 28 °C e 150 rpm durante 1 h. Seguidamente, de cada tubo retiraram-se volumes de 200 μL ou de 100 μL , que foram inoculados em placas de Petri, respetivamente, com malte extrato agar (MEA) e rosa de Bengala cloranfenicol (CBR) para crescimento fúngico e nutriente agar (NA) para crescimento bacteriano, utilizando como procedimento a técnica de espalhamento. No Anexo I é indicada a composição de todos os meios de cultura utilizados. As placas de crescimento fúngico foram inoculadas a 28 °C durante 5 dias e as de crescimento bacteriano a 30 °C durante 2 dias. Adicionalmente, de cada tubo de ensaio retiraram-se 1000 μL e colocaram-se em Erlenmeyers (Fig. 2.1) contendo extrato de malte líquido para obtenção de culturas mistas. Este meio foi colocado em agitação orbital a 28 °C e 150 rpm.



Figura 2.1. Culturas mistas

2.3.2.2. ISOLAMENTO MICROBIANO

O isolamento microbiano foi efetuado utilizando as placas de Petri com MEA, CBR e NA referidas no ponto anterior. Apenas foram isoladas as colónias morfologicamente diferentes utilizando o MEA para fungos, designados por F_I a F_{IV} , e o

NA para bactérias, designadas por B_I a B_{III}. Foram feitas 3 repicagens de cada colónia seguindo todos os cuidados de assepsia. As estirpes isoladas foram passadas para rampas com MEA ou NA, consoante o caso, e armazenadas a 4 °C para posterior utilização, tendo o cuidado de repicar os isolados de 2 em 2 meses.

2.3.2.3. IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

A análise de fungos foi feita por observação macroscópica e microscópica das estirpes isoladas de forma a identificar as estruturas reprodutoras, micélios e esporos. Para a sua caracterização foram feitas preparações a fresco utilizando o corante azul de metileno e que foram posteriormente observadas ao microscópio ótico Leica DM2500P com as objetivas de 10x, 20x, 40x e 100x. Quanto às bactérias, demonstraram um crescimento atípico e bastante reduzido, não se realizando assim estudos de caracterização.

2.3.2.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Utilizaram-se os quatro isolados fúngicos F_I a F_{IV}, obtidos nos pontos anteriores, e uma estirpe com atividade celulolítica conhecida (*Trichoderma harzianum* CCMI 783) de uma coleção de culturas para termo de comparação.

Para a produção de celulasas inocularam-se 10 rampas com meio sólido malte extrato agar que foram incubadas durante 5 dias a 28 °C. Prepararam-se 5 Erlenmeyers contendo 100 mL de meio Mandels e outros 5 contendo 100 mL de meio BCSL, arrastando a biomassa presente nas rampas. Os meios de cultura foram mantidos sob agitação orbital a 28°C e 150 rpm. Ao fim de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h e 336 h foram retiradas alíquotas e submetidas a centrifugação a 10000g durante 10 min. O sobrenadante da cultura foi recolhido e foi estudada a atividade celulolítica pelo método *filter paper activity* (FPA) utilizando o procedimento de Ghose (1987). Neste método utilizou-se como substrato o papel de filtro Whatman nº1, cortado em tiras de (1x6) cm com uma massa de aproximadamente 50 mg. O substrato foi colocado em tubos de ensaio e adicionou-se 1 mL de tampão citrato a 0,05 mol dm⁻³ (pH 4,8) e 0,5 mL do extrato enzimático (sobrenadante das culturas anteriormente referidas). A reação enzimática

ocorreu a 50°C, durante 60 min. O método de Miller (1959) foi usado para dosar a quantidade de glucose libertada pela reação com ácido dinitrossalicílico (DNS). Este método baseia-se na redução alcalina do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, sendo os grupos carbonilos da glucose oxidados a carboxilo. Assim, após o aquecimento de 60 min, foram transferidos 0,5 mL da mistura reacional para tubos contendo 0,5 mL do reagente DNS e foram colocados a 100 °C durante 5 min. Adicionou-se a cada tubo 5 mL de água destilada. A absorvância da solução final foi lida a 540 nm contra um branco de água destilada que sofreu o mesmo tratamento. A curva de calibração foi feita com soluções padrão de glucose com concentrações entre 50 e 1000 mgL⁻¹. Fizeram-se triplicados das amostras e dos padrões.

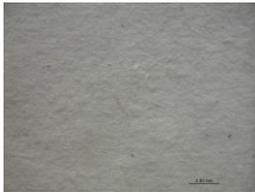
Paralelamente, determinou-se a atividade celulolítica específica que foi expressa por número de unidades de enzima por miligrama de proteína (U/mg proteína). O método de Bradford (1976) é um método colorimétrico que foi utilizado na determinação do teor proteico, sendo baseado na mudança de cor de um reagente (azul brilhante de Coomassie G) de castanho para azul após a ligação à proteína. As amostras foram preparadas colocando numa microplaca 100 µL de extrato enzimático (sobrenadante das culturas anteriormente referidas) e 100 µL de azul brilhante de Coomassie G. Prepararam-se também soluções padrão de BSA (albumina sérica bovina) a 1, 2, 5, 10, 15 e 20 µg mL⁻¹ a partir da solução mãe de 2 mg mL⁻¹. Ao fim de 2 min foi lida a absorvância de cada amostra e padrão, a 630 nm, num leitor de microplacas. As amostras e padrões foram preparados em triplicado.

Recorreu-se à validação estatística dos resultados enzimáticos utilizando o programa SPSS para Windows, versão 20.0, Copyright[®], Microsoft Corporation. Consideraram-se as percentagens de atividade enzimática como variáveis dependentes e os tempos que as culturas mistas de fungos estiveram em incubação como variáveis independentes. As diferenças encontradas nos níveis de atividade do enzima, para todos tempos das culturas, foram estudadas recorrendo ao teste de análise de variância (ANOVA). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Levene e a comparação múltipla das médias foi realizada com o teste de Tukey para um nível de significância de 5%.

2.4. SELEÇÃO DE PAPÉIS CONTEMPORÂNEOS

No estudo a desenvolver sobre a indução de manchas de *foxing* em papel utilizaram-se quatro tipos de papel contemporâneo: papel para aguarela da Canson (Arches (56x66) cm); cartolina duplex e papel para gravura da Fabriano (Rosaspina Ivory (50x70) cm); cartão madeira da Canson, selecionados com a ajuda das conservadoras-restauradoras da área do papel do Instituto José de Figueiredo, Francisca Figueira e Joana Campelo. Estes papéis foram escolhidos por terem características/constituintes diferentes e testar a tendência dos mesmos para uma maior ou menor formação de *foxing*. Na Tabela 2.2 é apresentada uma imagem de microscopia ótica de cada um destes papéis e a informação conhecida, obtida a partir dos fornecedores, sobre a sua produção.

Tabela 2.2. Imagens de microscopia ótica e descrição dos quatro papéis

papel	imagem de microscopia ótica	descrição
papel para aguarela		gramagem: 300g/m ² ; isento de ácidos; pH neutro; atóxico; barreira alcalina; isento de branqueador ótico; 100% algodão; encolagem de gelatina; acabamento rugoso; fungicida incorporado; grande consistência e durabilidade; utilizado maioritariamente em técnicas à base de água
cartolina duplex		fabricado com pastas virgens, aparas e papel reciclado; elevada rigidez; possui um lado de cor branca e o verso de cor cinzenta; cobertura de pasta branqueada de fibra curta na frente e o verso de pasta mecânica
papel para gravura		gramagem: 285g/m ² ; 60% algodão; superfície de malte (fosca); isento de ácido, garantindo estabilidade e resistência ao envelhecimento; pH neutro; não possui encolagem
cartão madeira		100% madeira quimicamente tratada para aumentar a durabilidade; isento de ácido; pH neutro; fungicida e bactericida; cartão contracolado com cola neutra em camadas de 400g/m ² cada

2.5. INDUÇÃO DE MANCHAS DE FOXING

Os papéis contemporâneos foram cortados em amostras com a forma de quadrados de (2x2) cm e uma parte destas amostras foi envelhecida artificialmente numa câmara climática FITOCLIMA, no Instituto José de Figueiredo, a 80°C e 65% de humidade relativa durante 15 dias, de acordo com o procedimento seguido na bibliografia (Bicchieri *et al.*, 2002). Seguidamente, induziram-se manchas de *foxing* nos papéis envelhecidos e não envelhecidos, nas seguintes condições:

- 100 µL de solução de FeSO₄.7H₂O ou de CuSO₄.5H₂O a $1,0 \times 10^{-2}$ moldm⁻³;
- 100 µL de solução de FeSO₄.7H₂O ou de CuSO₄.5H₂O a $2,5 \times 10^{-3}$ moldm⁻³;
- 100 µL de solução de FeSO₄.7H₂O ou de CuSO₄.5H₂O a $1,0 \times 10^{-2}$ moldm⁻³ seguida de 250 µL de culturas mistas de fungos (só em papéis não envelhecidos);
- 250 µL de culturas mistas de fungos.

Ao longo de todo o trabalho as soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q da Millipore®.

2.6. TÉCNICAS DE ANÁLISE USADAS NA CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENTES AMOSTRAS

2.6.1. MICROSCOPIA ÓTICA

Utilizou-se a lupa binocular (microscópio estereoscópico) de marca Leica e modelo M205C (Fig. 2.2a) para análise de alterações morfológicas e cromáticas nos diferentes tipos de papel. Foi também utilizado um microscópio ótico marca Leica e modelo DM 2500P (Fig. 2.2b) para visualização e identificação de espécies fúngicas. A ambos os microscópios foi acoplada uma câmara digital Leica DFC 290 HD.

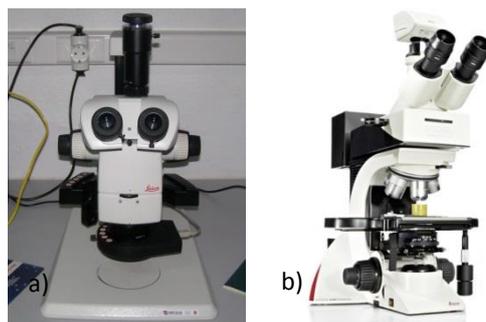


Figura 2.2. a) lupa binocular; b) microscópio ótico

2.6.2. ANÁLISE COLORIMÉTRICA

A cor dos papéis contemporâneos e das manchas de *foxing* induzidas foi avaliada por colorimetria para obtenção das coordenadas CIEL*a*b*C* e h°. As análises foram realizadas utilizando um espectrofotômetro CheckII® Plus da DataColor International, equipado com uma lâmpada de xénon como fonte de radiação e com um fotodíodo sensível à região de 750-360 nm



Figura 2.3. Colorímetro

do espectro eletromagnético como detetor. O aparelho foi calibrado de acordo com os padrões fornecidos pelo fabricante: um padrão para a zona do UV e dois padrões, um preto e um branco, para a zona do visível. As coordenadas CIEL*a*b*C*h° foram definidas em relação a um branco de referência, o iluminante D65. A análise foi feita a 10° de ângulo de observação, sem componente especular. O valor apresentado para cada parâmetro L*a*b*C* e h° é um valor médio da leitura efetuada em três pontos diferentes da amostra e de três leituras em cada ponto.

As medições podem ser efetuadas com a componente especular excluída (SCE) ou com a componente especular incluída (SCI). De acordo com a bibliografia (Prieto *et al.*, 2011) a geometria SCE parece ser mais adequada para a detecção de pequenas variações de cor em materiais diversos. O modo SCI inclui a refletância total (considerando tanto a reflexão especular como difusa), enquanto o modo SCE inclui a refletância difusa e exclui a maior parte da componente especular e é, por conseguinte, mais sensível às diferenças

de cor, devido a diferenças na rugosidade da superfície. Em geral, é aceite que o modo de SCE simula a visão a olho nu enquanto o modo de SCI é adequado para a análise da cor intrínseca de objetos. Por este motivo as análises foram feitas com modo SCE ativo.

2.6.3. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO E ESPECTROSCOPIA DE RAIOS-X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (MEV-EDS)

A microscopia eletrónica de varrimento permite obter imagens semelhantes às que se podem obter por microscopia ótica de reflexão, mas numa gama de ampliação extraordinariamente superior. A esta técnica está geralmente associada a técnica de espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS) que permite uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos na superfície dos materiais (Sá, 2001).

As análises por microscopia eletrónica de varrimento (MEV) e microanálise por raios X (EDS) foram realizadas usando um microscópio eletrónico de varrimento HITACHI S-3700N com um espectrómetro de raios X por dispersão em energia Brüker Xflash 5010 acoplado (Fig. 2.4). As análises foram realizadas com uma pressão de ar na câmara de 20 Pa, evitando revestir as amostras com material condutor como o Au ou a grafite. As análises de EDS foram realizadas com uma aceleração de 20 kV e as imagens foram obtidas em modo de elétrons retrodifundidos a 10 kV ou a 15 kV.



Figura 2.4. Microscópio eletrônico de varrimento com detector de EDS

2.6.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER EM MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FT-IR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) é um das técnicas mais importantes na identificação e caracterização de materiais pois permite estudar tanto compostos orgânicos como inorgânicos (Manso *et al.*, 2009). A espectroscopia de IV no modo de reflexão total atenuada (ATR) é uma técnica utilizada em amostras sólidas e líquidas sem necessitar preparação prévia da amostra.

Na análise das amostras foi utilizado um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), modelo ALPHA da Brüker com um módulo de ATR QuickSnap™ com cristal de diamante acoplado (Fig. 2.5). Cada espectro resulta da acumulação de 128 varrimentos, traçados com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} , na gama de números de onda entre 4000 e 375 cm^{-1} .



Figura 2.5.Espectrômetro de IV com módulo de refletância total atenuada

2.6.5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO UV/VIS

A espectroscopia de absorção molecular no UV/VIS é uma das técnicas mais usadas em determinações analíticas em diversas áreas, sendo extremamente útil na identificação dos grupos funcionais de moléculas.

Na determinação da atividade celulolítica quantificaram-se os glúcidos redutores obtidos a partir da celulose utilizando um espectrofotómetro de absorção molecular no UV/Vis de marca e modelo Hitachi U-3010 (Fig. 2.6). A absorvância foi lida a 540 nm.



Figura 2.6. Espectrofotómetro de absorção molecular no UV/VIS

Na determinação da concentração de proteína total foi utilizado um leitor de microplacas de marca BioTek® (Fig. 2.7). A absorvância foi lida a 630 nm. O leitor de microplacas é um espectrofotómetro no UV/VIS que permite a medição simultânea de várias amostras. Este equipamento apresenta um sistema ótico com monocromador que permite a seleção de quaisquer comprimentos de onda e tem capacidade de analisar placas desde 6 a 384 poços.

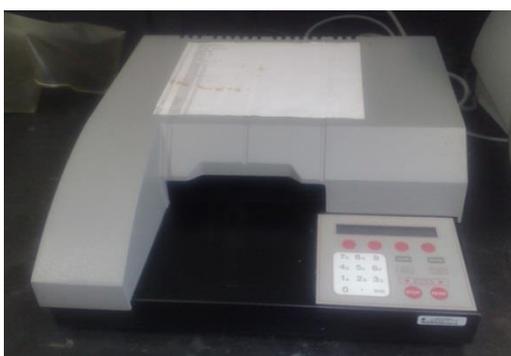


Figura 2.7. Leitor de microplacas

Resultados e Discussão

3.1. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA

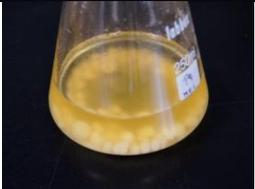
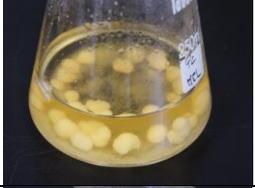
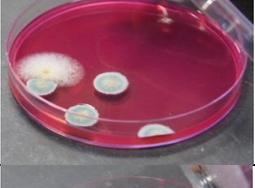
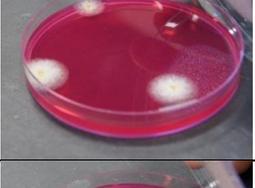
Após o processo de seleção de papéis contendo *foxing*, descrito no capítulo anterior, procedeu-se ao estudo microbiológico dos mesmos, utilizando meios de cultura seletivos.

Para a avaliação da contaminação bacteriana, efetuaram-se ensaios de enumeração em meio de nutriente agar, como descrito no capítulo 2 da Metodologia. Apenas ocorreu crescimento bacteriano nas manchas de *foxing* correspondentes aos papéis P2, P5 e P8, com 10 UFC/cm² para a amostra de papel P2 e P5 e 20 UFC/cm² para o P8.

Na Tabela 3.1 são apresentados os resultados relativos ao crescimento fúngico obtidos a partir dos papéis P1 a P8, contendo *foxing* natural. O papel que mostrou maior nível de contaminação fúngica correspondeu ao papel P1 com 100 UFC/cm² no meio MEA e 128 UFC/cm² no meio de cultura CBR. Nas placas de Petri com meio MEA foi possível isolar duas estirpes fúngicas nos papéis P1 a P4 e P8 e apenas uma estirpe fúngica nos papéis P5 a P7. Nas culturas efetuadas em meio CBR, isolou-se uma estirpe fúngica correspondente ao papel P7 e duas estirpes para os restantes papéis. Na globalidade dos ensaios, isolaram-se microrganismos semelhantes de papéis com diferentes proveniências contendo *foxing* o que pode ser indicativo da capacidade de algumas espécies fúngicas apresentarem atividade metabólica nesses microambientes.

Paralelamente aos ensaios de isolamento em meios sólidos, efetuaram-se culturas líquidas, em extrato de malte, que foram inoculadas com os diferentes papéis (culturas mistas). As culturas mistas que apresentaram maior crescimento fúngico foram as inoculadas com o papel P1 e P2. Na 3^a coluna da Tabela 3.1 pode observar-se o aspeto destas culturas após 5 dias de crescimento. Todas as culturas apresentaram a formação de agregados micelares, formando *pellets*. Nas culturas correspondentes aos papéis P5 e P7 estes agregados atingiram dimensões superiores a 2 cm de diâmetro (Tabela 3.1). Estes resultados mostram que os papéis contendo *foxing* apresentam contaminação microbiológica. Maioritariamente são os fungos filamentosos que predominam nestas zonas de *foxing*, evidenciando a contribuição destes microrganismos na degradação do papel.

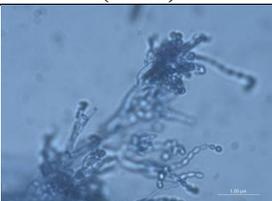
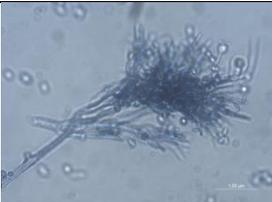
Tabela 3.1. Imagens fotográficas de crescimento fúngico referente às amostras de papel contendo *foxing*, P1 a P8

papel	crescimento fúngico		
	meio MEA	meio CRB	culturas mistas
P1			
P2			
P3			
P4			
P5			
P6			
P7			
P8			

3.1.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES FÚNGICAS

Após o isolamento das quatro estirpes fúngicas diferentes das oito amostras de papel, efetuou-se a caracterização macroscópica dos micélios (Tabela 3.2, coluna 1) e a observação microscópica das hifas e estruturas reprodutoras (Tabela 3.2, coluna 2). De acordo com a observação das estruturas reprodutoras foi possível classificar os quatro isolados no género *Penicillium*.

Tabela 3.2. Imagens fotográficas e de microscopia ótica das estirpes fúngicas F_I a F_{IV}

	imagem fotográfica	imagem de microscopia ótica (100x)	classificação
F_I			<i>Penicillium sp1</i>
F_{II}			<i>Penicillium sp2</i>
F_{III}			<i>Penicillium sp3</i>
F_{IV}			<i>Penicillium sp4</i>

3.1.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Tendo em conta os microrganismos isolados, fungos filamentosos do género *Penicillium*, e a composição dos papéis, maioritariamente celulose, efetuaram-se ensaios de atividade celulolítica para as 4 estirpes fúngicas isoladas neste trabalho. Incluiu-se neste estudo uma estirpe de *Trichoderma harzianum* (CCMI 783) de atividade celulolítica conhecida. A atividade enzimática efetuou-se em culturas líquidas destes microrganismos e monitorizou-se durante 14 dias de crescimento (secção 2.3.2.4 da Metodologia).

A avaliação desta atividade efetuou-se em dois meios de cultura: meio Mandels e meio BCSL (anexo I). O meio Mandels é um meio de cultura definido e o meio BCSL é suplementado com *corn steep liquor*. Ambos os meios possuem disponibilidade de celulose para o crescimento das culturas.

Na Fig. 3.1 são apresentados os resultados da atividade celulolítica em meio de Mandels. Existem diferenças significativas de atividade entre os diferentes fungos testados ($p < 0,05$) (anexo II).

A cinética de produção destes enzimas foi diferente nas estirpes fúngicas estudadas. A cultura *Penicillium* sp1 apresentou a maior atividade celulolítica às 96h de cultura. Na cultura *Penicillium* sp2 a produção da celulase foi aumentando significativamente ao longo do tempo até às 168h. Para as restantes estirpes os valores mais elevados de atividade celulolítica observaram-se às 48h, nas culturas de *Penicillium* sp3 e às 96h na cultura *Penicillium* sp4.

Todos os fungos estudados têm capacidade de produzir celulases, no entanto a maior atividade celulolítica foi obtida na cultura de *Penicillium* sp3, apresentando níveis próximos de *Trichoderma harzianum* CCMI 783 (controlo positivo). A cultura *Penicillium* sp3 apresenta um maior potencial biodeteriogénico para o papel.

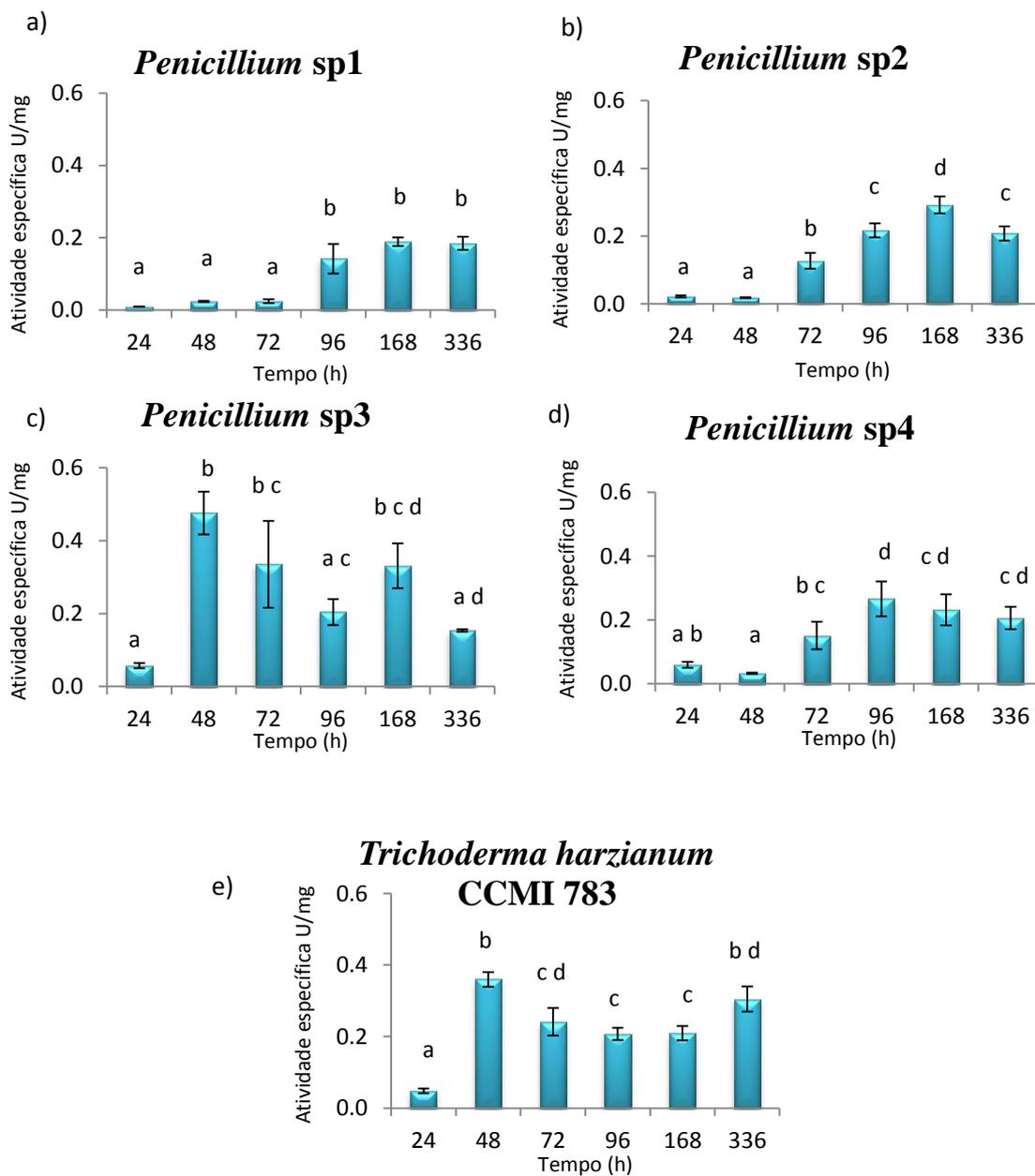


Figura 3.1. Atividade celulolítica específica de culturas em meio Mandels de a) *Penicillium sp1*; b) *Penicillium sp2*; c) *Penicillium sp3*; d) *Penicillium sp4*; e) *Trichoderma harzianum* CCM 783. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A Fig 3.2 apresenta os resultados de atividade celulolítica para as cinco estirpes em estudo no meio BCSL, durante as 336h do ensaio. Observaram-se diferenças significativas na atividade celulolítica das 5 estirpes ($p < 0,05$), no entanto a cinética de produção do enzima parece não aumentar a partir das 24h de cultura, na cultura de

Trichoderma harzianum CCMI 783, controlo positivo, observou-se mesmo um decréscimo de atividade às 48h.

A cultura de *Penicillium* sp4 apresentou maior atividade específica neste meio de cultura. Assim, tendo em conta os resultados de atividade celulolítica nestes dois meios de cultura, as estirpes *Penicillium* sp3 e sp4 apresentam maior potencial biodeteriorogénico na degradação de substratos celulósicos.

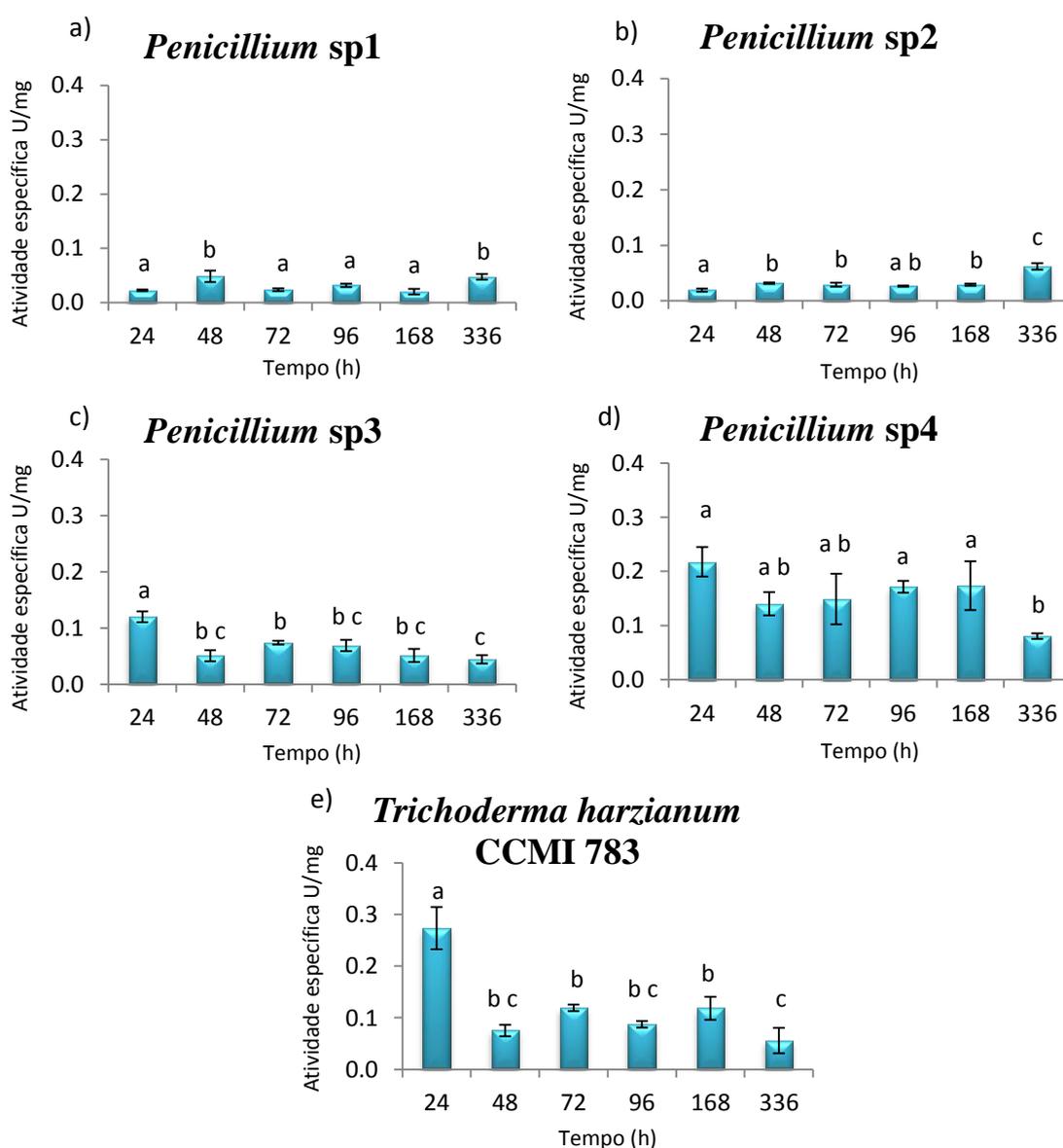


Figura 3.2. Atividade celulolítica específica de culturas em meio BCSL de a) *Penicillium* sp1; b) *Penicillium* sp2; c) *Penicillium* sp3; d) *Penicillium* sp4; e) *Trichoderma harzianum* CCMI 783. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.2. INDUÇÃO DE MANCHAS DE *FOXING* EM PAPÉIS CONTEMPORÂNEOS

Induziram-se manchas de *foxing* em provetes de papel (papel para aguarela, cartolina duplex, papel para gravura, cartão madeira) usando 8 culturas mistas (CM1 a CM8) produzidas a partir de amostras de *foxing*. Os resultados destes ensaios mostraram que as culturas CM1, CM4, CM6 e CM7 produziram maior nível de alteração cromática nas provetes de papel. Estas culturas foram selecionadas para induzir *foxing* no papel envelhecido.

As Tabelas 3.3 a 3.6 mostram imagens das manchas de *foxing* induzidas com iões Fe^{2+} , com iões Cu^{2+} , com CM4 e com a combinação dos iões e CM4. Selecionou-se a cultura mista CM4 por ser a mais exuberante nas alterações produzidas nos papéis utilizados e ainda por esta cultura mista ter presente as quatro estipes de *Penicillium* isoladas neste trabalho. As restantes condições testadas no ensaio encontram-se no anexo III.

INDUÇÃO DE *FOXING* EM PAPEL PARA AGUARELA

Na Tabela 3.3 são apresentadas imagens de microscopia ótica do papel para aguarela após a indução de *foxing*. O papel envelhecido encontra-se mais degradado com contornos mais escurecidos na periferia da mancha. Nestes contornos é evidente a presença de cristais, que aparecem como um depósito ao longo das fibras de celulose. A presença dos fungos também parece ter alterado o papel o qual apresenta um aspeto mais degradado. Neste tipo de papel o envelhecimento parece promover uma maior atividade fúngica em todas as condições utilizadas.

INDUÇÃO DE *FOXING* EM CARTOLINA DUPLEX

Na cartolina duplex ocorreram maiores alterações nas amostras com manchas induzidas por ião Fe^{2+} , com manchas induzidas pela presença das culturas mistas de fungos e pela indução conjunta de *foxing* por ião Fe^{2+} e microrganismos. Estes resultados

estão apresentados na Tabela 3.4. Na presença do ião ferroso, os fungos desenvolveram-se de tal forma que cobrem completamente a mancha amarela causada pelo ião Fe^{2+} . Nos papéis contendo ião Cu^{2+} , a indução da mancha é mais evidente no papel envelhecido e em relação ao desenvolvimento dos fungos na presença deste ião o crescimento foi reduzido.

INDUÇÃO DE FOXING EM PAPEL PARA GRAVURA

O *foxing* induzido no papel para gravura, Tabela 3.5, apresentou uma evolução semelhante ao *foxing* induzido no papel para aguarela. As alterações provocadas pelo ião Fe^{2+} são bastante evidentes e no caso do ião Cu^{2+} , na concentração mais elevada, observa-se os contornos das manchas que correspondem à presença de cristais de diferentes tamanhos que se depositam nas fibras de celulose. Os fungos também apresentaram um desenvolvimento bastante acentuado.

INDUÇÃO DE FOXING EM CARTÃO MADEIRA

No cartão madeira, a produção de *foxing* pelos iões metálicos não foi tão evidente como nos papéis descritos anteriormente. A Tabela 3.6. mostra alguns aspetos macroscópicos e microscópicos destes ensaios. Apenas se observa uma mancha mais escura, não ocorrendo alteração da cor do papel pelo ião. Estas alterações menos acentuadas podem dever-se ao facto de este cartão ser contracolado em várias camadas e apresentar uma elevada absorção. No entanto, os fungos apresentaram desenvolvimento bastante acentuado, sendo mais evidente no papel não envelhecido com a mancha induzida pela CM4.

Tabela 3.3. Manchas de foxing induzidas em papel para aguarela. Utilizou-se a cultura mista CM4

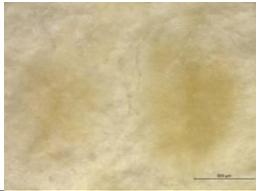
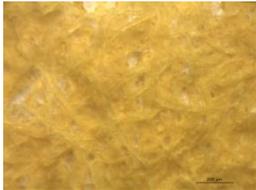
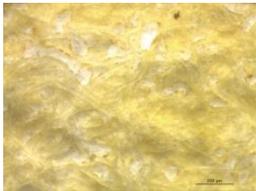
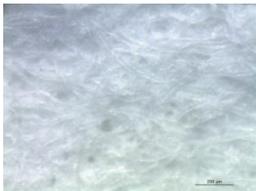
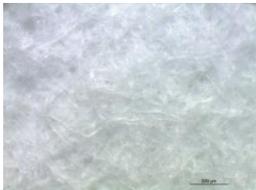
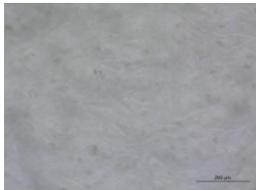
		não envelhecido		envelhecido	
CM4		(0,78x) 	(12,5x) 	(0,78x) 	(6,3x) 
	Fe ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 
2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³		(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(12,5x) 
1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³ CM4		(0,78x) 	(12,5x) 	X	
Cu ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(10x) 
	2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(12,5x) 
	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³ CM4	(0,78x) 	(12,5x) 	X	

Tabela 3.4. Manchas de *foxing* induzidas em cartolina duplex. Utilizou-se a cultura mista CM4

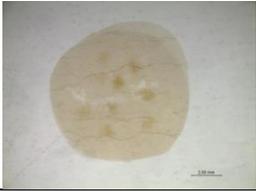
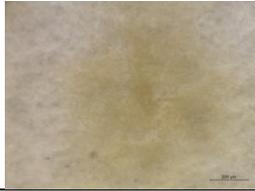
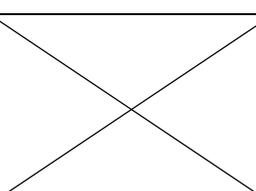
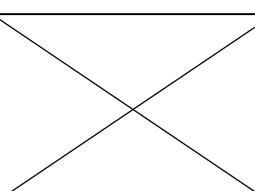
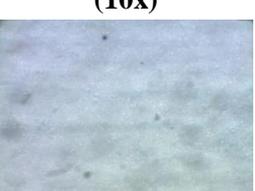
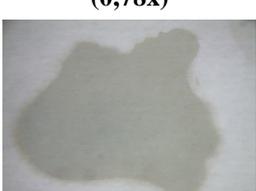
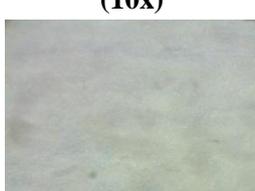
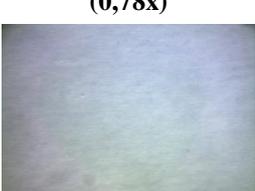
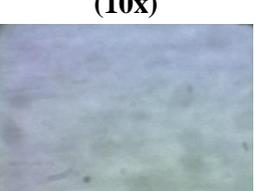
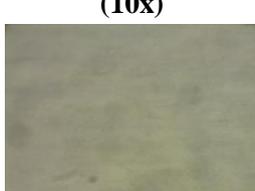
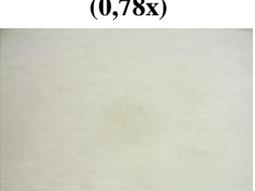
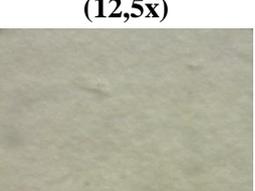
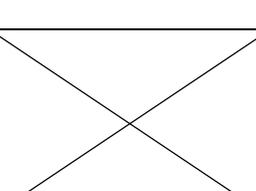
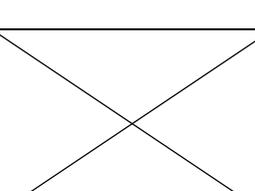
		não envelhecido		envelhecido	
CM4		(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(12,5x)
					
Fe ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(10x)
					
	2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³	(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(10x)
					
1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	CM4	(0,78x)	(10x)		
					
Cu ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(10x)
					
	2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³	(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(10x)
					
1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	CM4	(0,78x)	(12,5x)		
					

Tabela 3.5. Manchas de foxing induzidas em papel para gravura. Utilizou-se a cultura mista CM4

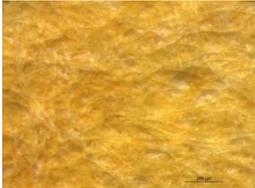
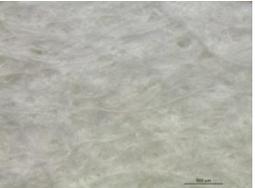
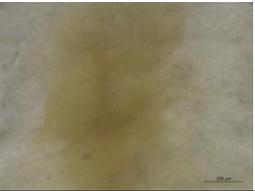
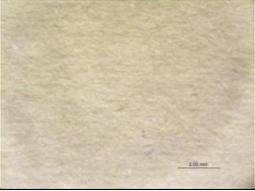
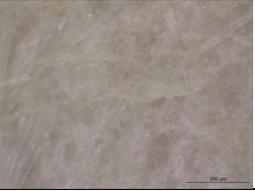
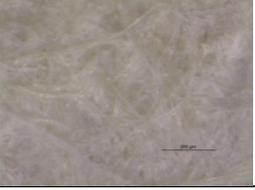
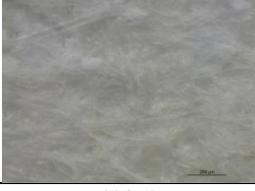
		não envelhecido		envelhecido	
CM4		(0,78x) 	(12,5x) 	(0,78x) 	(10x) 
	Fe ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 
2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³		(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(10x) 
1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³ CM4		(0,78x) 	(10x) 	X	
Cu ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(10x) 
	2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(10x) 
	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³ CM4	(0,78x) 	(12,5x) 	X	

Tabela 3.6. Manchas de *foxing* induzidas em cartão madeira. Utilizou-se a cultura mista CM4

		não envelhecido		envelhecido	
CM4		(0,78x) 	(12,5x) 	(0,78x) 	(10x) 
Fe ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(12,5x) 
	2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(10x) 
	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³ CM4	(0,78x) 	(12,5x) 	X	
Cu ²⁺	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(10x) 
	2,5x10 ⁻³ mol dm ⁻³	(0,78x) 	(10x) 	(0,78x) 	(10x) 
	1,0x10 ⁻² mol dm ⁻³ CM4	(0,78x) 	(12,5x) 	X	

Foi possível induzir manchas de *foxing* utilizando íons Fe^{2+} , íons Cu^{2+} , culturas mistas de fungos e pela combinação dos íons com as culturas mistas. O efeito sinérgico da presença dos íons e das células fúngicas promove o aparecimento de manchas mais pronunciadas, evidenciadas pelas alterações cromáticas dos provetes de papel e pela maior fragilidade das fibras, confirmada microscopicamente. A ação dos microrganismos nestes processos de degradação parece ter uma forte ligação com a produção de enzimas extracelulares com capacidade celulolítica. Bhat (2000) também refere que o aumento da produção de enzimas celulolíticos pode conduzir a uma redução das propriedades de resistência das fibras de papel.

3.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MORFOLÓGICA DE PAPÉIS CONTEMPORÂNEOS E MANCHAS DE *FOXING* ARTIFICIALMENTE INDUZIDAS

3.3.1 ANÁLISE COLORIMÉTRICA

Foram feitos ensaios colorimétricos para avaliar as alterações que ocorreram do ponto de vista cromático nos diferentes papéis, utilizando o espaço de cor CIELAB.

A colorimetria dos papéis contemporâneos foi realizada nas manchas induzidas por:

- soluções de íons metálicos, ao fim de 4 dias no papel natural (não envelhecido), de forma a estabilizar a mancha, e após os 15 dias que os papéis estiveram na estufa para envelhecimento artificial;
- culturas mistas de fungos (CM1 a CM8), obtidas a partir de papéis contendo *foxing* (P1 a P8), ao fim de 2 e 3 meses no papel natural e ao fim de 1 semana, 1 mês, 2 e 3 meses no papel envelhecido;
- soluções de íons metálicos seguidas de culturas mistas de fungos, ao fim de 2 e 3 meses, apenas no papel natural.

Nos resultados a seguir apresentados, no que diz respeito às culturas mistas, apenas é mostrado o resultado da CM4, pois foi a que mostrou mais alterações e além disso nesta cultura estão presentes as quatro estirpes fúngicas. Neste caso, o controlo utilizado, consistiu numa mancha induzida nos papéis contemporâneos, por malte extrato líquido (que apresenta uma coloração amarelada) e que foi o meio de cultura utilizado no crescimento dos fungos.

No anexo IV são apresentadas todas as tabelas com os valores das coordenadas $L^*a^*b^*C^*h^\circ$ dos quatro papéis contemporâneos.

MANCHAS INDUZIDAS POR IÃO Fe^{2+} OU POR IÃO Cu^{2+}

A representação da cromaticidade (a^* , b^*) dos papéis contemporâneos, com manchas induzidas por ião Fe^{2+} ou por ião Cu^{2+} em papel envelhecido e não envelhecido, são apresentadas nas Figs 3.3 a 3.6.

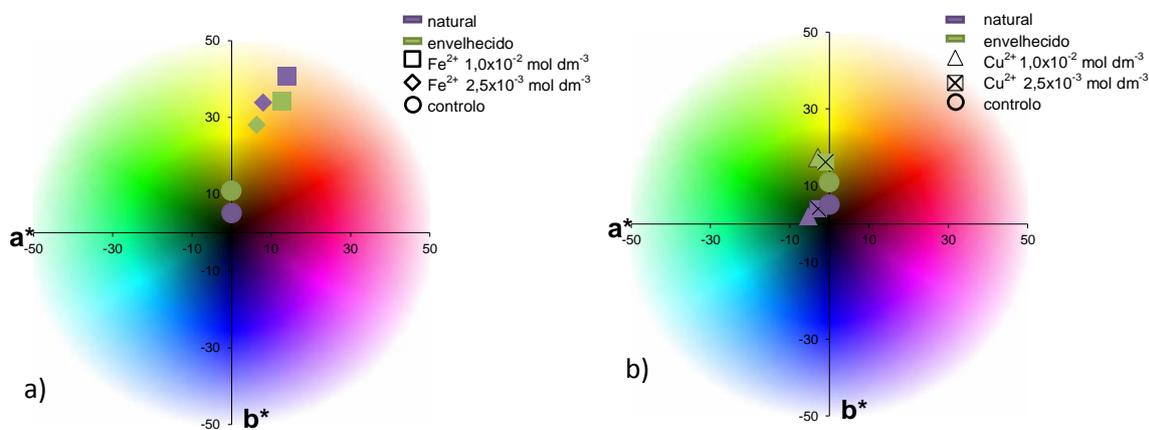


Figura 3.3. Variação da cromaticidade do papel para aguarela envelhecido e não envelhecido, com manchas induzidas por ião a) Fe^{2+} e b) Cu^{2+}

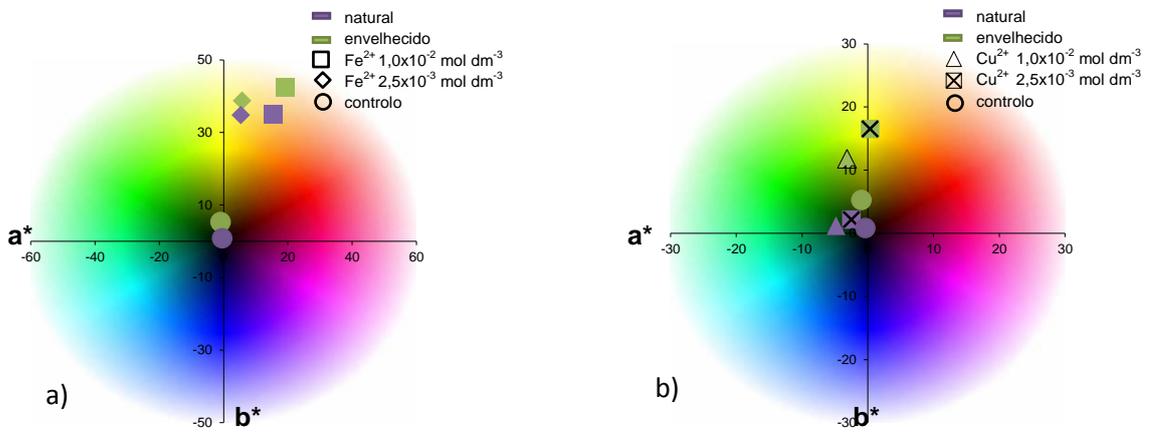


Figura 3.4. Variação da crominância da cartolina duplex envelhecida e não envelhecida, com manchas induzidas por ião a) Fe²⁺ e b) Cu²⁺

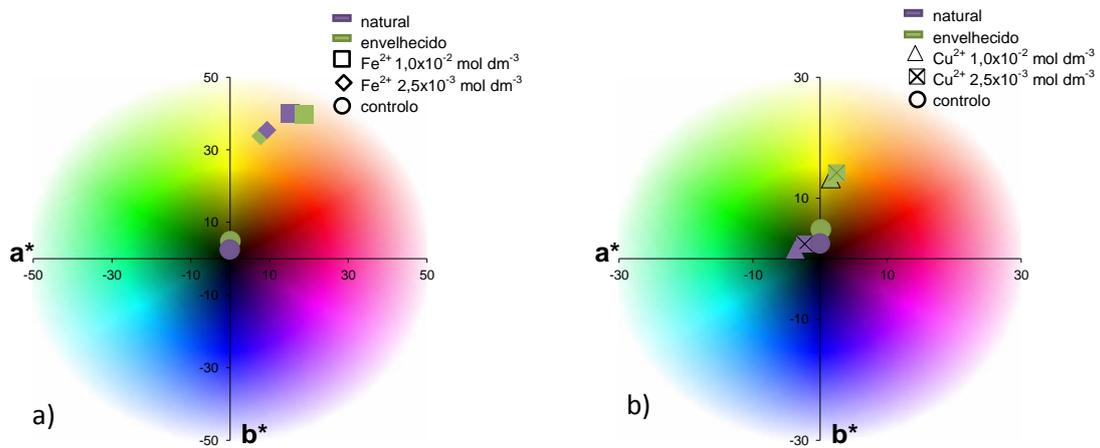


Figura 3.5. Variação da crominância do papel para gravura envelhecida e não envelhecida, com manchas induzidas por ião a) Fe²⁺ e b) Cu²⁺

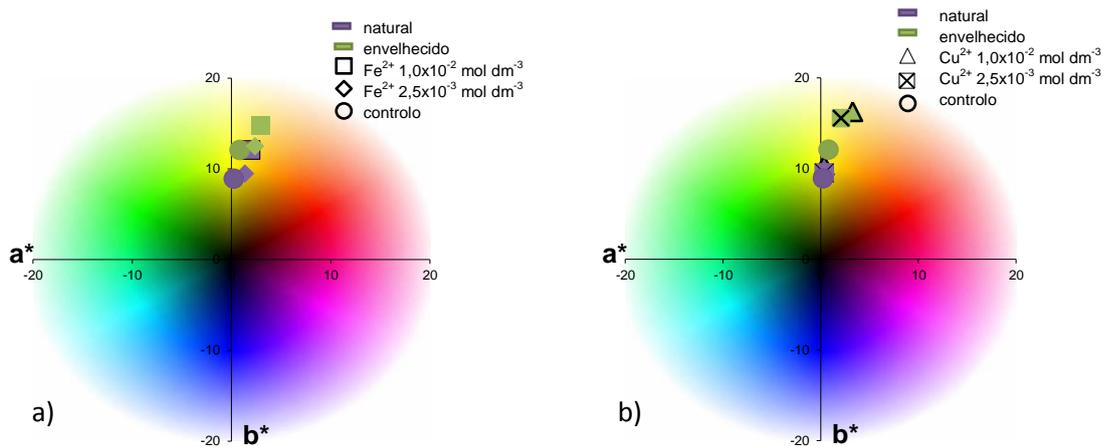


Figura 3.6. Variação da cromaticidade do cartão madeira envelhecida e não envelhecida, com manchas induzidas por ião a) Fe²⁺ e b) Cu²⁺

Da análise das Figs 3.3 a 3.6 em todos os papéis contemporâneos verificou-se uma diminuição da luminosidade quando o papel é envelhecido. Os papéis em que as manchas de *foxing* são induzidas por ião Fe²⁺, mostram um aumento das coordenadas a*, b* e C*, indicando que as manchas são mais avermelhadas e amareladas e que tem uma maior saturação da cor, respetivamente, o que se observa de modo mais acentuado quando a solução de ião Fe²⁺ é usada na concentração de 1,0x10⁻² mol dm⁻³. Quanto à indução de manchas pelo ião Cu²⁺, não é possível estabelecer um padrão comportamental, pois varia de papel para papel. No entanto, em geral, as manchas são mais azuladas e esverdeadas, exceto no caso do cartão madeira, em que a cor do próprio cartão natural deve influenciar a cor das manchas.

MANCHAS INDUZIDAS PELA CM4

A representação da cromaticidade (a*, b*) dos papéis contemporâneos, com manchas induzidas pela CM4 em papel envelhecido e não envelhecido, são apresentadas nas Figs 3.7 a 3.10.

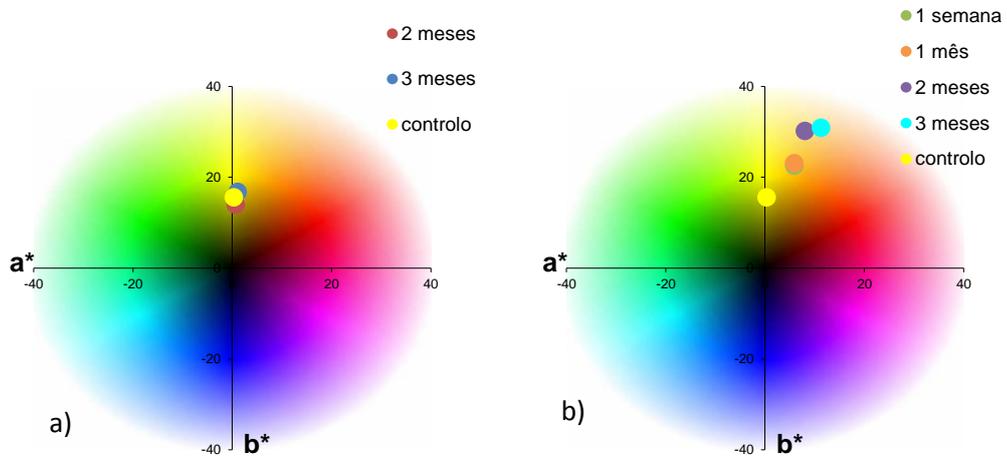


Figura 3.7. Variação da cromaticidade do papel para aguarela com manchas induzidas por culturas mistas de fungos em papel a) natural e b) envelhecido

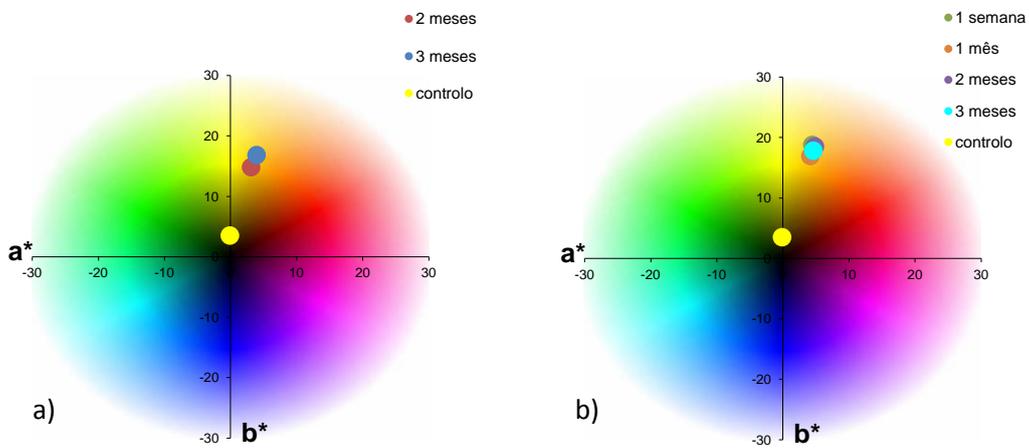


Figura 3.8. Variação da cromaticidade da cartolina duplex com manchas induzidas pela CM4 em papel a) natural e b) envelhecido

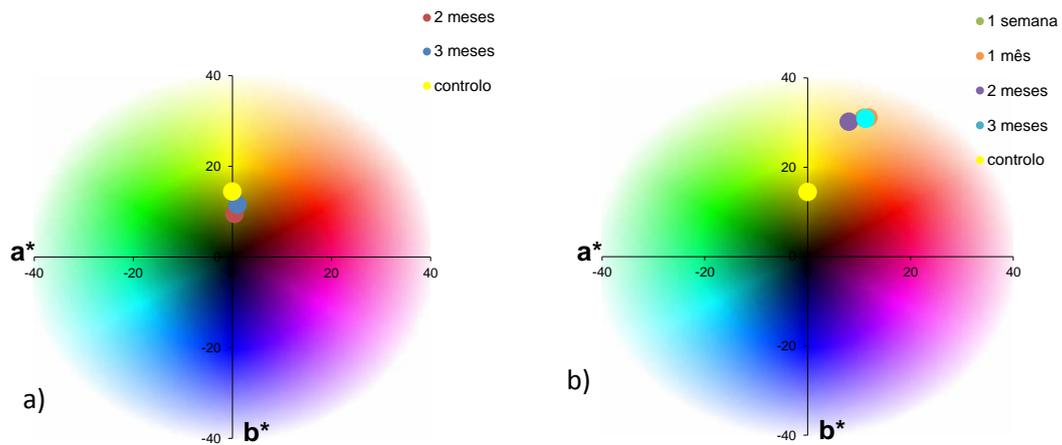


Figura 3.9. Variação da crominância do papel para gravura com manchas induzidas pela CM4 em papel a) natural e b) envelhecido

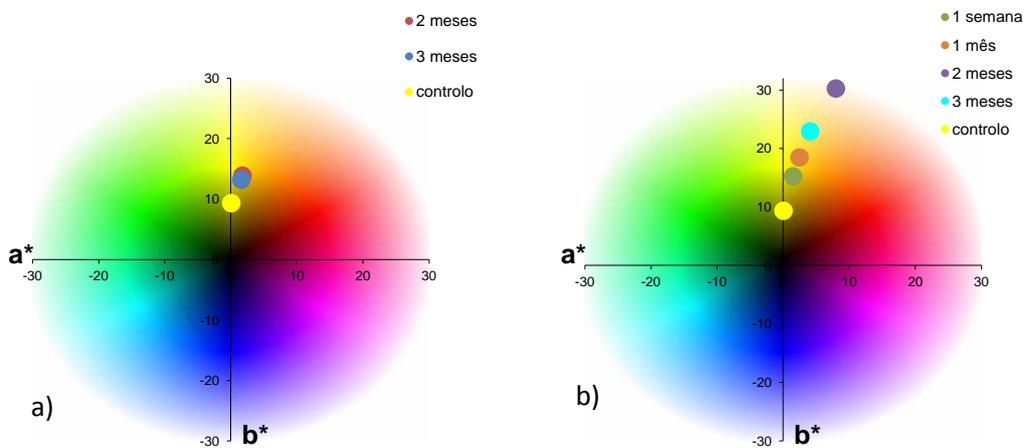


Figura 3.10. Variação da crominância do cartão madeira com manchas induzidas pela CM4 em papel a) natural e b) envelhecido

A partir da análise das Figs 3.7 a 3.10 verifica-se que os papéis na presença de culturas mistas de fungos produzem mais alterações quando o papel está envelhecido. Estas culturas quando induzidas no papel produzem uma mancha mais escura (diminuição

do L^*), mais avermelhada (aumento de a^*) e mais amarelada (aumento de b^*) e apresentam uma maior saturação da cor (aumento da coordenada C^*).

MANCHAS INDUZIDAS POR IÃO Fe^{2+} OU POR IÃO Cu^{2+} SEGUIDAS DA CM4

A representação da cromaticidade (a^* , b^*) dos papéis contemporâneos, com manchas induzidas por ião Fe^{2+} ou por ião Cu^{2+} (na concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) seguidas da CM4 em papel não envelhecido são apresentadas nas Figs 3.11 a 3.14.

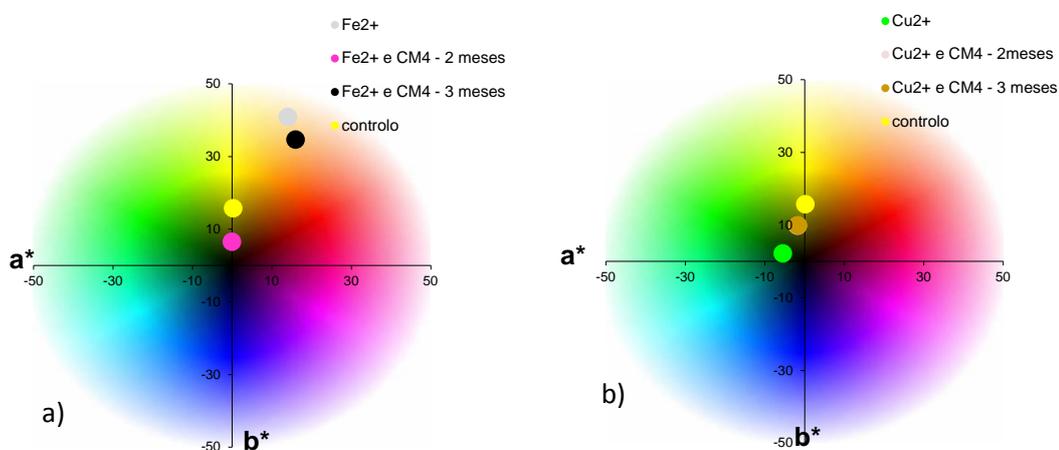


Figura 3.11. Variação da cromaticidade do papel para aguarela com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido da CM4 e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4

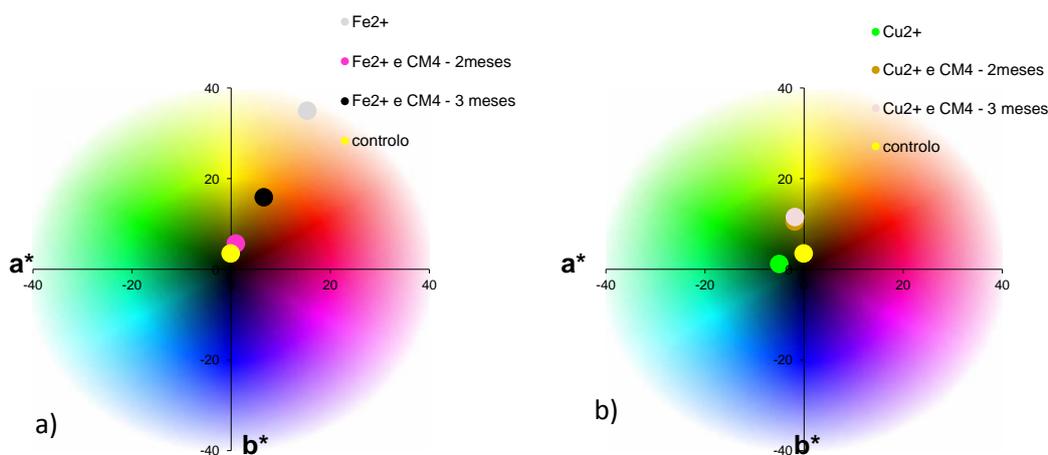


Figura 3.12. Variação da cromaticidade da cartolina duplex com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido de culturas mistas de fungos e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4

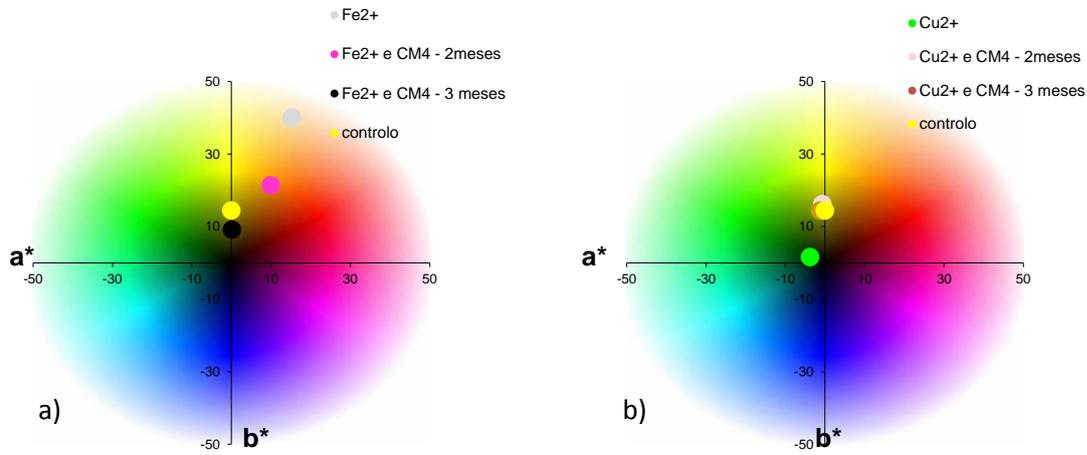


Figura 3.13. Variação da crominância do papel para gravura com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido de culturas mistas de fungos e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4

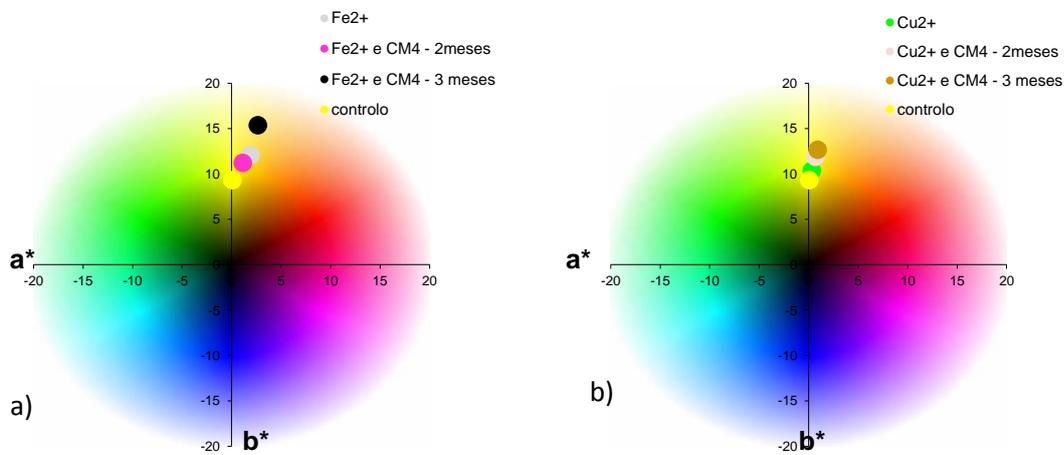


Figura 3.14. Variação da crominância do cartão madeira com manchas induzidas por a) ião Fe^{2+} seguido de culturas mistas de fungos e b) ião Cu^{2+} seguido da CM4

Da análise das Figs 3.11 a 3.14 verifica-se em todos os papéis uma diminuição da luminosidade (menor valor de L^*). Comparativamente ao papel com a mancha induzida pelo ião Fe^{2+} , quando lhe é inoculada a CM4, com exceção do papel para aguarela e do

cartão madeira aos 3 meses, o papel apresenta tons mais esverdeados (diminuição do valor a^*) e tons mais azulados (diminuição do valor b^*) ao longo do tempo.

Na presença do íon Cu^{2+} , o comportamento foi diferente do íon Fe^{2+} , a mancha torna-se mais avermelhada (aumento do valor a^*) e mais amarelada (aumento do valor b^*). Além disso existe um aumento da saturação da cor (aumento do valor C^*).

3.3.2. CARACTERIZAÇÃO DE PAPÉIS CONTEMPORÂNEOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARRIMENTO E ESPECTROSCOPIA DE RAIOS-X POR DISPERSÃO EM ENERGIA

Os quatro tipos de papel contemporâneo em estudo foram caracterizados por microscopia eletrônica de varrimento com microanálise por raios-X acoplada (MEV-EDS). O MEV-EDS permite a análise morfológica e caracterização química composicional das diferentes amostras, nomeadamente, dos materiais que são usados como cargas e permite comparar morfológicamente zonas de mancha induzida e zonas sem mancha.

PAPEL PARA AGUARELA

A análise por MEV revelou a existência de partículas com uma forma característica que a análise por EDS detetou serem de silício, sugerindo a utilização de diatomito como carga. Outras partículas presentes na amostra, em grande quantidade, são partículas ricas em cálcio e, uma vez que não se deteta a presença de enxofre, esta análise sugere também a utilização de carbonato de cálcio como carga (Fig. 3.15). O diatomito ou terra de diatomáceas consiste tipicamente em 87-91% de dióxido de silício (SiO_2) e devido às suas propriedades específicas e estrutura macroporosa torna o papel altamente absorvente. O diatomito tem sido amplamente usado em diferentes áreas com funções semelhantes, nomeadamente, como absorvente de ácidos, fertilizantes líquidos, óleos, água, e álcool (Tsai *et al.*, 2006). O carbonato de cálcio (CaCO_3) torna o papel mais brilhante, volumoso, resistente e absorvente e, por isso, é uma das cargas frequentemente

utilizadas na produção de papel, podendo ser usado em pó ou precipitado (Pinzari *et al.*, 2010).

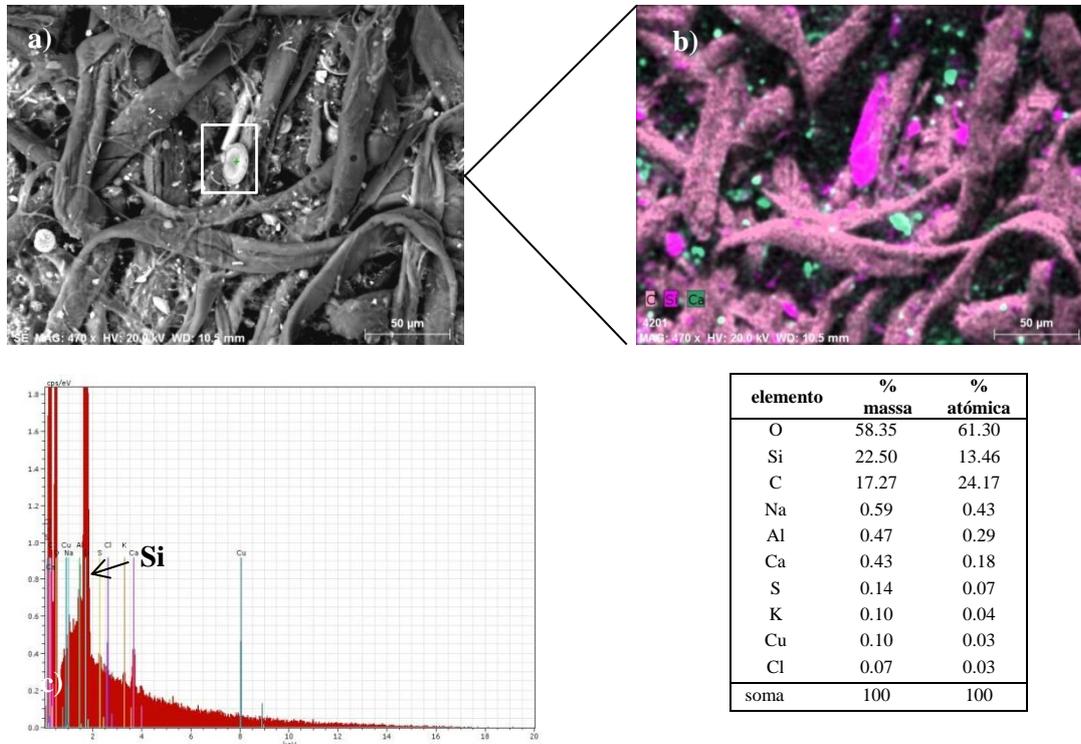


Figura 3.15. a) imagem de MEV evidenciando a utilização de diatomito; b) mapa de EDS da zona da imagem anterior, onde se observa a distribuição de Ca, Si e C; c) análise composicional (EDS) da partícula indicada em a)

Na imagem de MEV da Fig. 3.16 observam-se as manchas induzidas no papel para aguarela por culturas mistas de fungos (CM5). Esta cultura mista apresenta três espécies de *Penicillium*. É possível observar a forma como os fungos cresceram, entrelaçando e degradando as fibras de celulose e alterando localmente a estrutura do suporte de papel. Segundo Pinzari e colaboradores (2006), os fungos alteram a superfície do papel através da reação que ocorre entre a proteína dos fungos e a celulose. Os fungos utilizam a celulose como fonte de carbono provocando a degradação das fibras de celulose.

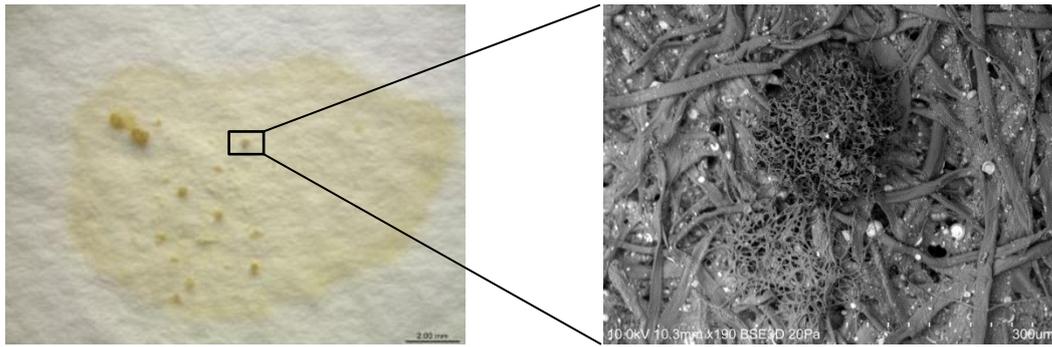


Figura 3.16. Imagem de microscopia ótica (esquerda) e imagem de MEV (direita) evidenciando fungos inoculados a partir da cultura mista CM5

CARTOLINA DUPLEX

A caracterização da superfície da face branca da cartolina duplex é apresentada na Fig. 3.17. A análise por EDS permitiu detetar a presença de cálcio, além de carbono e oxigénio, contaminantes naturais e presentes na fibra celulósica, permitindo sugerir que a composição é essencialmente carbonato de cálcio. Segundo Wilson (2006), o CaCO_3 confere propriedades específicas ao papel tornando-o mais brilhante, mais volumoso e mais resistente. Carvalho e Almeida (1997) afirmam que o carbonato de cálcio é bastante utilizado por tornar o papel mais branco, de melhor qualidade e por atenuar a sua degradação ao longo do tempo. Foi apenas analisada a face branca da cartolina por ser a superfície principal que é usada nas aplicações deste material e que foi o suporte do estudo microbiológico.

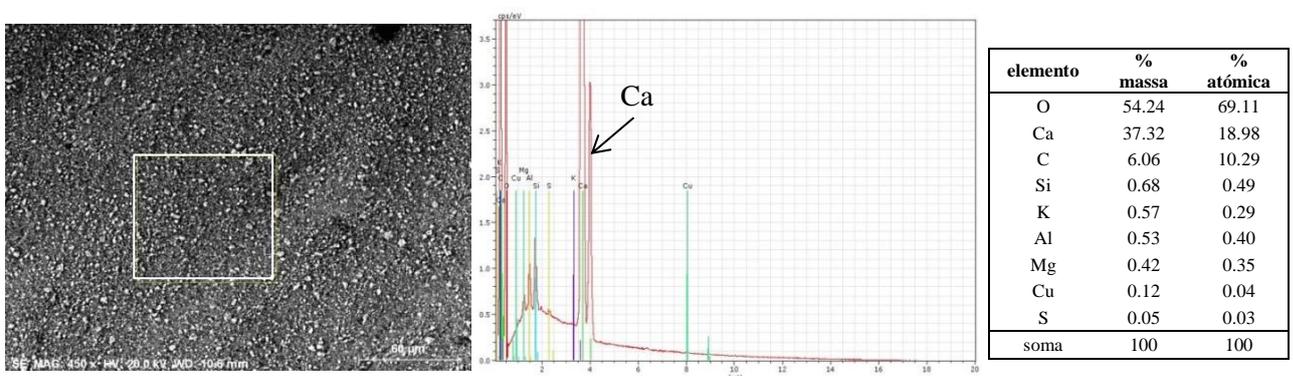


Figura 3.17. Imagem de MEV e análise por EDS da face branca da cartolina duplex

Na Fig. 3.18 são apresentadas imagens de MEV das manchas de *foxing* induzidas na cartolina duplex pela cultura mista de fungos CM6, obtida a partir do papel P6 contendo *foxing*. Esta cultura mista é constituída por três espécies diferentes de *Penicillium*. É possível observar o desenvolvimento das hifas dos fungos na cartolina.

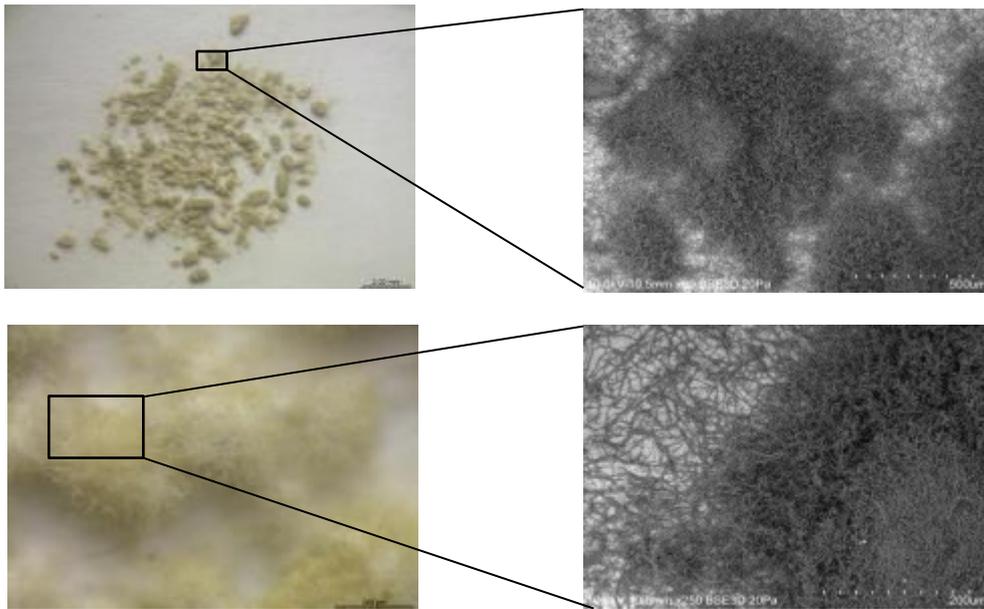


Figura 3.18. Imagens de MEV evidenciando fungos inoculados a partir da cultura mista CM6

PAPEL PARA GRAVURA

Na análise por EDS do papel para gravura detetaram-se também, tal como nos papéis anteriormente analisados, partículas ricas em cálcio e ausência de enxofre, o que sugere a utilização, uma vez mais, de carbonato de cálcio como carga. Na Fig. 3.19 é apresentada a imagem de MEV e análise química por EDS.

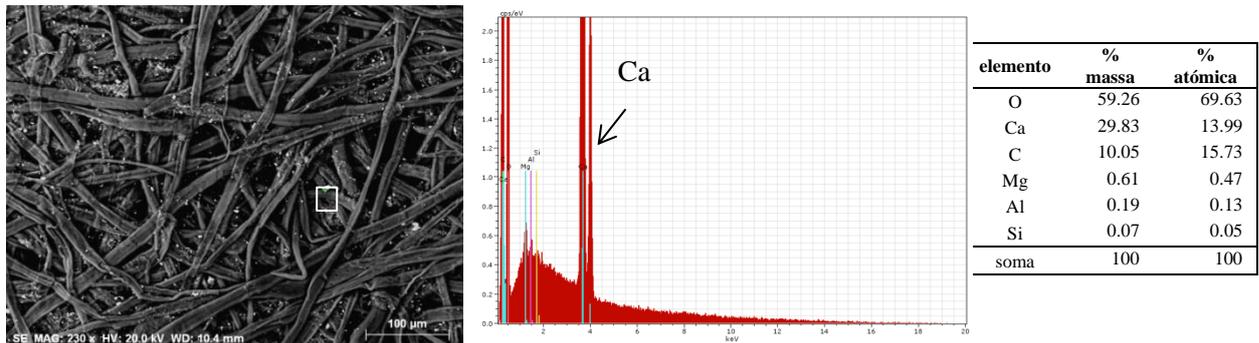


Figura 3.19. Imagem de MEV e análise por EDS do papel para gravura

Foram ainda observadas partículas de alumínio e silício (Fig. 3.20) sugerindo que não se trata de uma contaminação de poeiras mas da possível utilização de aluminossilicatos, como a caulinite ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$) como carga. A caulinite, segundo Velho (2002), é o aluminossilicato que confere melhores propriedades ao papel devido à forma das partículas. Adicionalmente, observou-se a presença de ferro, que pode dever-se quer à presença de silicatos de alumínio e ferro ou de compostos de ferro, usados como pigmentos. Segundo Wilson (2006) os aluminossilicatos são bastante utilizados como carga no papel, melhorando as suas propriedades.

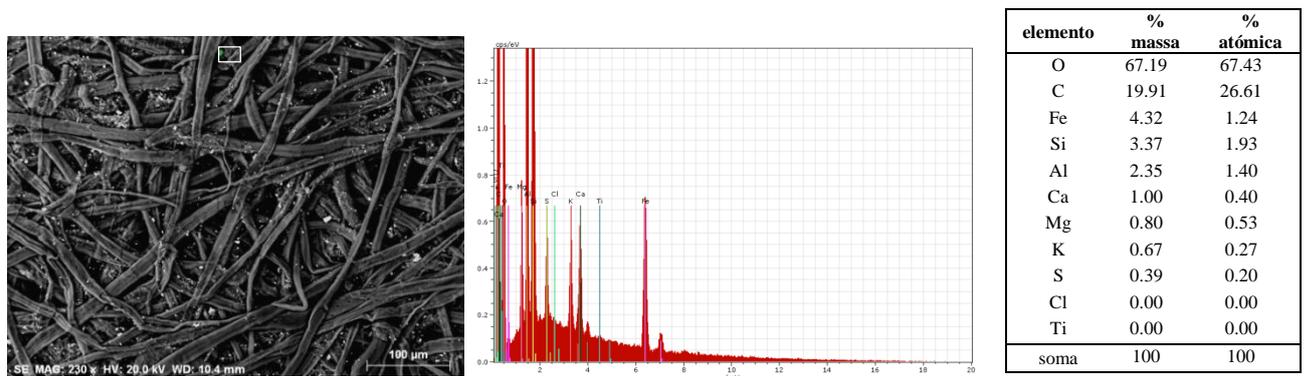


Figura 3.20. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas ricas em Al, Si e Fe

A análise pontual de EDS apresentada na Fig. 3.21 mostra também a presença de partículas contendo cálcio e enxofre, em percentagem atômica equivalente, o que sugere a utilização de sulfato de cálcio como carga. Segundo Baltar e colaboradores (2005) a gipsita ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é bastante utilizada como carga no papel, pois apresenta uma estrutura porosa, baixa abrasividade, elevada capacidade absorvente, elevado grau de branqueamento e, além disso, tem um baixo custo.

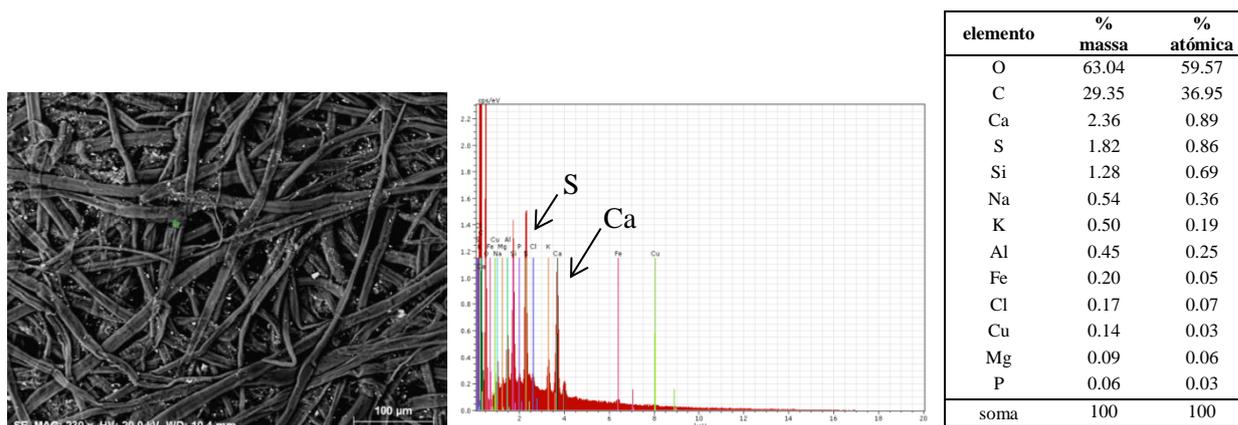


Figura 3.21. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas contendo cálcio e enxofre

CARTÃO MADEIRA

Tal como referido na análise de EDS do papel para gravura, no cartão madeira (Fig. 3.22) também se detetou a presença de partículas com Ca e S, o que sugere a utilização de sulfato de cálcio como carga.

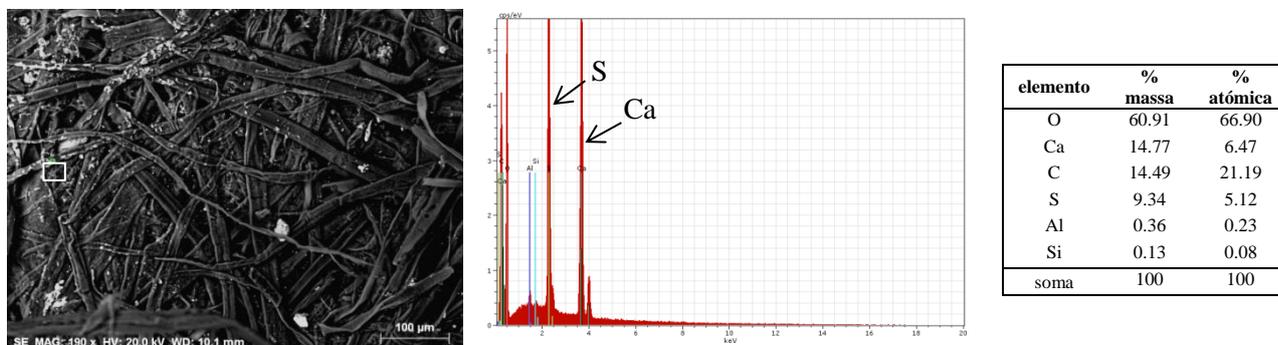


Figura 3.22. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas ricas em cálcio e enxofre

Foram também encontradas partículas para as quais se detetou a presença de cálcio, alumínio e silício, além de outros elementos menores e que pode justificar a utilização de aluminossilicatos com cálcio conjuntamente com carbonato e cálcio como carga (Fig. 3.23).

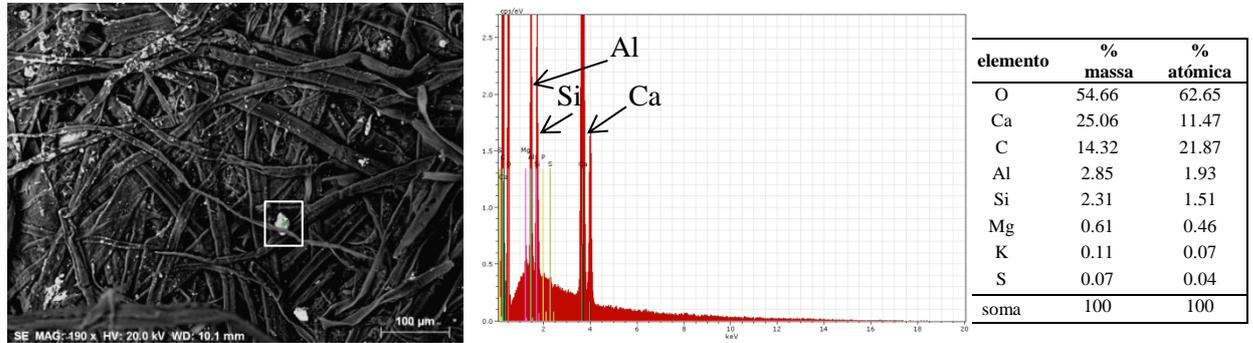


Figura 3.23. Imagem de MEV e análise por EDS de partículas ricas em Al, Si e Ca

A análise pontual EDS evidencia a presença de carbonato de cálcio (Fig. 5.29) utilizado como carga no cartão madeira.

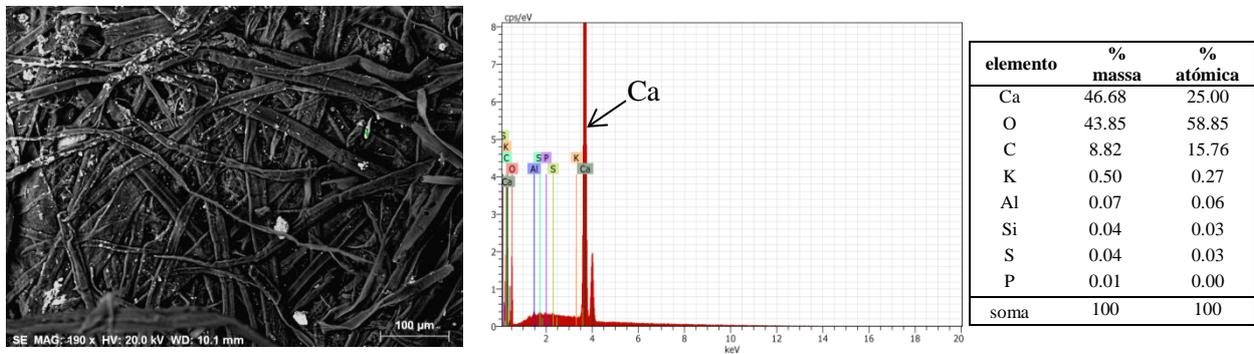


Figura 3.24. Imagem de MEV e análise por EDS do cartão madeira de partículas ricas em cálcio

3.3.3. CARACTERIZAÇÃO DE PAPEL POR ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

O FT-IR-ATR fornece informação química sobre os compostos orgânicos e inorgânicos constituintes do papel e sobre as alterações estruturais que ocorrem nas áreas com manchas induzidas. Além disso, a presença de microrganismos é indicada pela presença de bandas características.

Foram realizados estudos nos papéis contemporâneos para obter informação sobre a sua composição, nomeadamente, no que diz respeito aos compostos orgânicos (encolagens). Esta informação é integrada e complementa os resultados de MEV-EDS que permitem concluir apenas quanto aos materiais inorgânicos (cargas). Além disso, foram também realizadas análises nas manchas de *foxing* induzidas por iões metálicos (solução de Fe^{2+} ou de Cu^{2+}), em duas concentrações, por culturas mistas de fungos (CM4), e por soluções destes iões metálicos seguidas de culturas mistas de fungos (CM4), em papéis envelhecidos e não envelhecidos. Os espectros foram normalizados, permitindo a sua sobreposição e comparação para análise das alterações ocorridas.

Para uma interpretação mais adequada dos espectros de FT-IR-ATR, no anexo V são apresentados os espectros obtidos na base de dados IRUG.

PAPEL PARA AGUARELA

Na Fig. 3.25. são apresentados os espectros de FT-IR-ATR referentes à análise do papel para aguarela natural e às manchas de *foxing* induzidas neste papel com cultura mista CM4. É possível observar uma acentuada absorção na região *fingerprint* da celulose, a $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. A celulose é um polímero de cadeia longa de glucose. A glucose contém na sua estrutura vários grupos O-H pelo que é de esperar a existência de uma banda a cerca de 3300 cm^{-1} devida a estes grupos e uma banda a 1080 cm^{-1} devida à ligação C-O. O estiramento da ligação C-H ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) tende a ser menos evidente (Derrick *et al.*, 1999).

Este papel tem como carga carbonato de cálcio (CaCO_3), cuja presença é visível em duas bandas características: o estiramento da ligação CO_3^{2-} ($1490\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$) e a deformação da ligação O-C-O ($910\text{-}850\text{ cm}^{-1}$). A existência de estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si ($1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) está de acordo com a presença de sílica, que em MEV se verificou estar sob a forma de diatomito, outra carga usada. Além desta banda, aparece outra mais pequena, perto de 790 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento simétrico da ligação Si-O e que também é característico da sílica.

É utilizado material orgânico como encolagem, visível no estiramento das ligações N-H ($3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) e C=O (1600 cm^{-1}), e concordante com a presença de gelatina, uma proteína, cuja utilização é indicada pelo fabricante.

Após a inoculação da cultura mista CM4 é possível observar variações em algumas bandas que são modificadas pela presença de fungos. Os espectros de proteínas apresentam um padrão característico. As proteínas são caracterizadas pela presença de bandas de amida I e II, perto dos 1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} , respetivamente. Estas duas bandas juntamente com outra que corresponde à amida III (1450 cm^{-1}) formam um padrão típico. Adicionalmente, a presença de amida pode ser confirmada pelo estiramento da ligação N-H, perto dos 3350 cm^{-1} (Derrick *et al.*, 1999). No espectro obtido, a presença de fungos alterou o conjunto de bandas centradas entre 3350 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} e no intervalo $1800\text{ - }1300\text{ cm}^{-1}$ relativamente ao papel natural (não modificado). Também se observam diferenças na região *fingerprint* da celulose.

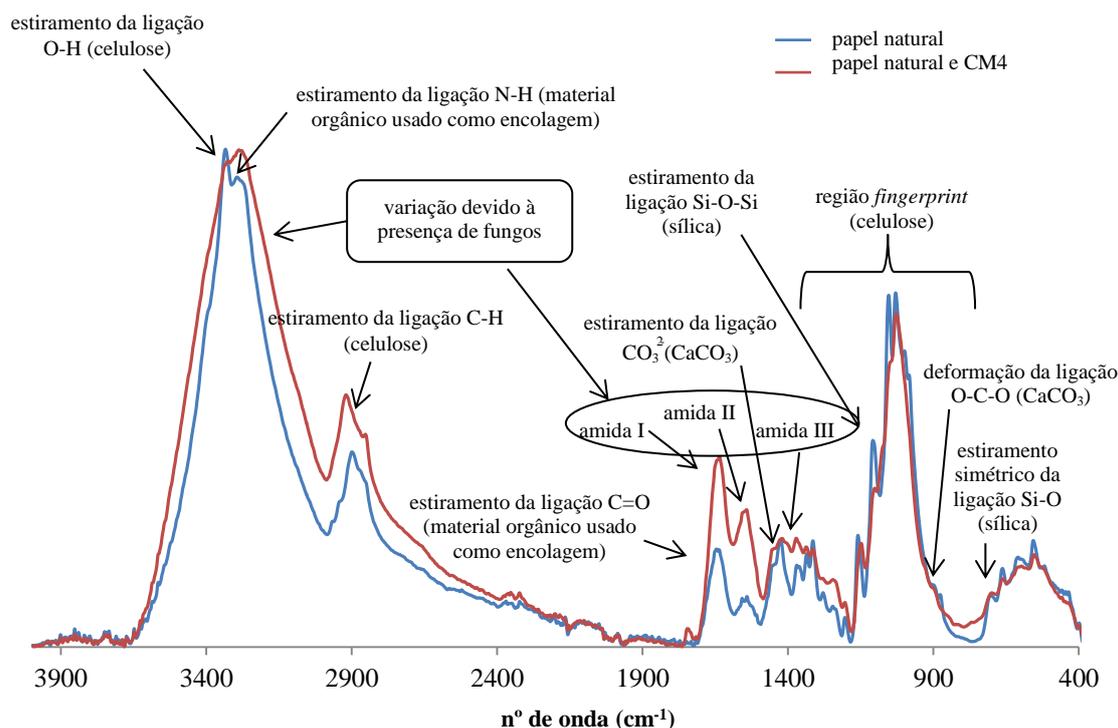


Figura 3.25. Espectro de FT-IR-ATR do papel para aguarela natural (não modificado) e na zona de manchas induzidas por CM4

Na Figura 3.26 são apresentados os diferentes espectros de FT-IR-ATR obtidos em amostras de papel para aguarela nas várias condições em que as manchas foram induzidas. Na Figura 3.26a) é possível visualizar alterações na região *fingerprint* da celulose e no estiramento da ligação C-H quando o papel é envelhecido (controlo envelhecido), o que indica uma modificação da estrutura da celulose durante o processo de envelhecimento. Na presença de culturas mistas CM4 (Fig. 3.26b)) observam-se maiores alterações no espectro obtido nas manchas induzidas por ião Fe^{2+} do que por ião Cu^{2+} , nomeadamente, no que diz respeito à região *fingerprint* da celulose e no intervalo entre os 1650 e os 1300 cm^{-1} . A comparação entre a Fig. 3.26c) e Fig. 3.26e) mostra que a presença de ião Fe^{2+} altera a superfície do papel afetando, nomeadamente, as bandas que dizem respeito à gelatina (N-H e C=O), e que essa alteração é sensível à concentração de ião Fe^{2+} , o que não se verifica no caso do ião Cu^{2+} nas mesmas condições. Comparando os papéis envelhecidos e não envelhecidos (3.26d) e 3.26f) com 3.26.c) e 3.26e), respetivamente) e a indução de manchas nas mesmas condições, o ião Fe^{2+} continua a ser aquele que produz as maiores alterações na superfície do papel. A análise da Fig. 3.26g) sugere que o ião Fe^{2+} pode interagir com a gelatina usada na encolagem, alterando as bandas a $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$, o que não se verifica para o ião Cu^{2+} . Quanto à Fig. 3.26h), a

presença de íon Cu^{2+} parece inibir ou minimizar a ação de CM4 sobre o papel (bandas 1650-1300 cm^{-1}).

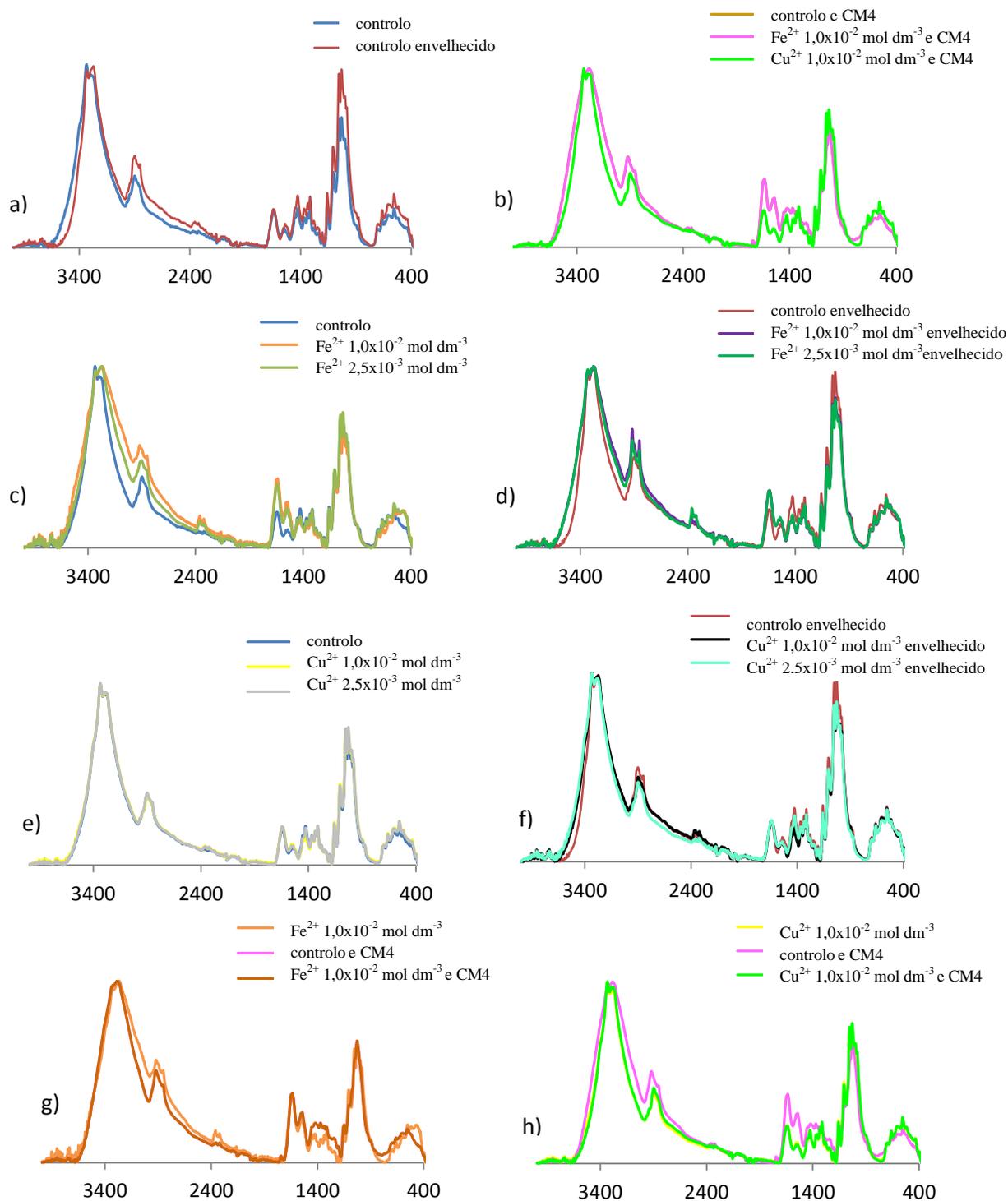


Figura 3.26. Espectros de FT-IR-ATR obtidos com o papel para aguarela nas seguintes condições: a) papel natural (controle) e papel envelhecido (controle envelhecido); b) papel com CM4, natural, com íon Fe^{2+} e com íon Cu^{2+} na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; c) papel natural com íon Fe^{2+} em duas concentrações; d) papel envelhecido com íon Fe^{2+} em duas concentrações; e) papel natural com íon Cu^{2+} em duas concentrações; f) papel envelhecido com íon Cu^{2+} em duas concentrações; g) papel com íon Fe^{2+} , com CM4 e simultaneamente com íon Fe^{2+} e CM4; h) papel com íon Cu^{2+} , com CM4 e simultaneamente com íon Cu^{2+} e CM4.

CARTOLINA DUPLEX

O espectro de FT-IR-ATR da face da frente (branca) da cartolina duplex apresenta uma banda acentuada aos 1400 cm^{-1} e outra aos 875 cm^{-1} que correspondem aos modos de vibração do carbonato de cálcio (CaCO_3), usado como carga neste papel. A banda correspondente à região *fingerprint* da celulose não é visível no espectro, uma vez que a superfície analisada se encontra coberta com carbonato de cálcio.

Este papel não é encolado, pelo que não se utilizaram espécies proteicas e apenas quando a cultura mista (CM4) foi inoculada é que se observaram as bandas identificadas como amida I, II e III (1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , respetivamente) e associadas à vibração da ligação N-H ($3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) e C-H ($3200\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) (presença de fungos).

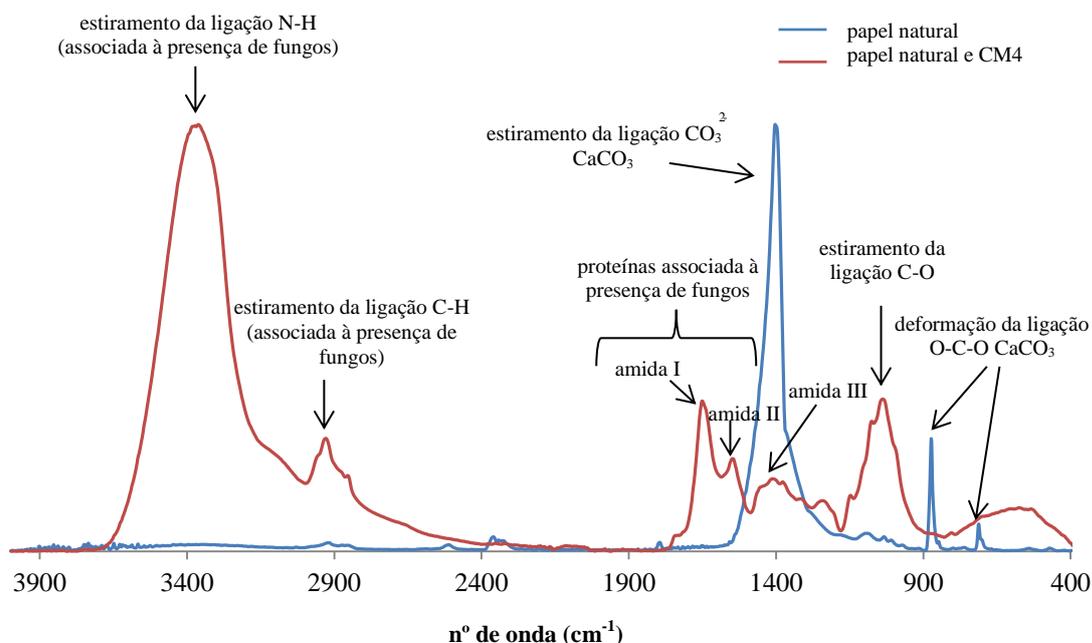


Figura 3.27. Espectros de FT-IR-ATR da cartolina duplex (natural) e na zona de manchas induzidas por CM4 na face da frente (branca)

Quanto à face do verso da cartolina duplex, a análise por FT-IR-ATR mostrou que esta é diferente e, embora tenha também carbonato de cálcio é possível detetar a presença de celulose (região *fingerprint* e estiramento da ligação O-H e da ligação C-H) (Fig 3.28).

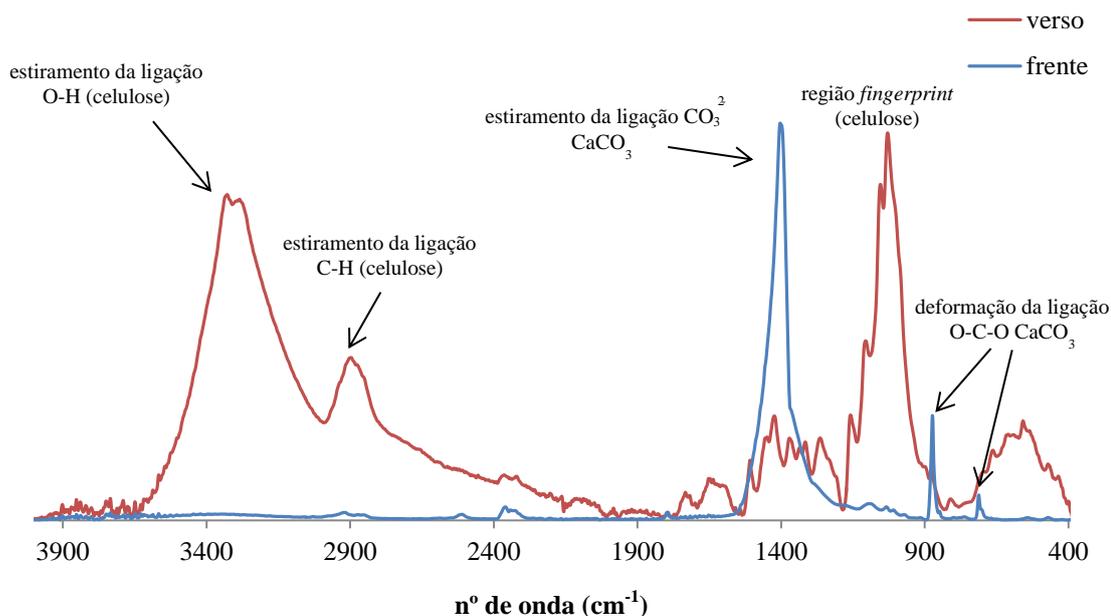


Figura 3.28. Espectros de FT-IR-ATR das faces da frente e do verso da cartolina duplex

Na Fig. 3.29. são apresentados os espectros obtidos com a cartolina duplex nas diferentes condições de indução de manchas de *foxing*. A análise da Fig. 3.29a) indica que não há alterações entre o papel envelhecido e o papel natural (controle). Na Fig. 3.29b) observa-se que na presença de CM4 e com o ião Cu^{2+} as bandas devidas ao carbonato de cálcio são ainda visíveis, o que não acontece com o controle ou com o ião Fe^{2+} ; adicionalmente, nos três espectros é agora visível a região *fingerprint* da celulose. Os conjuntos de espectros das Figs. 3.29c) a 3.29f) apresentam diversas alterações e que podem ser basicamente relacionadas com a presença de água (vibração da ligação O-H) e o aparecimento de bandas referentes à celulose e que se devem a uma lixiviação do carbonato de cálcio presente na superfície por adição de soluções aquosas dos iões metálicos. Além disso, os sulfatos mostram uma forte vibração relativa ao estiramento da ligação S-O na região $1200\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ e à deformação da ligação SO_4^{2-} na região $700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. Curiosamente, para ambos os iões Fe^{2+} e ião Cu^{2+} , as alterações do espectro são menos evidentes para a concentração mais elevada das soluções. Por fim, a comparação entre a Fig. 3.29g) e a Fig. 3.29h) permite concluir que na presença da CM4 a maior alteração sofrida na superfície do papel se deve ao ião Fe^{2+} .

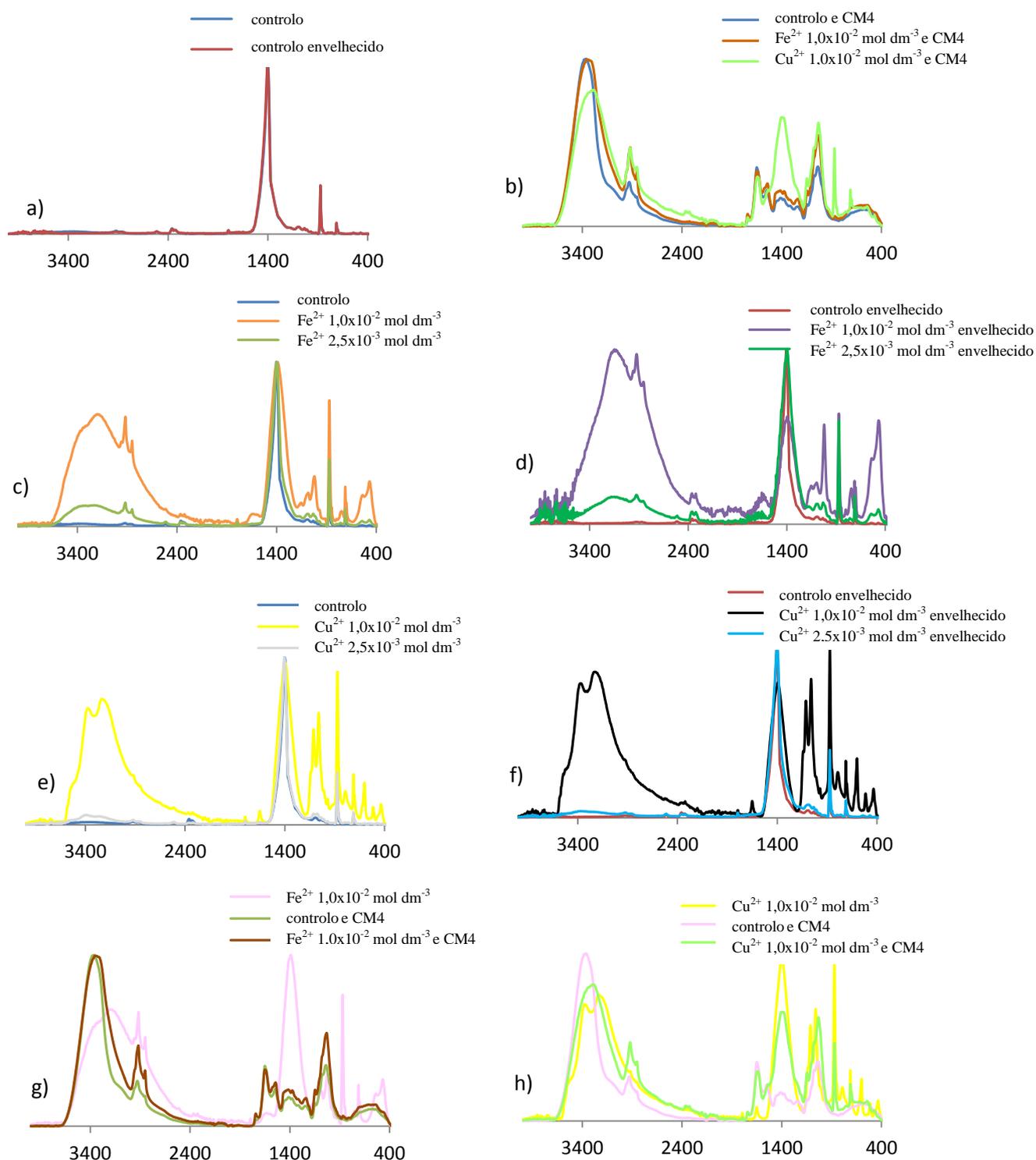


Figura 3.29. Espectros de FT-IR-ATR obtidos com a cartolina duplex nas seguintes condições: a) papel natural (controlo) e papel envelhecido (controlo envelhecido); b) papel com CM4, natural, com ião Fe^{2+} e com ião Cu^{2+} na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$; c) papel natural com ião Fe^{2+} em duas concentrações; d) papel envelhecido com ião Fe^{2+} em duas concentrações; e) papel natural com ião Cu^{2+} em duas concentrações; f) papel envelhecido com ião Cu^{2+} em duas concentrações; g) papel com ião Fe^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Fe^{2+} e CM4; h) papel com ião Cu^{2+} , com CM4 e simultaneamente com ião Cu^{2+} e CM4

PAPEL PARA GRAVURA

Tal como os papéis referidos anteriormente, o papel para gravura também apresenta como carga o carbonato de cálcio, visível a partir do estiramento da ligação CO_3^{2-} ($1490\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$) e pela deformação da ligação O-C-O ($910\text{-}850\text{ cm}^{-1}$). No espectro de FT-IR-ATR observa-se ainda o estiramento das ligações S-O ($1200\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$) e a deformação da ligação SO_4^{2-} ($700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) indicando a presença de sulfato de cálcio. Esta análise é complementada pelas análises pontuais de EDS das Fig. 3.19 e Fig. 3.21.

Neste papel não foram encontradas bandas características de materiais de encolagem, pois tal como referido pelo fabricante, o papel para gravura não possui encolagem.

A presença de bandas de proteínas produzidas por ataque fúngico (CM4) é notória no espectro correspondente, sendo visível pelas bandas aos 1650 , 1550 e 1450 cm^{-1} correspondentes à amida I, II e III, respetivamente. Além disso, a região *fingerprint* da celulose está modificada devido à presença de fungos (Manente *et al.*, 2012).

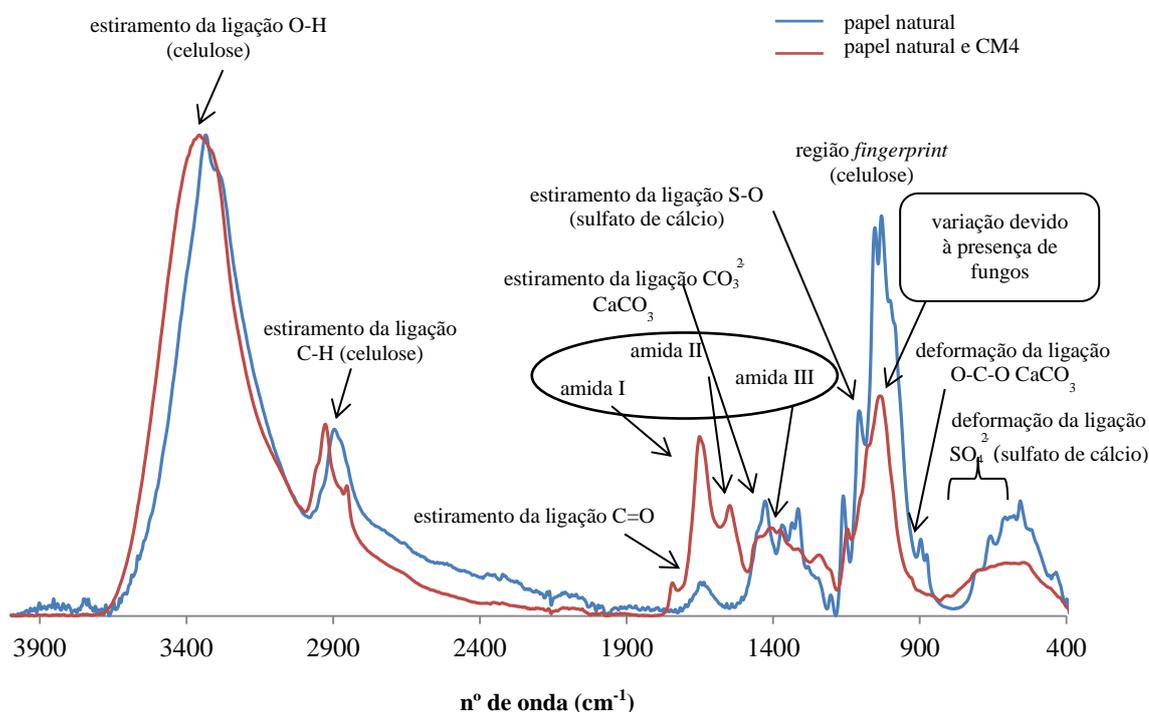


Figura 3.30. Espectros de FT-IR-ATR do papel para gravura natural e na zona de manchas induzidas por CM4

Na Figura 3.31 são apresentados os diferentes espectros de FT-IR-ATR obtidos com o papel para gravura. A análise da Fig. 3.31a) evidencia que o processo de envelhecimento não afeta substancialmente a superfície deste papel. Em condições em que culturas mistas (CM4) estão presentes, o espectro é dominado pela presença de fungos e não apresenta diferença se for obtido na presença de ião Fe^{2+} ou Cu^{2+} ou na ausência deles (Fig. 3.31b)). Da análise das Fig. 3.31c) e 3.31d) verifica-se que, no geral, não existem alterações significativas entre o controle e as manchas obtidas com ião Fe^{2+} tanto para o papel natural como para o artificialmente envelhecido, exceto na região referente ao estiramento da ligação C-H. Um comportamento semelhante é observado para o ião Cu^{2+} nas mesmas condições (Fig. 3.31e) e 3.31f)). Pela análise das Fig. 3.31g) e 3.31h) verifica-se que tanto na presença de ião Fe^{2+} como de Cu^{2+} , quando se introduz a CM4 os espectros sofrem profundas alterações à semelhança do que aconteceu na Fig. 3.30 com o papel natural, particularmente na região referente à vibração das amidas e na região *fingerprint* da celulose.

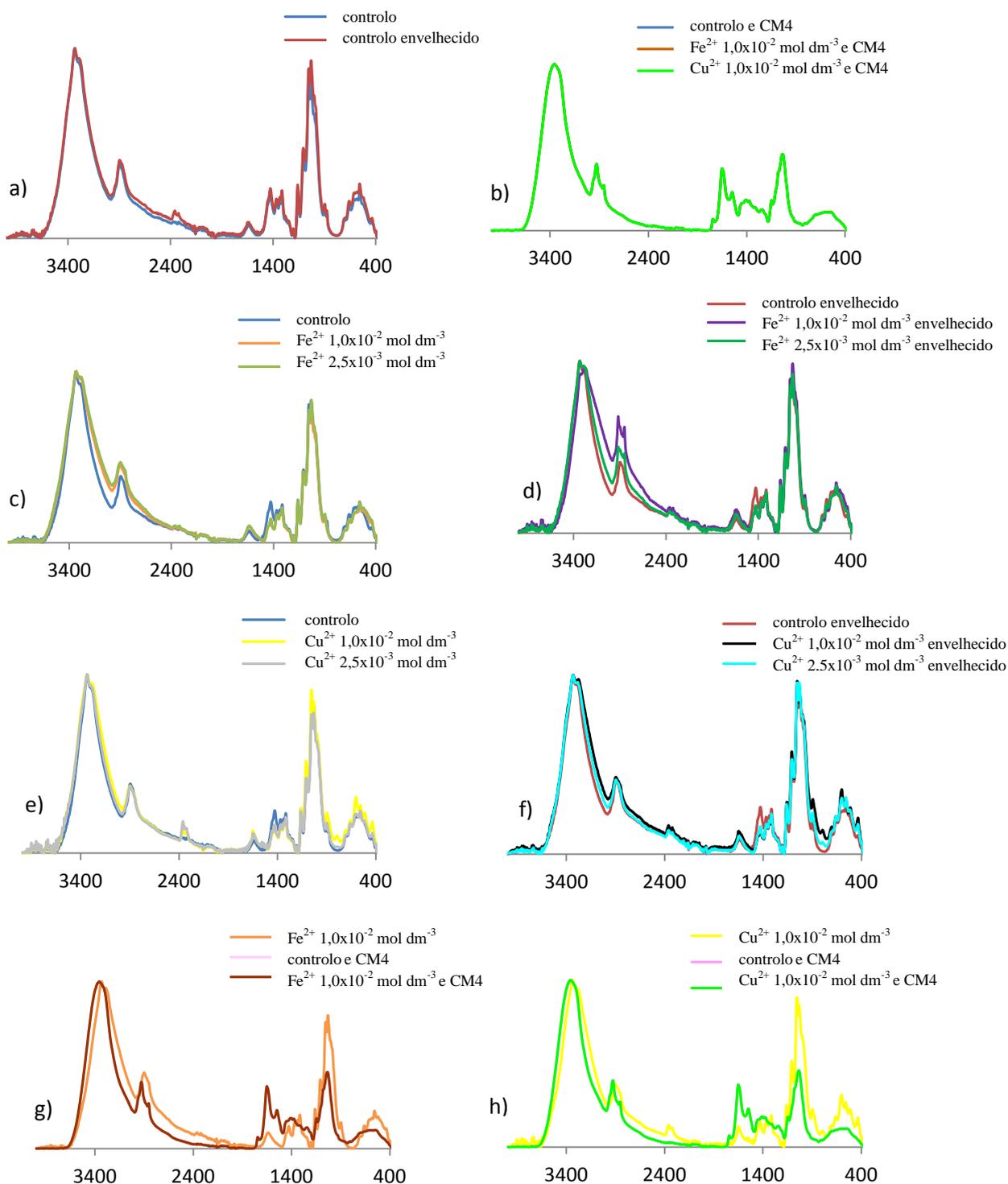


Figura 3.31. Espectros de FT-IR-ATR obtidos com o papel para gravura nas seguintes condições: a) papel natural (controle) e papel envelhecido (controle envelhecido); b) papel com CM4, natural, com íon Fe²⁺ e com íon Cu²⁺ na concentração 1,0x10⁻² mol dm⁻³; c) papel natural com íon Fe²⁺ em duas concentrações; d) papel envelhecido com íon Fe²⁺ em duas concentrações; e) papel natural com íon Cu²⁺ em duas concentrações; f) papel envelhecido com íon Cu²⁺ em duas concentrações; g) papel com íon Fe²⁺, com CM4 e simultaneamente com íon Fe²⁺ e CM4; h) papel com íon Cu²⁺, com CM4 e simultaneamente com íon Cu²⁺ e CM4

CARTÃO MADEIRA

Na análise FT-IR-ATR do cartão madeira é possível observar as bandas características da celulose, tal como no papel anterior, sendo visível através da região *fingerprint* e pelo estiramento da ligação C-H (Fig. 3.32). Este papel tem como carga o CaCO_3 , que é visível por duas bandas características: o estiramento da ligação CO_3^{2-} ($1490\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$) e a deformação da ligação O-C-O ($910\text{-}850\text{ cm}^{-1}$). Observa-se um forte estiramento da ligação S-O na região $1200\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ e a deformação da ligação SO_4^{2-} na região $700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ que indica a presença de sulfato de cálcio. Esta informação é complementada pela análise EDS (Figs 3.22 e 3.24). O cartão madeira tem na sua composição lenhina, visível pelas bandas características aos 1510 e 810 cm^{-1} .

Após a inoculação do fungo ocorreram alterações características devido à sua presença, nomeadamente nas bandas da amida I (1650 cm^{-1}) e da amida II (1550 cm^{-1}) e o estiramento da ligação N-H (3350 cm^{-1}).

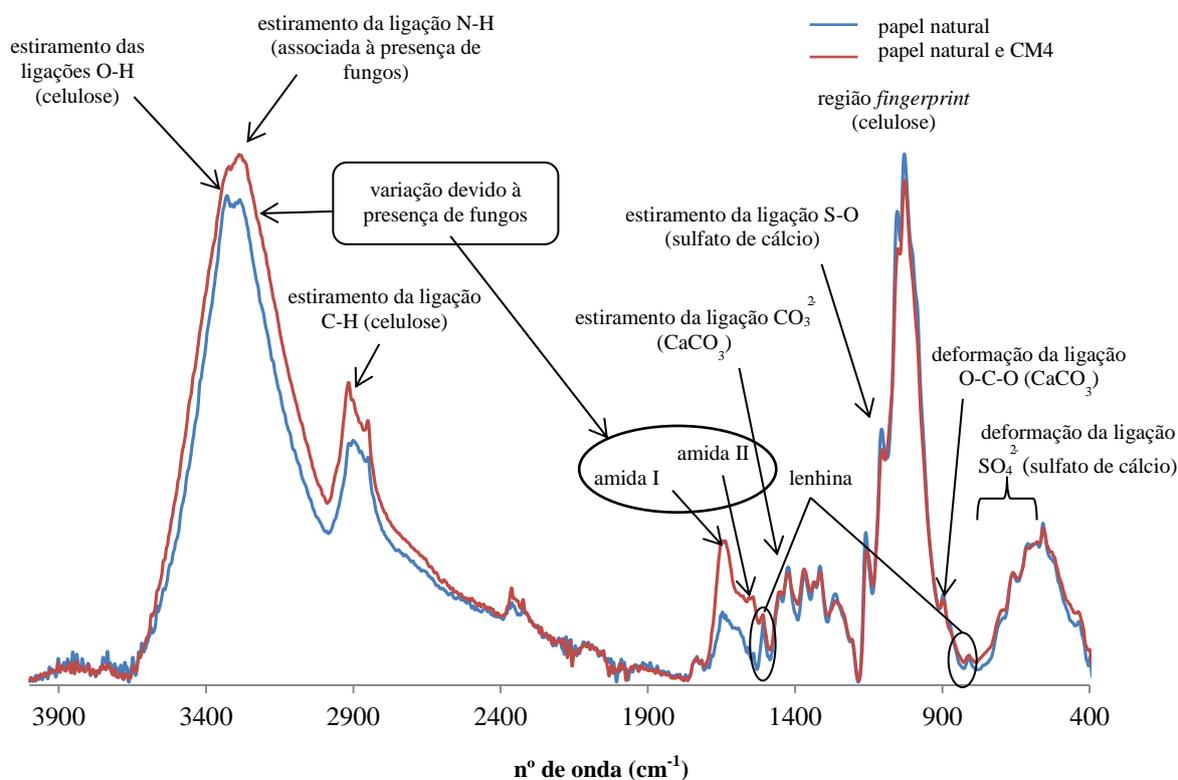


Figura 3.32. Espectros de FT-IR-ATR do cartão madeira natural e na zona de manchas induzidas por CM4

Na Figura 3.33 são apresentados os diferentes espectros de FT-IR-ATR obtidos com o cartão madeira. A comparação dos espectros do papel natural e do papel envelhecido mostra ausência de alterações significativas, evidenciando que o processo de envelhecimento não altera significativamente a superfície do papel (Fig. 3.33a)). Na Fig. 3.33b) ocorreram alterações devido à presença da CM4, sendo bastante evidente na região das amidas, no entanto quando a CM4 se encontra na presença do íon Cu^{2+} , não se verificam alterações, o que pode indicar que o íon Cu^{2+} inibe a atuação da CM4. Comparando os papéis envelhecidos (3.33d) e 3.33f)) com os não envelhecidos (3.33c) e 3.33e)) e a indução de manchas por soluções do íon Fe^{2+} ou do íon Cu^{2+} , os papéis não envelhecidos mostraram mais alterações na superfície do papel do que os envelhecidos. A Fig. 3.33g) permite concluir que quando a CM4 está presente ocorrem alterações no espectro no estiramento da ligação C-H e na zona das amidas. A Fig. 3.33h) mostra que a presença da CM4 altera a superfície do papel, mas quando esta se encontra na presença do íon Cu^{2+} não se verificam alterações no espectro.

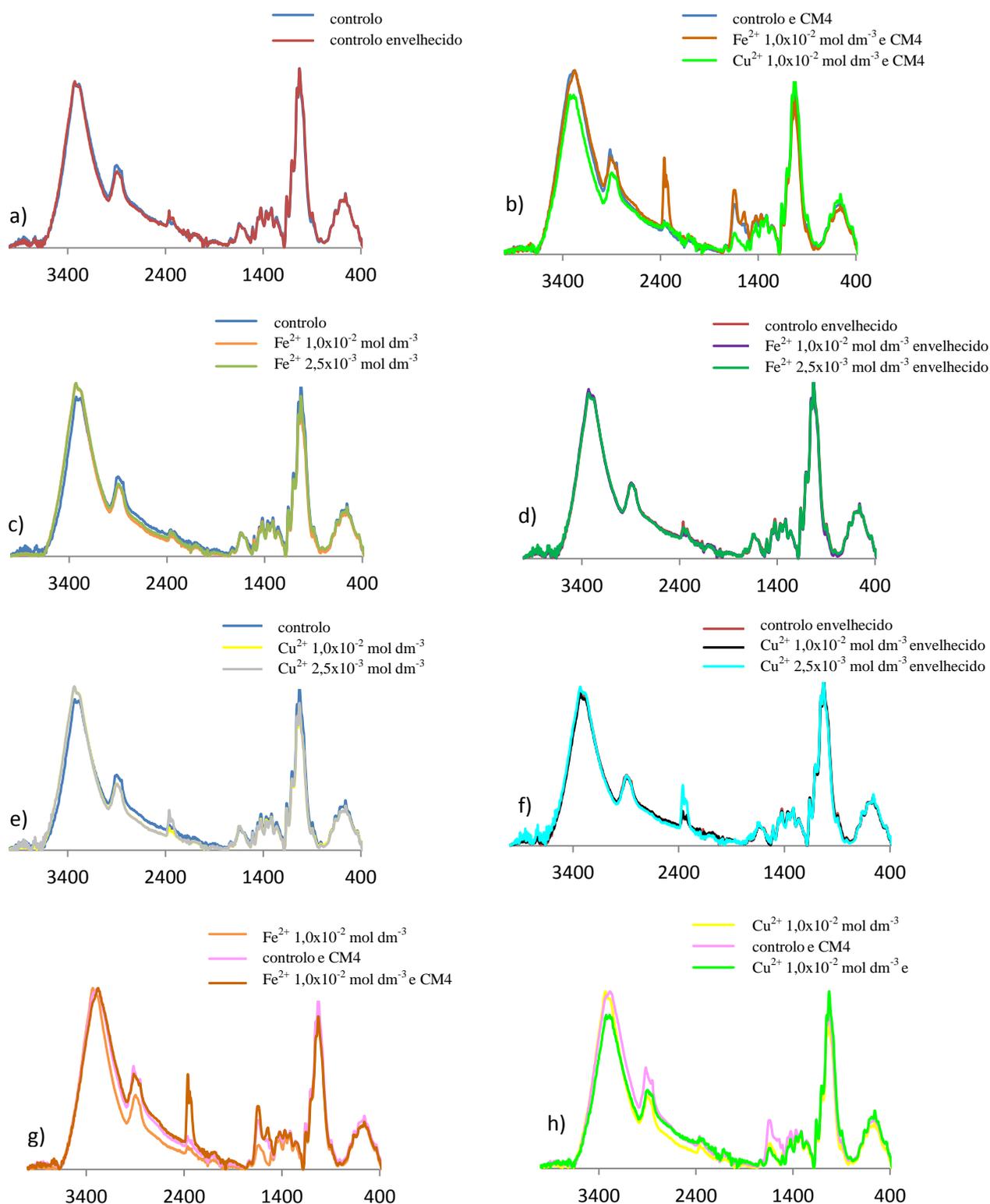


Figura 3.33. Espetros de FT-IR-ATR obtidos com o cartão madeira nas seguintes condições: a) papel natural (controle) e papel envelhecido (controle envelhecido); b) papel com CM4, natural, com íon Fe^{2+} e com íon Cu^{2+} na concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3} ; c) papel natural com íon Fe^{2+} em duas concentrações; d) papel envelhecido com íon Fe^{2+} em duas concentrações; e) papel natural com íon Cu^{2+} em duas concentrações; f) papel envelhecido com íon Cu^{2+} em duas concentrações; g) papel com íon Fe^{2+} , com CM4 e simultaneamente com íon Fe^{2+} e CM4; h) papel com íon Cu^{2+} , com CM4 e simultaneamente com íon Cu^{2+} e CM4

Comentários Finais e Perspetivas Futuras

Neste trabalho selecionaram-se oito papéis contemporâneos de natureza distinta e envelhecidos naturalmente contendo manchas de diferentes tipologias e todos eles mostraram estar contaminados maioritariamente por fungos filamentosos. Os papéis P1 e P2 são os de maior contaminação microbiológica enquanto a cultura mista CM4, proveniente do papel P4, mostrou ser a mais biodeteriogénica. Foram isoladas 4 estirpes fúngicas do género *Penicillium* a partir dos 8 papéis contendo *foxing* natural e todas apresentaram capacidade de degradar a celulose através da produção de enzimas celulolíticos. Todos os fungos apresentaram cinéticas de crescimento diferentes e capacidade de degradar a celulose do papel, sendo que uns são mais biodeteriogénicos.

As manchas de *foxing* artificialmente produzidas nos papéis envelhecidos são mais intensas e mais bem definidas do que no papel não envelhecido, o que pode sugerir que o tempo de vida do papel pode ser também um fator importante no aparecimento deste tipo de manchas. Quando as manchas são induzidas por iões metálicos seguidas de culturas mistas, o desenvolvimento dos fungos é mais evidente na presença do ião ferroso, sendo que no caso da cartolina duplex e do papel para gravura os fungos desenvolveram-se de tal forma que cobrem completamente a mancha do ião Fe^{2+} . No cartão madeira as alterações não são tão evidentes, sendo o menos afetado tanto pelos iões metálicos como pelos microrganismos.

As alterações cromáticas no cartão madeira não foram tão evidentes como nos outros papéis sendo que a lenhina pode ter um papel importante neste facto. Como seria de esperar, as manchas induzidas pelo ião Fe^{2+} apresentam uma tonalidade mais amarelada e avermelhada do que as do ião Cu^{2+} que são mais azuladas. No entanto, algumas das manchas de cobre são contornadas a coloração castanha escura, nomeadamente, nas observadas nos papéis para aguarela e para gravura. A presença das culturas mistas produz alterações mais acentuadas quando o papel está envelhecido.

A metodologia analítica com recurso a técnicas não destrutivas (VP-MEV-EDS e FT-IR-ATR) permitiu a caracterização química e morfológica das amostras de papel utilizadas. A análise por MEV permitiu comparar as alterações ocorridas na presença de estirpes fúngicas, mostrando que estas têm uma grande capacidade de proliferar e desenvolver-se nas fibras de papel. A análise por EDS mostrou que em todos os papéis contemporâneos é usada como carga carbonato de cálcio. No papel para gravura e no cartão madeira foi também usado sulfato de cálcio, enquanto no papel para aguarela foram encontrados diatomitos. O papel para aguarela é o único que apresenta encolagem de gelatina.

Para complementar os resultados do MEV-EDS foram realizados estudos aos papéis contemporâneos por FT-IR-ATR. O FT-IR-ATR mostrou que, em geral, a presença do íon Fe^{2+} conduz a maior alteração da superfície do papel particularmente no caso dos papéis para aguarela e para gravura e mostrou ser uma técnica adequada para avaliar a presença de microrganismos, nomeadamente, fungos e as alterações que estes induzem na estrutura da celulose. O desenvolvimento de fungos é mais exuberante na presença de íon Fe^{2+} no papel para gravura e na cartolina duplex. Quando o papel é envelhecido, os fungos produzem uma mancha com um aspeto mais degradado.

PERSPETIVAS FUTURAS

- Estudo da atividade microbiológica dos papéis contendo *foxing* (P1 a P8), tal como apresentado no capítulo II, no ponto 2.3.2.1, mas retirando amostras de zonas do papel que não apresentem *foxing*, de forma a avaliar se a atividade microbiológica é de igual intensidade nas zonas com e sem *foxing*.
- Sequenciação do DNA das quatro estirpes fúngicas para identificação até à espécie, uma vez que só foi possível através de microscopia ótica identificar até ao género.
- Realização de um maior número de réplicas para avaliação da atividade celulolítica das estirpes fúngicas.
- Na caracterização do papel, realização de estudos de micro-difração de raios-X para avaliar o grau de cristalinidade da celulose no papel natural e na zona das manchas.
- Realização de mais estudos de microscopia eletrónica de varrimento nos papéis com mancha induzida por íões metálicos e por culturas mistas de fungos.
- Fluorescência de raios-X para avaliar a presença de íões metálicos no papel natural e nas zonas de mancha.

Referências bibliográficas

- Araújo, J. (2007). *Microscopia fotônica*. Departamento de Biologia, Universidade de Évora. Consultado a 5 de Setembro de 2013 em <<http://www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/mftecnicas.htm>>
- Ball, D. (2005). *Spectrosc.* **20**, 29-30
- Baltar, C.; Bastos, F.; Luz, A. (2005). *Gipsita*. Consultado a 6 de Setembro de 2013 em <<http://www.cetem.gov.br/publicacao/CTs/CT2005-122-00.pdf>>
- Barrett, T. (2011). *Paper through Time. Iowa City*. Consultado a 5 de Novembro de 2012 em <<http://paper.lib.uiowa.edu/european.php>>
- Bhat, M. (2000). *Biotechnol. Adv.* **18**, 355-383
- Beazley, K. (1991). *Paper conservator* **15**, 17-27
- Bicchieri, M.; Ronconi, S.; Romano, F.; Pappalardo, L.; Corsi, M.; Cristoforetti, G.; Legnaioli, S.; Palleschi, V.; Salvetti, A.; Tognoni, E. (2002). *Spectrochim. Acta Part B* **57**, 1235-1249
- Bicchieri, M.; Sodo, A.; Piantanida, G.; Coluzza, C. (2006). *J. Raman Spectrosc.* **37**, 1186-1192
- Bittencourt, S. (2008). *Microscópio de luz*. Laboratório de neurofisiologia. Universidade Federal de São Paulo. Consultado a 5 de Setembro de 2013 em <<http://www.neurofisiologia.unifesp.br/microscopiodeluz.htm>>
- Bracelpa - Associação Brasileira de Celulose e Papel (2010) *História do Papel*. São Paulo, Brasil. Consultado a 24 de Outubro de 2012 em <<http://www.bracelpa.org.br/bra/saibamais/historia/index.html>>
- Boruvka, N. (2008). *J. Can. Assoc. Conserv.* **33**, 38-45
- Buzio, R.; Calvini, P.; Ferroni, A.; Valbusa, U. (2004) *Appl. Phys. A.* **79**, 383-387
- Carvalho, E.; Almeida S. (1997). *Caulino e carbonato de cálcio: competição na indústria do papel*. CETEM/CNP, Rio de Janeiro
- Castro, A.; Pereira, N. (2010). *Quim. Nova* **33**, 181-188

CELPA – Associação da Indústria Papeleira (2013) *A história do papel*. Consultado a 10 de Agosto de 2013 em <<http://www.celipa.pt/>>

CEPI - Confederation of European Paper Industries (2012) *History of Paper*. Bruxelas, Bélgica. Consultado a 1 de Novembro de 2012 em <<http://www.paperonline.org/history-of-paper/timeline>>

Choi, S. (2007). *J. Am. Inst. Conserv.* **46**, 137-152

Costa, M. (2003). *Noções Básicas de Conservação Preventiva de Documentos*. Consultado a 10 de Agosto de 2013 em <<http://www.bibmanguinhos.cict.fiocruz.br/normasconservacao.pdf>>

Daniels, V. (1996). *Chem. Soc. Rev.* **25**, 179-186

Derrick, M.; Stulik, D.; Landry, J. (1999). *Infrared Spectroscopy in Conservation Science*. Scientific Tools for Conservation. The Getty Conservation Institute. Los Angeles

Enami, K.; Sakamoto, S.; Okada, Y. (2010). *Paper History - Journal of the International Association of Paper Historians* **14**, Tokyo, Japão

Florian, M. (1996). *Stud. Conserv.* **41**, 65-75

Garlick, K. (1986). *A Brief Review of the History of Sizing and Resizing Practices*. Consultado a 10 de Agosto de 2013 em <<http://cool.conservation-us.org/byauth/garlick/garlisiz.html>>

Heldt, H. (2005). *Plant Biochemistry*. 3^a ed, Elsevier, USA

Hundhausen, U.; Militz, H.; Mai, C. (2009). *Eur. J. Wood Prod.* **67**, 37-45

Konkol, N.; McNamara, C.; Hellman, E.; Mitchell, R. (2012). *J. Cult. Herit.* **13**, 115-119

Kreiner, M.; Harvey, L.; McNeil, B. (2002). *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 346-353

LaCour, B. (2001-2003). *Papermaking*. Consultado a 13 de Agosto de 2013 em <<http://www.arts-in-company.com/paper/additives/sizing.html>>

Leal, A.; Henriques, C.; Luna, A. (2007). *Revista Analytica* **32**, 28-35

- Lignoworks (2013). *What is Lignin?* Western University. Consultado a 13 de Agosto de 2013 em <<http://www.lignoworks.ca/content/what-lignin>>
- Luo, M. R. (2006). *Opt. Laser Technol.* **38**, 392-398
- Lushchak, V. (2011). *Comp. Biochem. Physiology, Part C*, **153**, 175-190
- Lussier, S. (2006). *The Book and Paper Group*. The American Institute for Conservation **25**, 9-12
- Lynd, L.; Weimer, P.; Zyl, W.; Pretorius, I. (2002). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 506-577
- Malešič, J.; Kočar, D.; Fabjan, A. (2012). *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 118-123
- Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. (1976). *Biotechnol. Biogen. Symp.* **6**, 21-31
- Manente, S.; Micheluz, A.; Ganzerla, R.; Ravagnan, G.; Gambaro, A. (2012). *Intern. Biodeter. Biodegrad.* **74**, 99-108
- Manso, M.; Carvalho, M. (2009). *Spectrochim. Acta Part B* **64**, 482-490
- Manso, M.; Pessanha, S.; Carvalho, M. (2006). *Spectrochim. Acta Part B* **61**, 922-928
- Metzler, D. (2003). *Biochemistry –The Chemical Reactions of Living Cells*. 2ªed, Elsevier, USA
- Michaelsen, A.; Piñar, G.; Montanari, M.; Pinzari, F. (2009). *Intern. Biodeter. Biodegrad.* **63**, 161-168
- Mira, L. (2004). *Formação intracelular de espécies reativas de oxigénio e de azoto e sistemas de defesa antioxidante*. 1ªed, Associação dos Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa, Lisboa
- Missori, M.; Righini, M.; Dupont, A. (2006). *Opt. Commun.* **263**, 289–294
- Mortimer, R.; Reynolds, J. (2008) *Displays* **29**, 424-431
- Navarro, R.; Navarro, F.; Tambourgi, E. (2007). *Estudo de Diferentes Processos de Oeção da Pasta Celulósica para Fabricação de Papel*. Consultado a 15 de Julho de 2013 em <http://www.unicap.br/revistas/revista_e/artigo4.pdf>

- Nelson, D.; Cox; M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3ªed, Worth Publishers, New York, USA
- Ohno Y., (2000), *CIE Fundamentals for Color Measurements, Paper for IS&T NIP16 Conference*, Vancouver, Canada, 16-20
- Panucarmi (2008). *Preservação, Conservação e Restauro*. Consultado a 13 de Agosto de 2013 em <<http://panucarmi2.wikidot.com/factores-internos-de-degradacao>>
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; Rubia, T.; Martínez, J. (2002). *Int. Microbiol.* **5**, 53-63
- Peters, D. (2000). *Papier Restaurierung*, **1**, 801-806
- Pineda, A.; Cruz, L. (2008). *Espectroscopia de IV-ATR*. Consultado em 5 de Setembro de 2013 em <http://www.cciqs.uaemex.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=113&Itemid=96>
- Pinzari, F.; Pasquariello, G.; Mico, A. (2006). *Macromol. Symp.* **238**, 57-66
- Prieto, B.; Ferrer, P.; Sanmartín, P.; Cárdenes, V.; Silva, B. (2011). *J. Cult. Herit.* **12**, 420-430
- Quintas, A.; Freire, A.P.; Halpern, M.J. (2008). *Bioquímica: Organização molecular da vida*. Lidel, Lisboa, Portugal
- Rakotonirainy, M.; Heude, E.; Lavédrine, B. (2007). *J. Cult. Herit.* **8**, 126-133
- Reis, M. (2009). A História do Papel. Consultado a 10 de Agosto de 2013 em <<http://naturlink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Interessante/content/A-historia-do-papel?bl=1&viewall=true>>
- Sá, C. (2001) *A Microscopia Eletrónica de Varrimento e a Micro-análise por Raios X*, CEMUP, Porto.
- Sá, C. (2001) *Digital Analyses of SEM Images for Materials Characterization and Interface/surface Studies of Biological Materials*, CEMUP, Porto.
- Santos, F.; Queiróz, J.; Colodette, J.; Fernandes, S.; Guimarães, V.; Rezende S. (2012). *Quim. Nova* **35**, 1004-1010

- Scheller, H.; Ulvskov, P. (2010). *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 263-289
- Settle, F. (1997). *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Prentice Hall, New Jersey, USA
- Šelih, V.; Strlič, M.; Kolar, J.; Pihlar, B. (2007). *Polym. Degrad. Stabil.* **92**, 1476-1481
- Silva, D.; Almeida, M. (2009). *Revista O Papel* **70**, 34-52
- Silva, R.; Haraguchi, S.; Muniz, E.; Rubira A. (2009). *Quim. Nova* **32**, 661-671
- Skoog, D.; West D.; Holler, F.; Crouch. (2007). *Fundamentos da Química Analítica*. 8^a ed. Thomson, São Paulo
- Stuart, B. (2007). *Analytical Techniques in Materials Conservation*. Department of Chemistry, Materials and Forensic Sciences, University of Technology, Sydney, Australia
- Tsai, W.; Lai, C.; Hsien, K. (2006). *J. Colloid Interface Sci.* **297**, 749-754
- Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. (2010). *Plant Physiol.* **153**, 895-905
- Velho J. (2002). *How Mineral Fillers Influence Paper Properties: Some Guidelines*. Iberoamerican Congress on Pulp and Paper Research. Universidade de Aveiro
- Voet, D.; Voet, J.G. (2004). *Biochemistry*, 3^a ed., J. Wiley & Sons, U.S.A.
- Williams, R. (2006). *The Invention of Paper*. Consultado a 14 de Agosto de 2013 em <http://www.ipst.gatech.edu/amp/collection/museum_invention_paper.htm>
- Wilson, I. (2006). *Filler and Coating Pigments for Papermaker*. Consultado a 12 de Agosto de 2013 em <<http://wakaolin.com/Website%20pdfs/IRW%20PAPER%20PIGMENTS%20%20SME%202006.pdf>>
- Zhang. Y.; Himmel, M.; Mielenz, J. (2006). *Biotechnol. Adv.* **24**, 452-481
- Zotti, M.; Ferroni, A.; Calvini, P. (2011). *Intern. Biodeter. Biodegrad.* **65**, 569-578

Anexos

ANEXO I

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS

Malte Extrato Agar (MEA) 2% g L⁻¹ utilizado para o crescimento de fungos

- 20 g extrato de malte
 - 1 g peptona
 - 20 g glucose
 - 20 g agar bacteriológico
- Dissolver em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Vai à autoclave a 121°C, 20 min, 1 atm

Rosa de Bengale com Cloranfenicol (CBR), meio com antibiótico utilizado para o crescimento de fungos

- 5 g peptona
 - 1 g hidrogenofosfato dipotássio
 - 0,5 g sulfato de magnésio
 - 0,05 g rosa de Bengala
 - 0,1 g cloranfenicol
 - 15,5 g agar
- Dissolver em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Vai à autoclave a 121°C, 20 min, 1 atm

Nutriente Agar (NA) utilizado para o crescimento de bactérias

- 5 g peptona
 - 5 g cloreto de sódio
 - 1,5 g extrato de carne
 - 15 g agar
- Dissolver em 1000 mL de água e ferver em banho-maria até o agar derreter. Vai à autoclave a 121°C, 20 min, 1 atm

MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS

Extrato de Malte Líquido (culturas mistas)

- 20 g extrato de malte
- 1 g peptona
- 20 g glucose

Dissolver em 1000 mL de água. Vai à autoclave a 121°C, 20 min, 1 atm

Meio Mandels (para 1000 mL)

- 10 g carboximetilcelulose
- 0,3 g cloreto de cálcio
- 2 mg cloreto de cobalto ou sulfato de cobalto
- 2 g dihidrogenofosfato de potássio
- 1 g peptona
- 1,4 g sulfato de amónio
- 5 mg sulfato de ferro
- 0,3 g sulfato de magnésio decahidratado
- 1,6 mg sulfato de manganês hidratado
- 1,4 mg sulfato de zinco
- Tween 80 0,2% (p/v)
- 0,3 g ureia

Colocar todos os nutrientes, menos a ureia, num recipiente com água destilada. Acertar o pH a 5,5-6,0 e aquecer com agitação. Vai à autoclave 121°C, durante 15min e após arrefecer juntar a ureia filtrada

Meio BCSL(*corn steep liquor*) (g/200 mL)

Solução *stock* de sais:

- 0,17 g cloreto de cobalto hexahidratado
- 1,0 g cloreto de cobre pentahidratado
- 10,0 g hidrogenofosfato de potássio
- 1,0 g/10 mL H₂O de extrato de levedura

Acertar o pH a 7,0 e esterilizar

Meio de cultura B (250 mL):

- 25 mL solução de sais (preparada anteriormente)
- 2,5 mL CSL
- 1,25 g carboximetilcelulose
- 1,25 g xilano
- 0,5 mL tween 80

Adicionar aos 250mL de meio de cultura B estéril, 0,03g/5mL de ureia esterilizada por filtração.

TAMPÃO CITRATO 0,005 MOL DM⁻³ PH 4,8 (PARA 1000ML)

Reagentes: ácido cítrico 0,1 mol dm⁻³ e citrato de sódio 0,1 mol dm⁻³

Ácido cítrico 0,1 mol dm⁻³

Dissolver 10,507 g de ácido cítrico (C₆H₈O₇·H₂O) num balão volumétrico de 500 mL.

Perfazer o volume com água destilada.

Citrato de sódio 0,1 mol dm⁻³

Dissolver 14,705 g de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) num balão volumétrico de 500 mL.

Perfazer o volume com água destilada.

Preparação do tampão

Adicionar num Erlenmeyer 230 mL de ácido cítrico 0,1 mol dm⁻³ e 270 mL de citrato de sódio 0,1 mol dm⁻³. Perfazer o volume de 1000 mL, num balão volumétrico, com água destilada.

ÁCIDO DINITROSALICÍLICO - DNS (PARA 1000ML)

Dissolver 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 200 mL de NaOH 2 mol dm⁻³ (16 g/200 mL) com aquecimento e agitação.

Dissolver 300 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado em 500 mL de água destilada.

Misturar as duas soluções e perfazer o volume a 1000 mL com água destilada.

AZUL DE COOMASSIE G 0,6% P/V (100ML)

- Pesar 0,06 g azul de coomassie G

- Solução de ácido clorídrico 0,6 N: medir 4,92 mL HCl/100 mL

- Dissolver os 0,06 g de azul de coomassie nos 4,92 mL de HCl e perfazer o volume de 100 mL com água destilada. Colocar em agitação até dissolver.

ANEXO II

A Tabela II.1 e a Fig. II.1 correspondem aos valores e à curva de calibração da D-glucose, respetivamente, e foi utilizada como padrão na determinação da atividade enzimática da celulase.

Tabela II.1. Valores da solução padrão da glucose com concentrações entre 50 e 1000 mg L⁻¹ e medição da absorvância a 540 nm

padrão	[D-Glucose] mg L ⁻¹	Abs			média	desvio padrão
		1	2	3		
1	50	0,002	0,003	0,002	0,002	0,001
2	100	0,026	0,027	0,029	0,027	0,002
3	150	0,049	0,046	0,050	0,048	0,002
4	200	0,085	0,067	0,068	0,073	0,010
5	400	0,190	0,176	0,178	0,181	0,008
6	600	0,284	0,306	0,292	0,294	0,011
7	800	0,386	0,379	0,435	0,400	0,031
8	1000	0,504	0,536	0,529	0,523	0,017

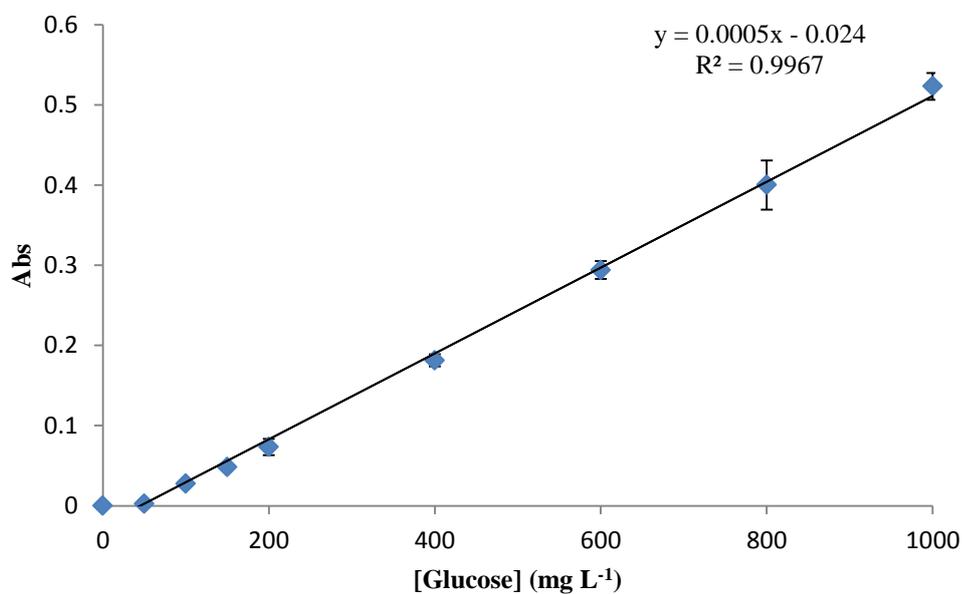


Figura II.1. Curva de calibração da D-glucose

A Tabela II.2 e a Fig. II.2 correspondem aos valores e à curva de calibração do BSA (albumina sérica bovina), respetivamente, e foi utilizada como padrão na determinação da atividade específica da celulase.

Tabela II.2. Valores da solução padrão do BSA com concentrações entre 0 e 15 mg L⁻¹ e medição da absorvância a 630 nm

padrão	[BSA] mg L ⁻¹	Abs			média	desvio padrão
		1	2	3		
1	1	0,003	0,007	0,011	0,007	0,004
2	2	0,020	0,012	0,017	0,016	0,004
3	5	0,047	0,039	0,049	0,045	0,005
4	10	0,098	0,064	0,083	0,082	0,017
5	15	0,123	0,098	0,116	0,112	0,013

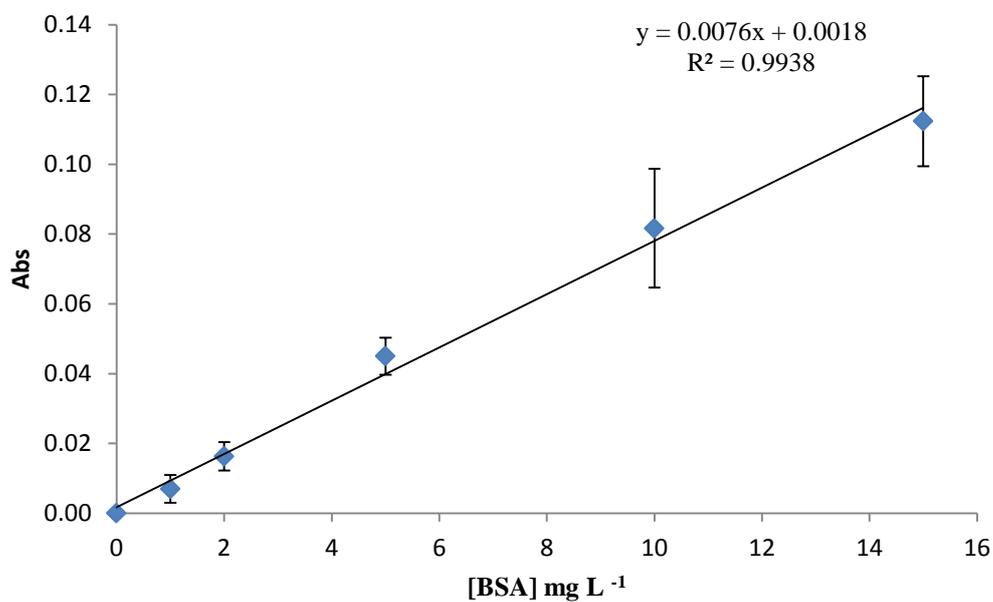


Figura II.2. Curva de calibração do BSA

Nas Tabela II.3 e II.4. é apresentado o teste de análise de variância (ANOVA) no meio Mandels e BCSL, respectivamente.

Tabela II.3. Tabela ANOVA do meio Mandels

		soma dos quadrados	graus de liberdade	variância	F	Sig. (95%)
<i>Penicillium</i> sp1	entre grupos	,101	5	,020	51,408	,000
	dentro dos grupos	,004	11	,000		
	Total	,106	16			
<i>Penicillium</i> sp2	entre grupos	,170	5	,034	90,564	,000
	dentro dos grupos	,004	11	,000		
	Total	,175	16			
<i>Penicillium</i> sp3	entre grupos	,294	5	,059	14,275	,000
	dentro dos grupos	,045	11	,004		
	Total	,339	16			
<i>Penicillium</i> sp4	entre grupos	,125	5	,025	16,108	,000
	dentro dos grupos	,017	11	,002		
	Total	,142	16			
<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i>	entre grupos	,135	5	,027	38,439	,000
	dentro dos grupos	,008	11	,001		
	Total	,143	16			

Tabela II.4. Tabela ANOVA do meio BCSL

		soma dos quadrados	graus de liberdade	variância	F	Sig. (95%)
<i>Penicillium</i> sp1	entre grupos	,002	5	,000	15,144	,000
	dentro dos grupos	,000	12	,000		
	total	,003	17			
<i>Penicillium</i> sp2	entre grupos	,003	5	,001	59,681	,000
	dentro dos grupos	,000	12	,000		
	total	,003	17			
<i>Penicillium</i> sp3	entre grupos	,012	5	,002	28,134	,000
	dentro dos grupos	,001	12	,000		
	total	,013	17			
<i>Penicillium</i> sp4	entre grupos	,031	5	,006	6,685	,003
	dentro dos grupos	,011	12	,001		
	total	,042	17			
<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i>	entre grupos	,092	5	,018	37,158	,000
	dentro dos grupos	,006	12	,000		
	total	,098	17			

ANEXO III

IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DAS MANCHAS DE FOXING INDUZIDAS NOS DIFERENTES PAPÉIS CONTEMPORÂNEOS USADOS

Nas Tabelas III.1 a III.16 são apresentadas imagens de microscopia ótica de papéis contemporâneos, nos quais foram induzidas manchas de foxing, por culturas mistas de fungos (CM1 a CM8), obtidas a partir dos papéis contendo foxing (P1 a P8), e por soluções de íons Fe^{2+} e Cu^{2+} seguidas das mesmas culturas mistas.

Tabela III.1. Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos no papel para aguarela

CM1		CM2	
(0,78x)	(16x)	(0,78x)	(10x)
CM3		CM4	
(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(12,5x)
CM5		CM6	
(0,78x)	(6,3x)	(0,78x)	(12,5x)
CM7		CM8	
(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(12,5x)

Tabela III.2. Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos no papel para aguarela envelhecido

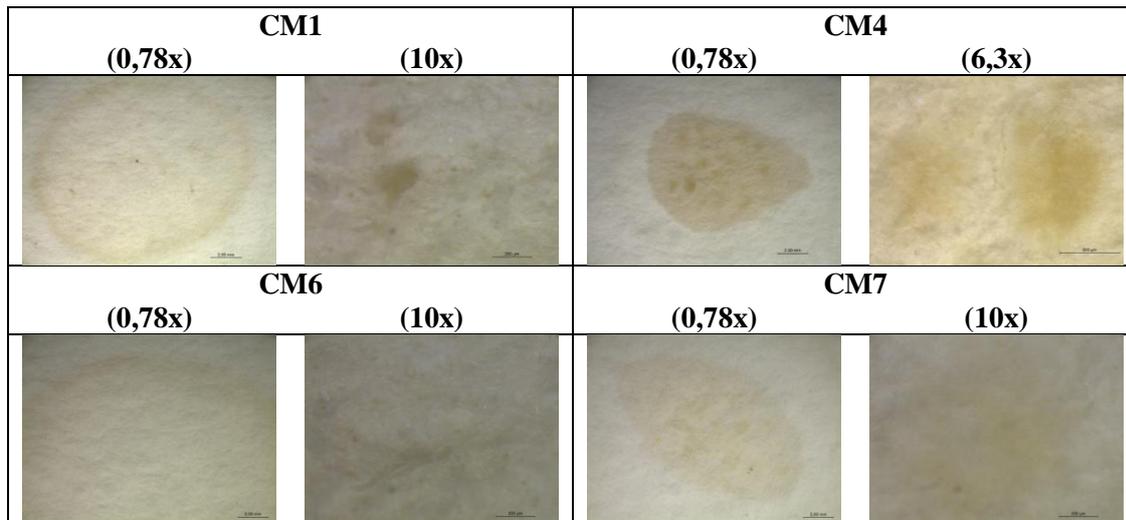


Tabela III.3. Manchas de foxing induzidas por soluções de ião Fe^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos no papel para aguarela

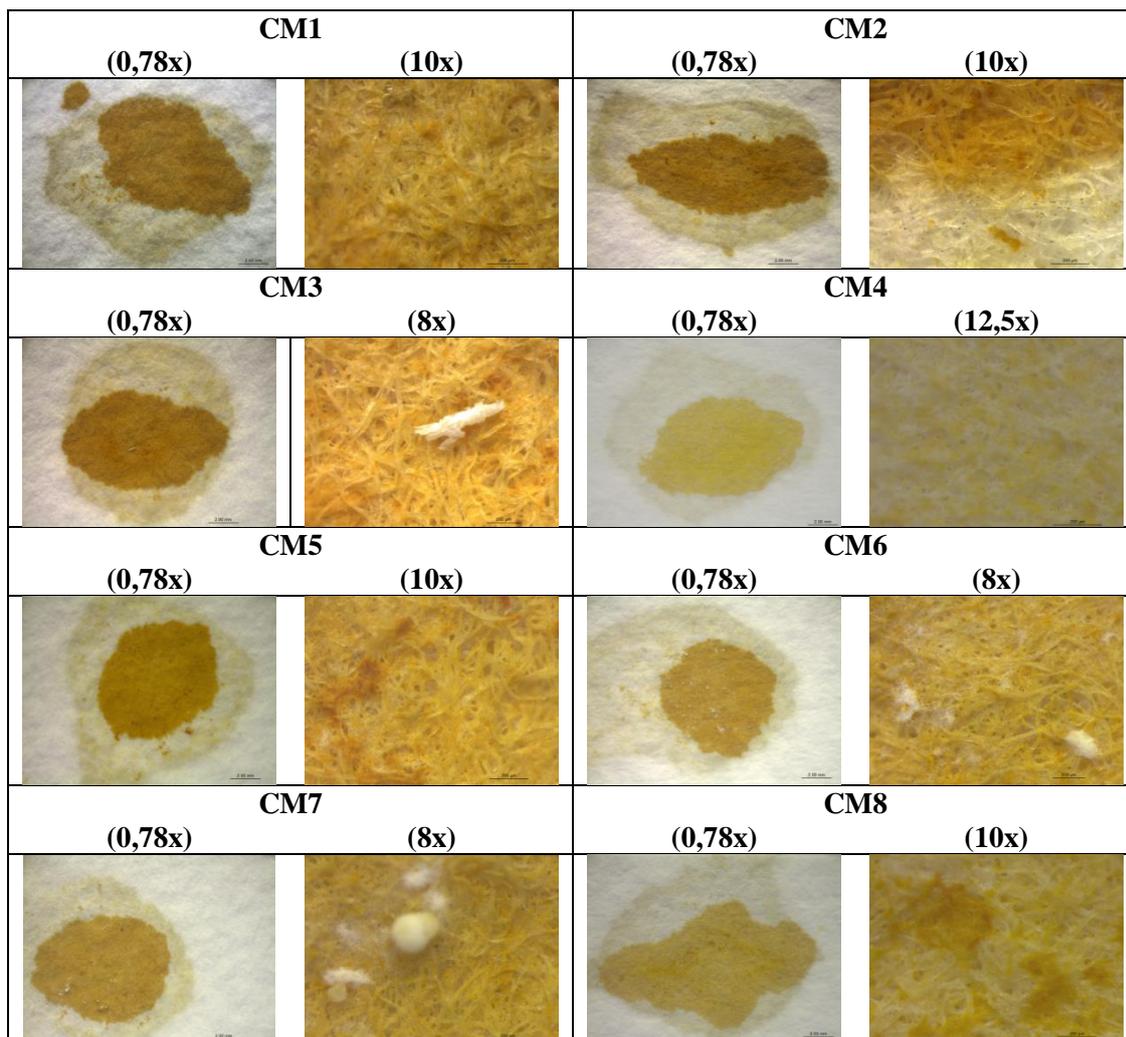


Tabela III.4. Manchas de foxing induzidas por soluções de íão Cu^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos no papel para aguarela

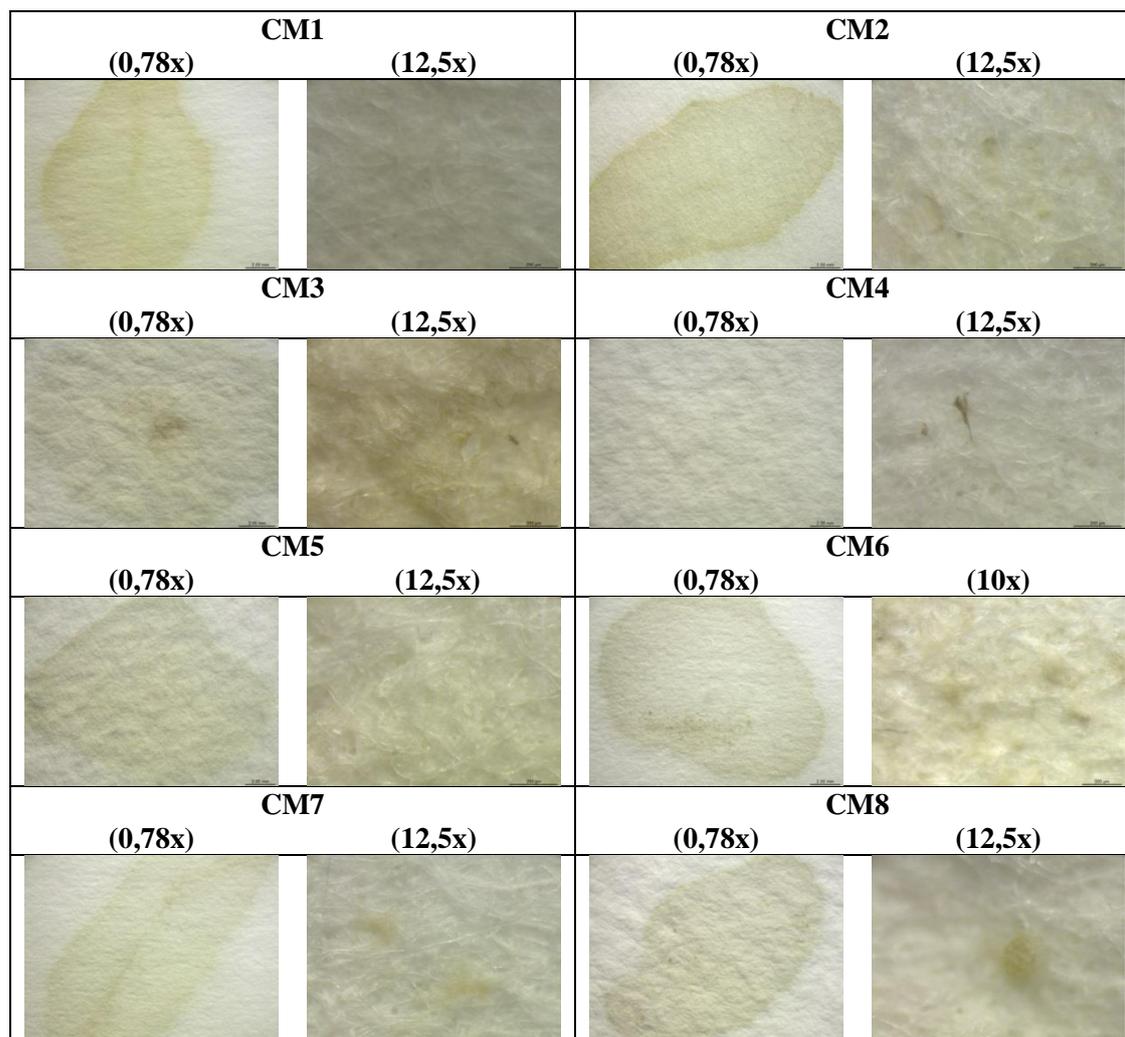


Tabela III.5. Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos na cartolina duplex

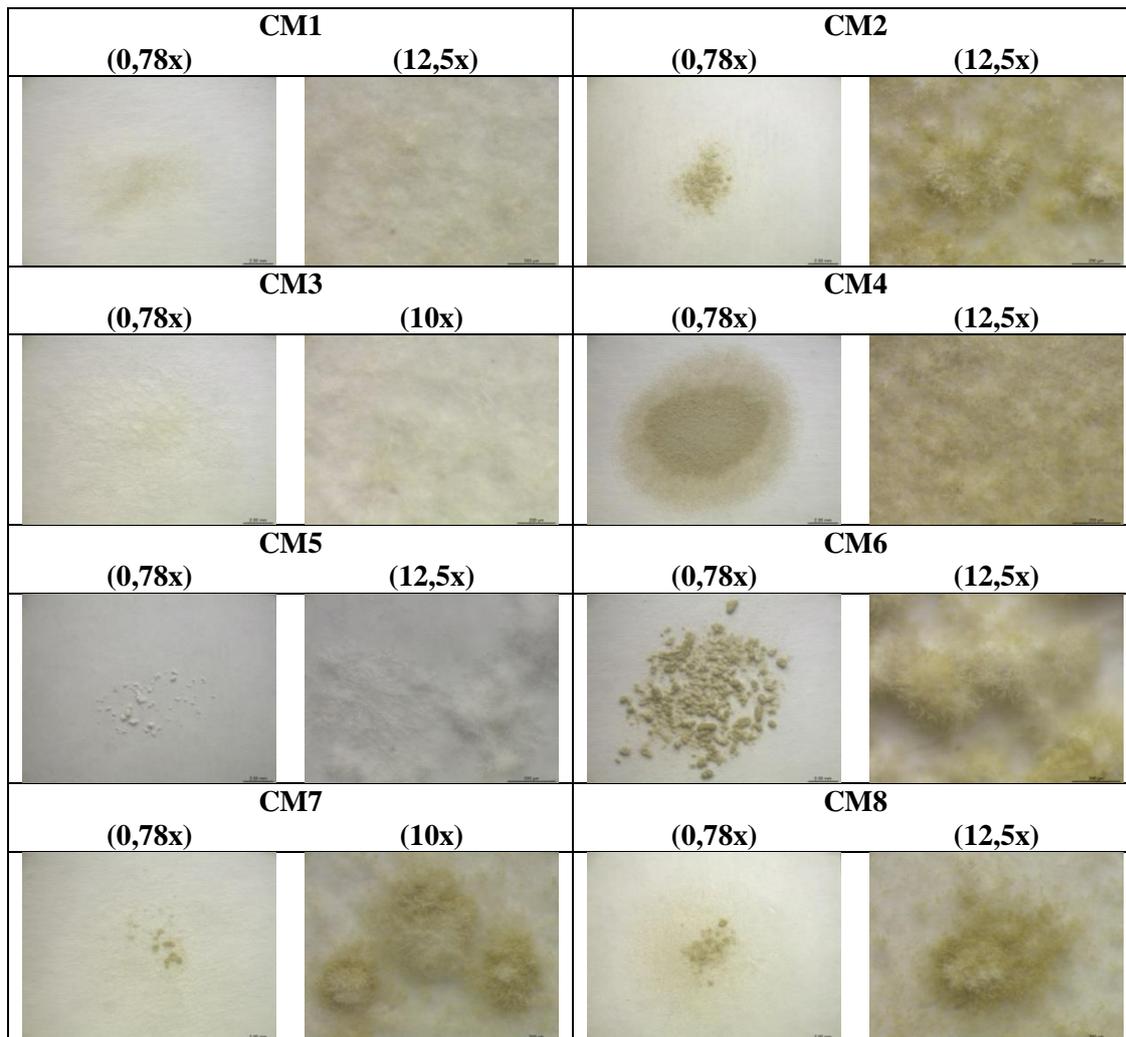


Tabela III.6. Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos na cartolina duplex envelhecida

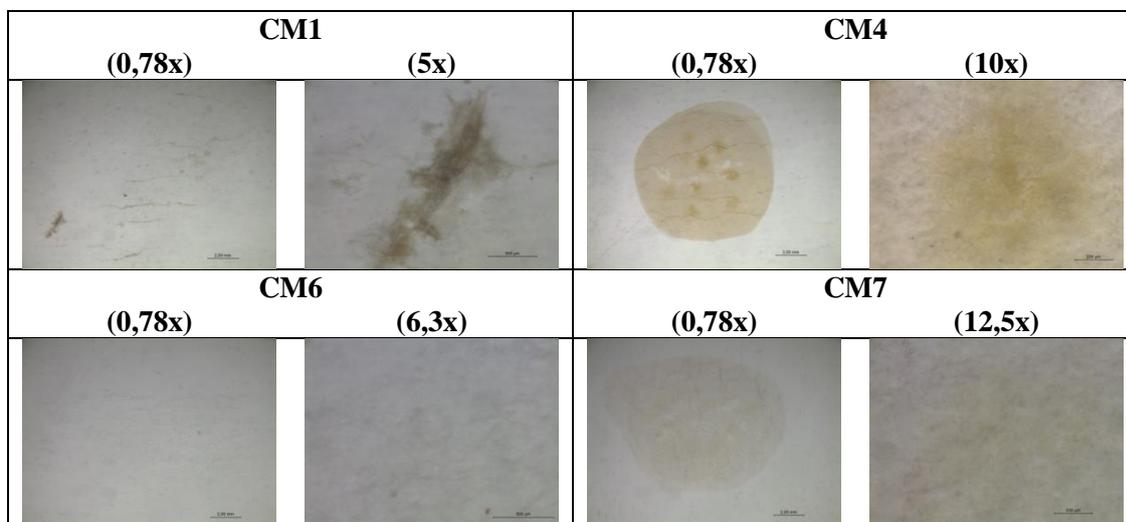


Tabela III.7. Manchas de foxing induzidas por soluções de íão Fe^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos na cartolina duplex

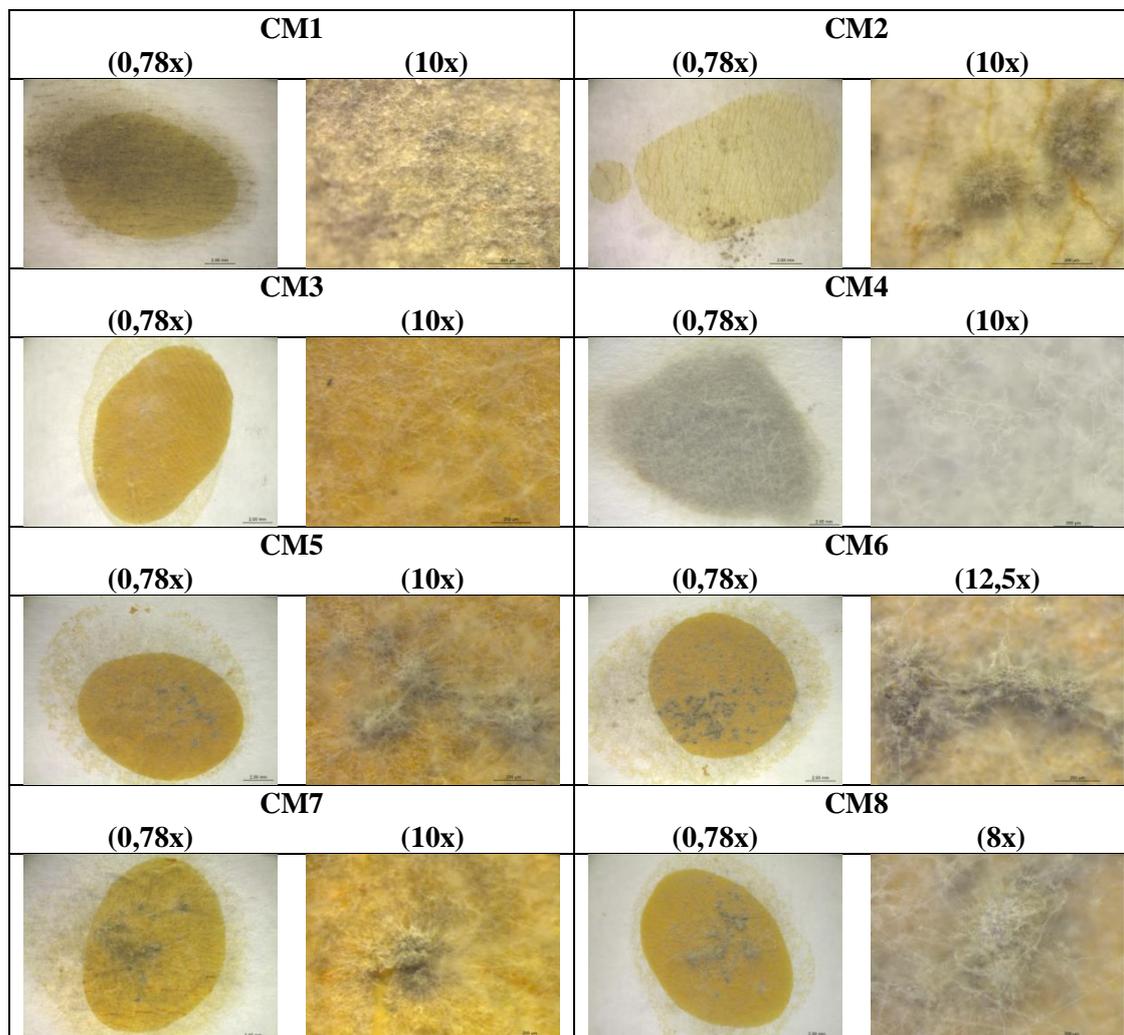


Tabela III.8. Manchas de foxing induzidas por soluções de íão Cu^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos na cartolina duplex

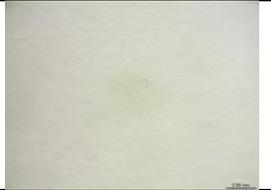
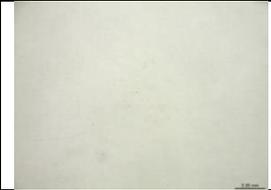
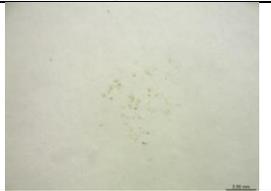
CM1		CM2	
(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(12,5x)
			
CM3		CM4	
(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(12,5x)
			
CM5		CM6	
(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(6,3x)
			
CM7		CM8	
(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(12,5x)
			

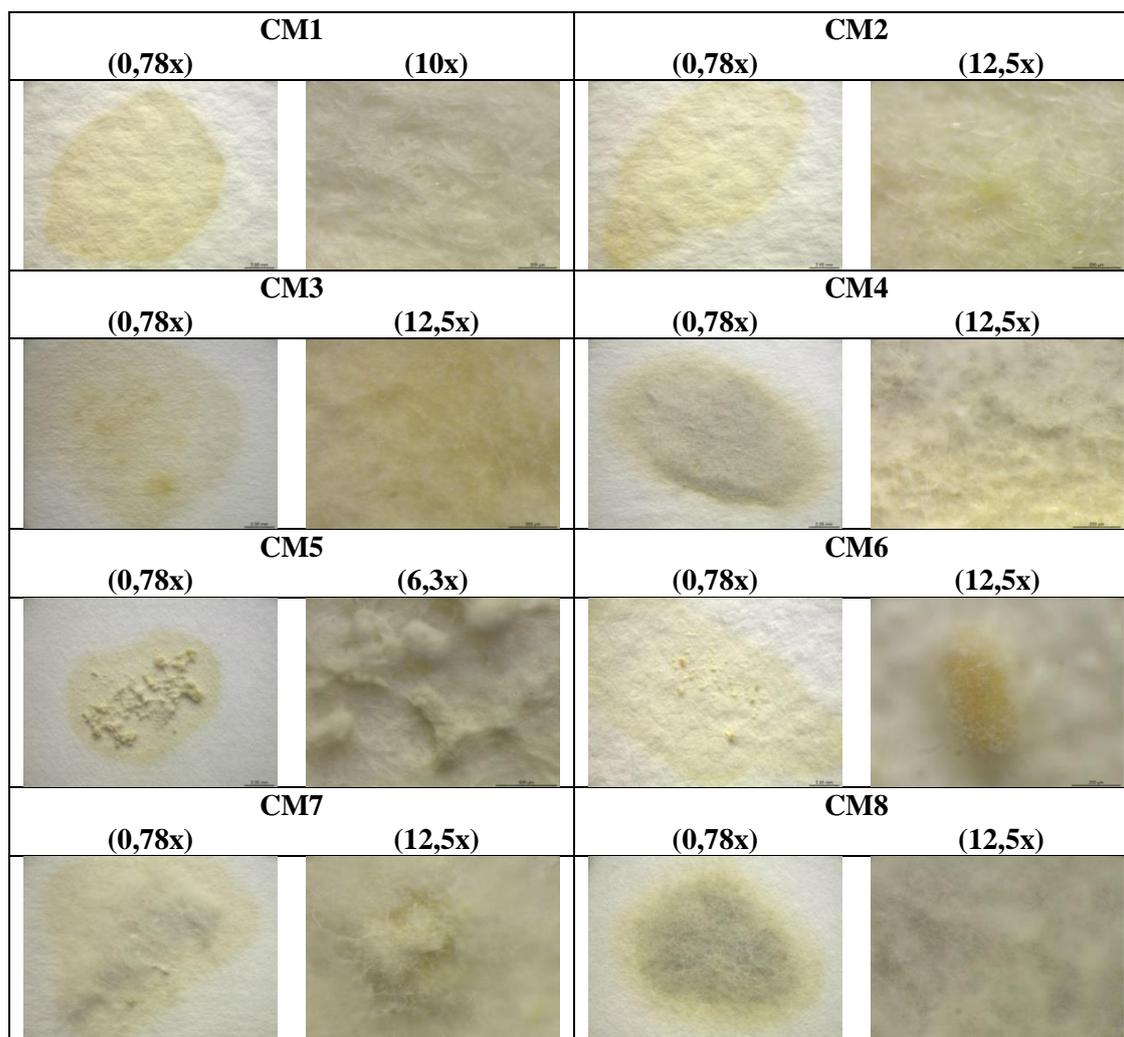
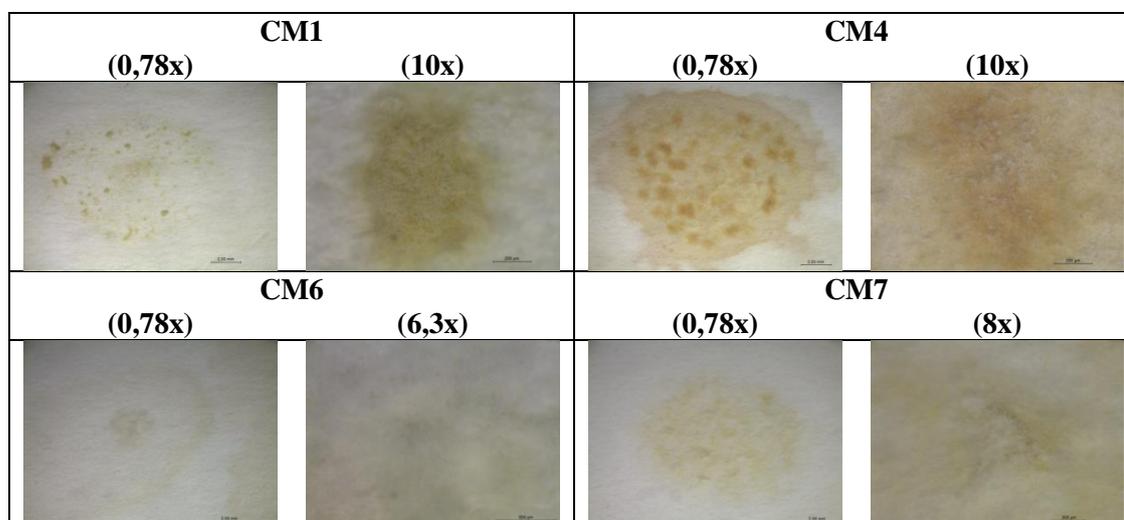
Tabela III.9. Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos no papel para gravura**Tabela III.10.** Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos no papel para gravura envelhecido

Tabela III.11. Manchas de foxing induzidas por soluções de ião Fe^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos no papel para gravura

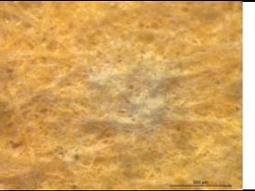
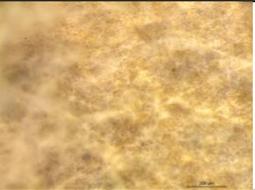
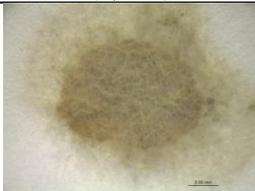
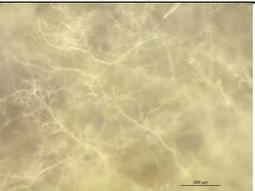
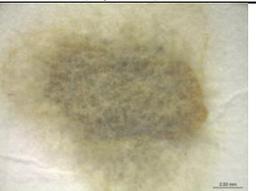
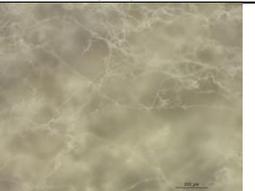
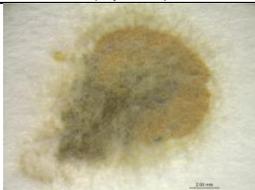
CM1		CM2	
(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(16x)
			
CM3		CM4	
(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(10x)
			
CM5		CM6	
(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(8x)
			
CM7		CM8	
(0,78x)	(8x)	(0,78x)	(10x)
			

Tabela III.12. Manchas de foxing induzidas por soluções de ião Cu^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos no papel para gravura

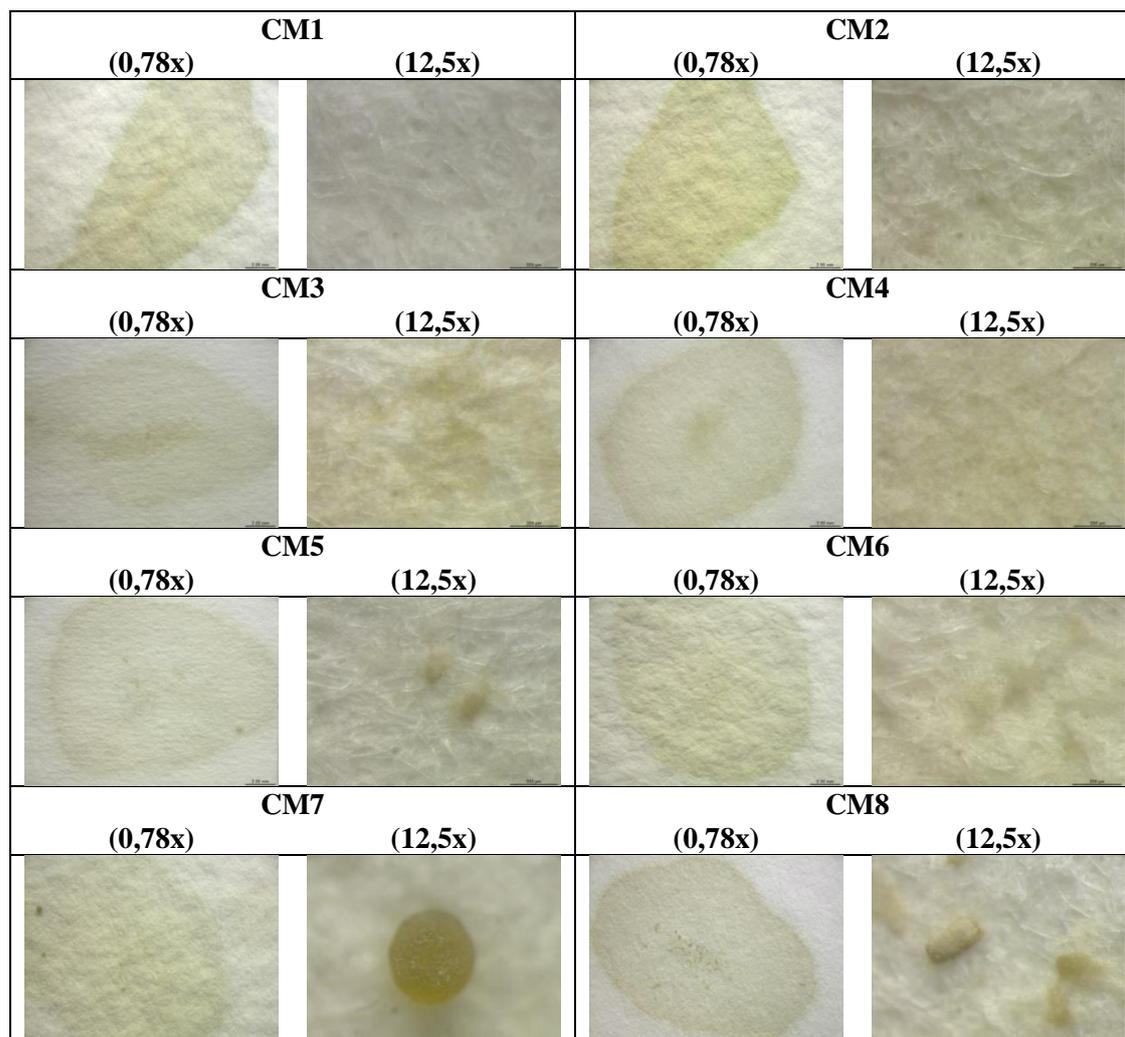


Tabela III.13. Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos no cartão madeira

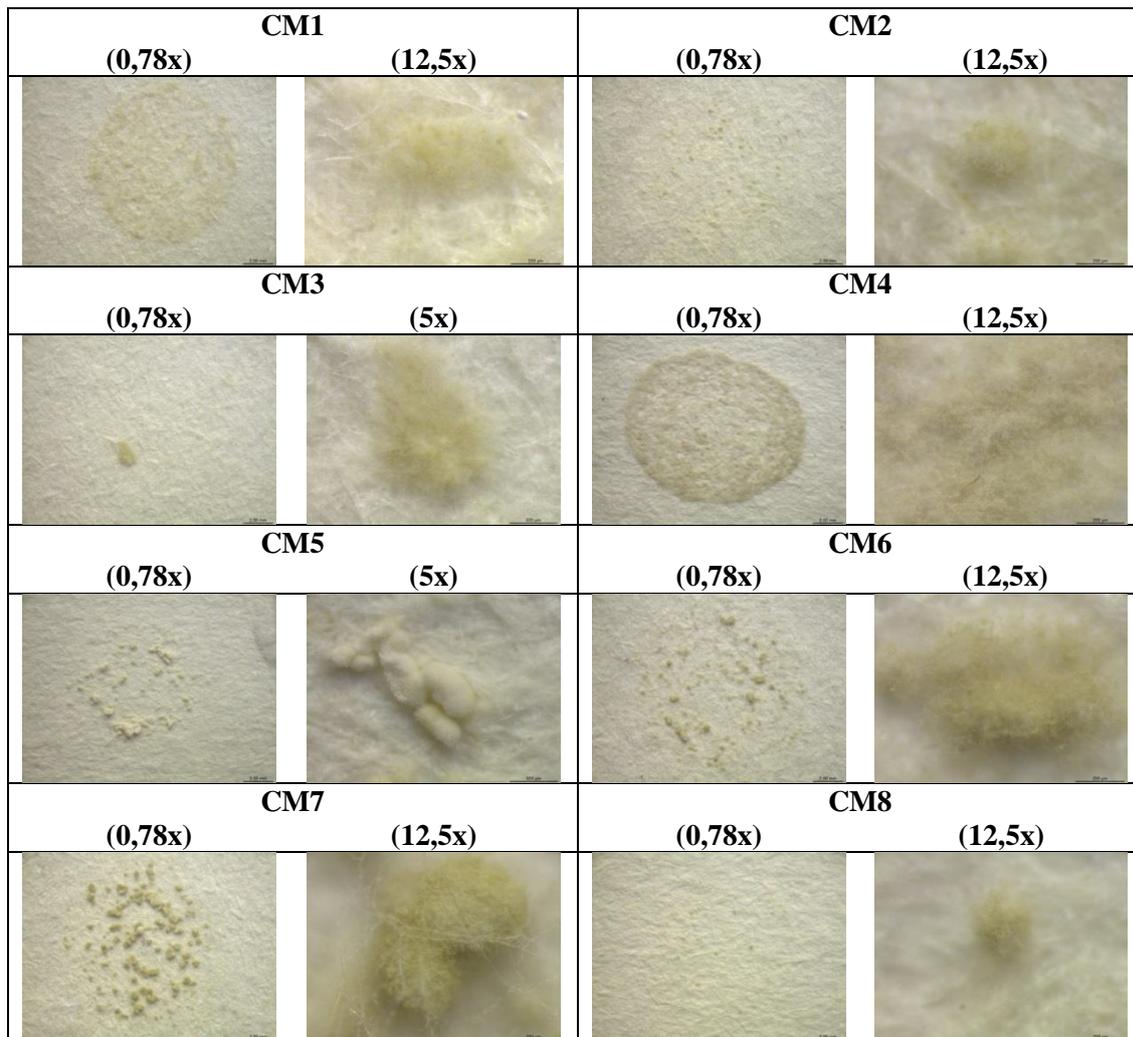


Tabela III.14. Manchas de foxing induzidas por culturas mistas de fungos no cartão madeira envelhecido

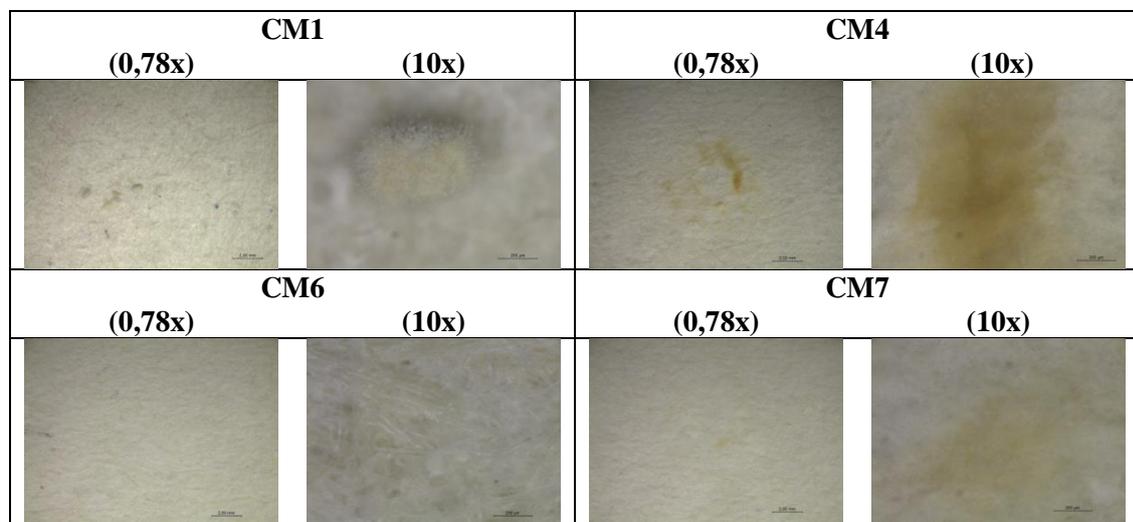


Tabela III.15. Manchas de foxing induzidas por soluções de ião Fe^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos no cartão madeira

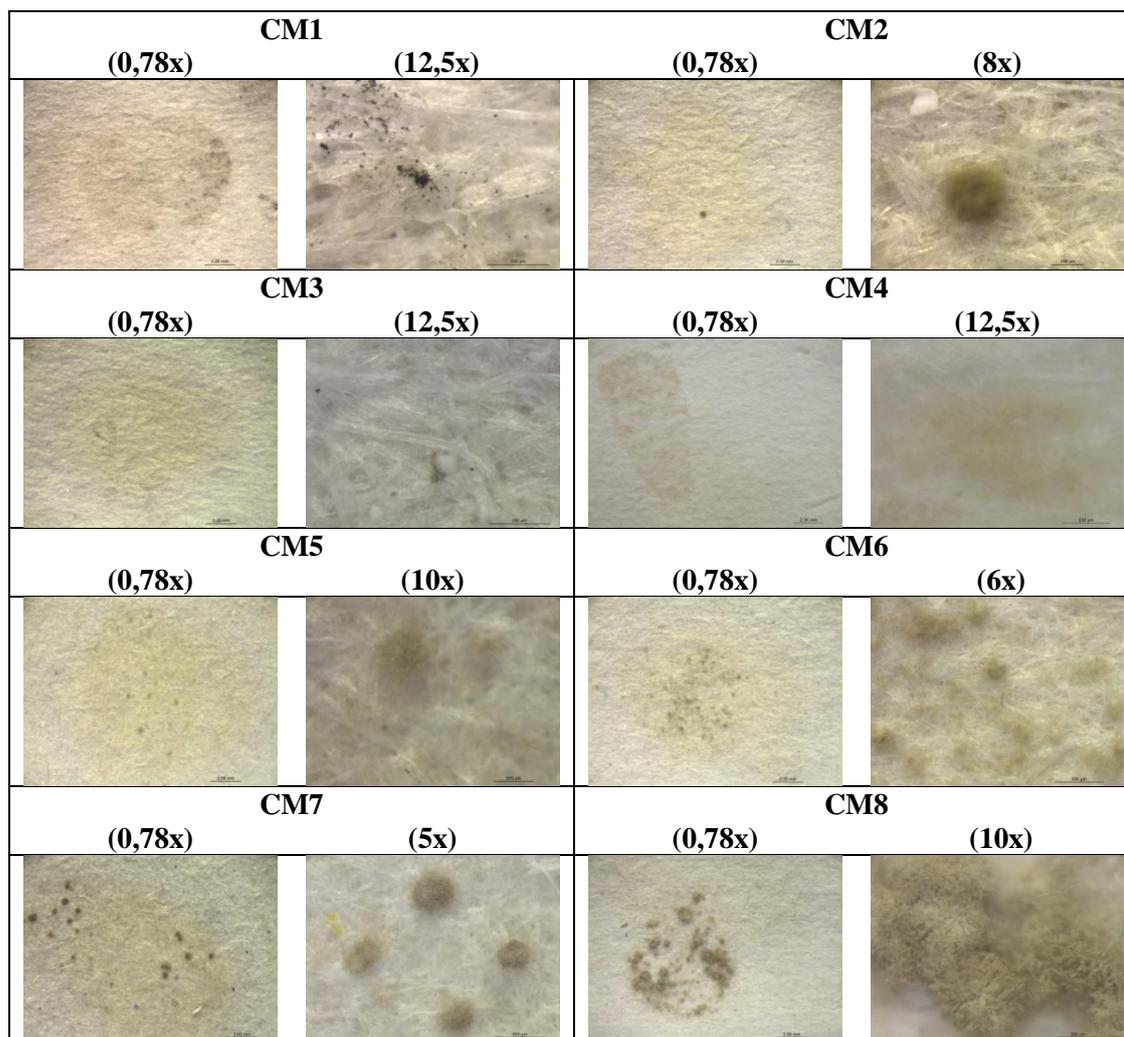


Tabela III.16. Manchas de foxing induzidas por soluções de ião Cu^{2+} seguidas de culturas mistas de fungos no cartão madeira

CM1		CM2	
(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(12,5x)
			
CM3		CM4	
(0,78x)	(12,5x)	(0,78x)	(12,5x)
			
CM5		CM6	
(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(10x)
			
CM7		CM8	
(0,78x)	(10x)	(0,78x)	(5x)
			

ANEXO IV

ANÁLISE COLORIMÉTRICA

Nas tabelas IV.1 a IV.12 são apresentados os valores das coordenadas $L^*a^*b^*C^*h^\circ$ dos papéis contemporâneos (naturais e envelhecidos), nos quais foram induzidas manchas por ião Fe^{2+} ou por ião Cu^{2+} , pela CM4 ou por ião Fe^{2+} ou Cu^{2+} seguidas da CM4.

MANCHAS INDUZIDAS POR IÃO Fe^{2+} OU POR IÃO Cu^{2+}

Tabela IV.1. Valores das coordenadas $L^*a^*b^*C^*h^\circ$ do papel para aguarela, com manchas induzidas por ião Fe^{2+} ou por ião Cu^{2+} em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	87,85	0,01	5,04	5,04	89,93
$Fe^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$	64,61	14,07	40,75	43,12	70,95
$Fe^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	69,42	7,97	33,79	34,71	76,72
$Cu^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$	74,59	-5,36	2,08	5,75	158,83
$Cu^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	76,32	-2,88	3,96	4,89	126,00
controle envelhecido	80,27	-0,04	10,85	10,85	90,24
$Fe^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	63,33	12,61	34,18	36,43	69,75
$Fe^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	69,99	6,37	27,97	28,69	77,16
$Cu^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	69,32	-2,94	17,31	17,56	99,65
$Cu^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	74,31	-1,00	16,09	16,12	93,56

Tabela IV.2. Valores das coordenadas $L^*a^*b^*C^*h^\circ$ da cartolina duplex, com manchas induzidas por ião Fe^{2+} ou por ião Cu^{2+} em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	81,49	-0,38	0,76	0,85	116,66
$Fe^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$	61,77	15,40	34,98	38,22	66,24
$Fe^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	69,82	5,38	34,67	35,09	81,18
$Cu^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$	76,90	-4,97	1,17	5,10	166,77
$Cu^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$	77,79	-2,49	2,15	3,29	139,16
controle envelhecido	80,57	-0,95	5,23	5,31	100,29
$Fe^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	59,60	19,33	42,47	46,66	65,53
$Fe^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	71,47	5,84	38,62	39,06	81,41
$Cu^{2+} 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	69,67	-3,16	11,80	12,22	105,00
$Cu^{2+} 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ envelhecido	71,48	0,37	16,51	16,51	88,73

Tabela IV.3. Valores das coordenadas $L^*a^*b^*C^*h^\circ$ do papel para gravura, com manchas induzidas por íão Fe^{2+} ou por íão Cu^{2+} em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	85,02	-0,02	2,54	2,54	90,43
Fe^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}	68,21	15,25	40,01	42,82	69,14
Fe^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}	70,98	9,45	35,43	36,67	75,07
Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}	78,64	-3,70	1,53	4,01	157,49
Cu^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}	81,68	-2,29	2,42	3,33	131,24
controle envelhecido	83,91	0,16	4,72	4,82	88,64
Fe^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3} envelhecido	61,77	18,76	39,70	43,91	64,71
Fe^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} envelhecido	74,32	7,82	33,72	34,61	76,95
Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3} envelhecido	68,50	1,61	13,25	13,34	83,08
Cu^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} envelhecido	74,09	2,47	14,20	14,41	80,13

Tabela IV.4. Valores das coordenadas $L^*a^*b^*C^*h^\circ$ do cartão madeira, com manchas induzidas por íão Fe^{2+} ou por íão Cu^{2+} em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	73,97	0,24	8,88	8,88	88,43
Fe^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}	69,95	1,93	12,04	12,19	80,90
Fe^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}	67,93	1,35	9,48	9,57	81,89
Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3}	69,69	0,35	10,37	10,38	88,05
Cu^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}	70,41	0,35	9,49	9,49	87,89
controle envelhecido	71,79	0,80	12,06	12,09	86,19
Fe^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3} envelhecido	64,59	2,91	14,81	15,10	78,87
Fe^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} envelhecido	61,37	2,36	12,50	12,72	79,31
Cu^{2+} $1,0 \times 10^{-2}$ mol dm^{-3} envelhecido	60,77	3,28	16,28	16,61	78,62
Cu^{2+} $2,5 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3} envelhecido	66,74	2,09	15,57	15,71	82,37

MANCHAS INDUZIDAS PELA CM4

Tabela IV.5. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° do papel para aguarela, com manchas induzidas por CM4 em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	76,24	0,32	15,60	15,61	88,84
CM4 - 2 meses	73,72	0,74	13,97	13,99	86,99
CM4 - 3 meses	74,76	1,13	16,75	16,79	86,14
CM4 envelhecida - 1 semana	68,99	5,87	22,50	23,26	75,38
CM4 envelhecida – 1 mês	71,46	5,88	23,07	23,80	75,70
CM4 envelhecida – 2 meses	68,29	8,02	30,21	31,25	75,14
CM4 envelhecida – 3 meses	70,25	11,26	30,89	32,88	69,97

Tabela IV.6. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° da cartolina duplex, com manchas induzidas pela CM4 em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	75,71	-0,03	3,50	3,50	90,43
CM4 - 2 meses	57,17	3,19	14,83	15,17	77,86
CM4 - 3 meses	56,00	4,00	16,85	17,32	76,64
CM4 envelhecida - 1 semana	70,19	4,55	18,80	19,34	76,39
CM4 envelhecida – 1 mês	70,03	4,23	16,92	17,44	75,97
CM4 envelhecida – 2 meses	69,27	4,92	18,53	19,17	75,12
CM4 envelhecida – 3 meses	68,86	4,67	17,81	18,41	75,29

Tabela IV.7. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° do papel para gravura, com manchas induzidas pela CM4 em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	78,88	0,02	14,44	14,44	89,90
CM4 - 2 meses	64,39	0,47	9,50	9,51	87,17
CM4 - 3 meses	60,83	1,10	11,56	11,62	84,57
CM4 envelhecida - 1 semana	71,40	11,01	31,04	32,94	70,46
CM4 envelhecida – 1 mês	70,36	11,84	31,13	33,30	69,18
CM4 envelhecida – 2 meses	68,29	8,02	30,21	31,25	75,14
CM4 envelhecida – 3 meses	70,25	11,26	30,89	32,88	69,97

Tabela IV.8. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° do cartão madeira, com manchas induzidas pela CM4 em papel envelhecido e não envelhecido

	L	a*	b*	C*	h°
controle	74,68	0,09	9,32	9,32	89,45
CM4 - 2 meses	65,45	1,82	13,88	14,00	82,52
CM4 - 3 meses	64,95	1,60	13,17	13,27	83,09
CM4 envelhecido - 1 semana	67,84	1,55	15,21	15,29	84,17
CM4 envelhecido – 1 mês	70,63	2,53	18,42	18,59	82,18
CM4 envelhecido – 2 meses	68,29	8,02	30,21	31,25	75,14
CM4 envelhecido – 3 meses	67,58	4,12	22,91	23,27	79,80

MANCHAS INDUZIDAS POR IÃO Fe^{2+} OU POR IÃO Cu^{2+} (NA CONCENTRAÇÃO DE $1,0 \times 10^{-2}$ MOLDM⁻³) SEGUIDAS DA CM4

Tabela IV.9. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° do papel para aguarela, com manchas induzidas por ião Fe^{2+} ou por ião Cu^{2+} seguidos da CM4

	L	a*	b*	C*	h°
controle	76,24	0,32	15,60	15,61	88,84
Fe^{2+}	64,61	14,07	40,75	43,12	70,95
Fe^{2+} e CM4 – 2 meses	58,16	-0,03	6,41	6,41	90,27
Fe^{2+} e CM4 – 3 meses	57,47	16,01	34,49	38,03	65,10
Cu^{2+}	74,59	-5,36	2,08	5,75	5,04
Cu^{2+} e CM4 – 2 meses	75,96	-1,66	9,69	9,83	99,73
Cu^{2+} e CM4 – 3 meses	72,70	-1,56	9,79	9,92	99,06

Tabela IV.10. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° da cartolina duplex, com manchas induzidas por ião Fe^{2+} ou por ião Cu^{2+} seguidos da CM4

	L	a*	b*	C*	h°
controle	75,71	-0,03	3,50	3,50	90,43
Fe^{2+}	61,77	15,40	34,98	38,22	66,24
Fe^{2+} e CM4 – 2 meses	66,26	1,02	5,65	5,75	79,76
Fe^{2+} e CM4 – 3 meses	53,11	6,65	15,92	17,26	67,34
Cu^{2+}	76,90	-4,97	1,17	5,10	166,77
Cu^{2+} e CM4 – 2 meses	73,75	-1,83	10,54	10,70	99,87
Cu^{2+} e CM4 – 3 meses	75,07	-1,76	11,56	11,70	98,63

Tabela IV.11. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° do papel para gravura, com manchas induzidas por íão Fe²⁺ ou por íão Cu²⁺ seguidos da CM4

	L	a*	b*	C*	h°
controle	78,88	0,02	14,44	14,44	89,90
Fe²⁺	68,21	15,25	40,01	42,82	69,14
Fe²⁺ e CM4 – 2 meses	60,65	9,99	21,32	23,55	64,91
Fe²⁺ e CM4 – 3 meses	55,04	0,15	9,10	9,10	89,03
Cu²⁺	78,64	-3,70	1,53	4,01	157,49
Cu²⁺ e CM4 – 2 meses	70,47	-0,60	16,18	16,19	92,11
Cu²⁺ e CM4 – 3 meses	72,03	-1,24	14,42	14,47	94,93

Tabela IV.12. Valores das coordenadas L*a*b*C*h° do cartão madeira, com manchas induzidas por íão Fe²⁺ ou por íão Cu²⁺ seguidos da CM4

	L	a*	b*	C*	h°
controle	74,68	0,09	9,32	9,32	89,45
Fe²⁺	69,95	1,93	12,04	12,19	80,90
Fe²⁺ e CM4 – 2 meses	66,61	1,15	11,21	11,27	84,15
Fe²⁺ e CM4 – 3 meses	63,06	2,68	15,37	15,60	80,12
Cu²⁺	69,69	0,35	10,37	10,38	88,05
Cu²⁺ e CM4 – 2 meses	69,19	0,70	11,86	11,88	86,63
Cu²⁺ e CM4 – 3 meses	68,82	0,93	12,65	12,68	85,69

ANEXO V

CARACTERIZAÇÃO DE PAPEL POR ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Para uma interpretação mais adequada dos espectros de FT-IR-ATR apresentados no capítulo 3, são apresentados os respectivos espectros retirados da base de dados do IRUG.

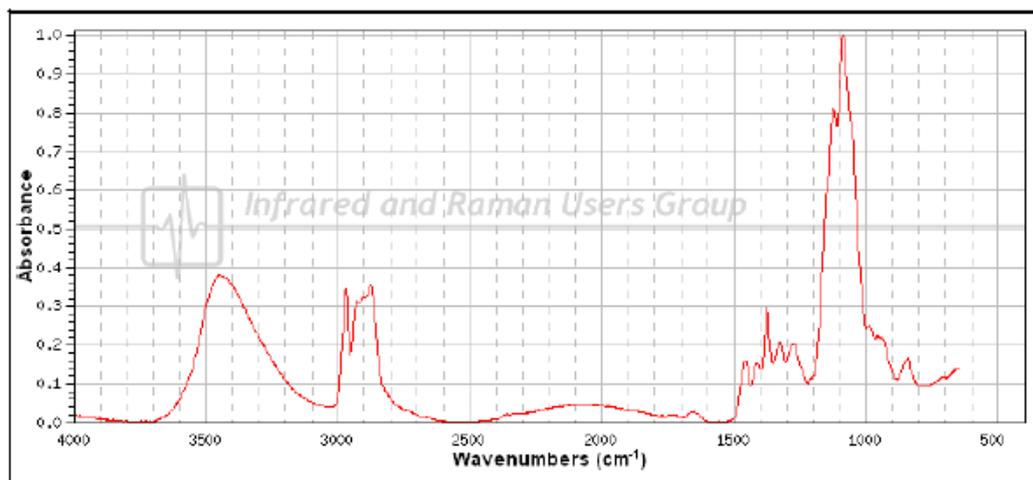


Figura V.1. Espectro de absorção da celulose

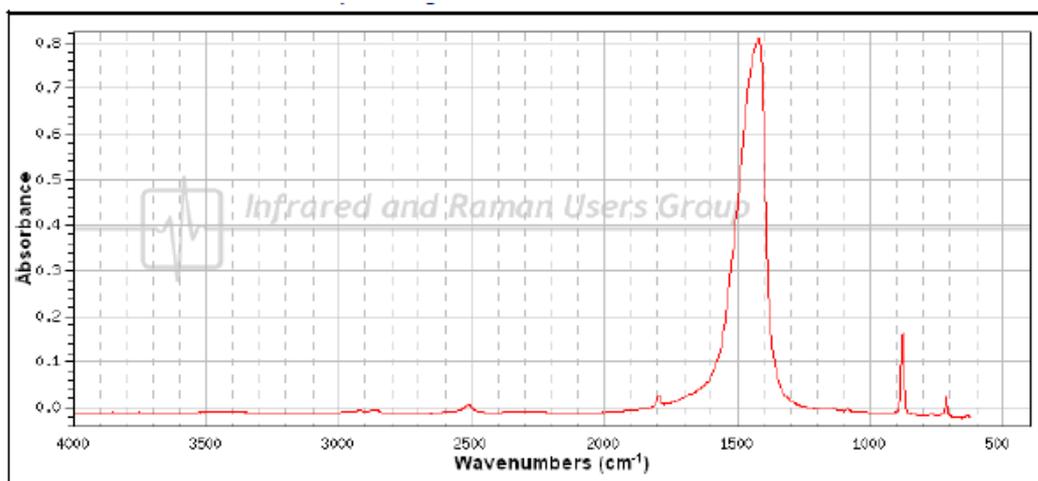


Figura V.2. Espectro de absorção do carbonato de cálcio

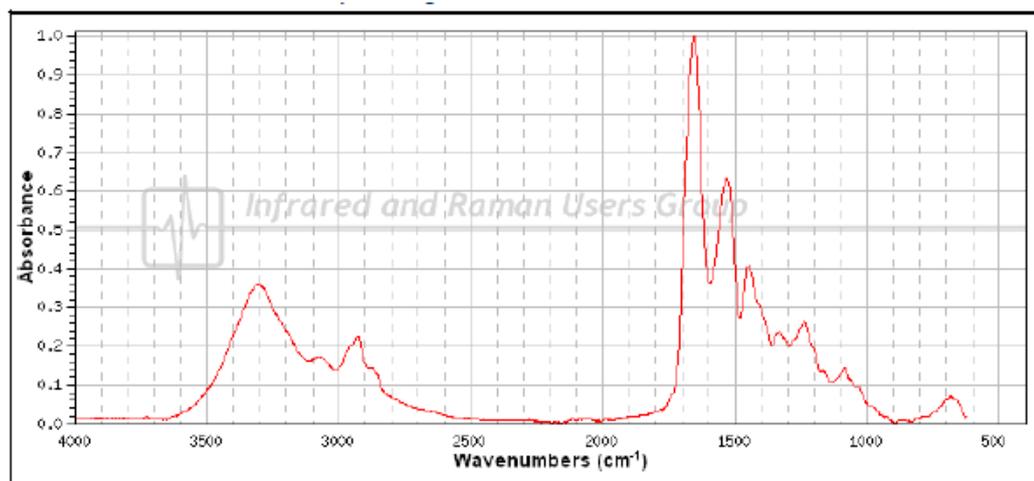


Figura V.3. Espectro de absorção da gelatina (usada como cola)

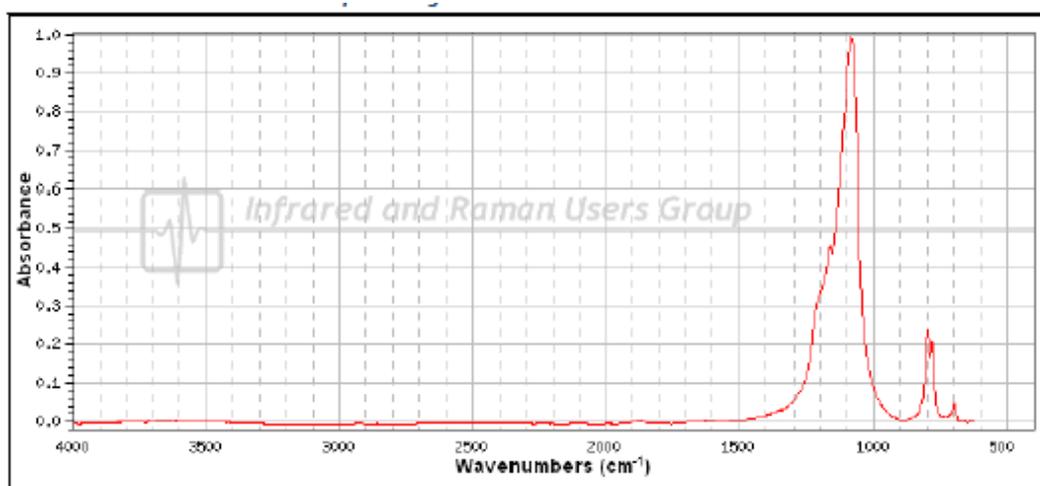


Figura V.4. Espectro de absorção da sílica

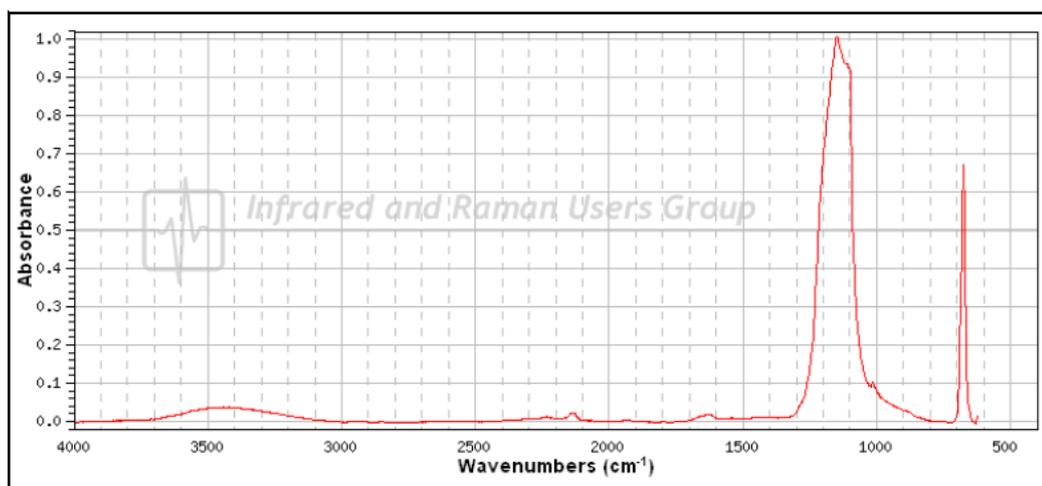


Figura V.5. Espectro de absorção do sulfato de cálcio