



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Análise química, morfológica e microbiológica de negativos fotográficos do século XX

Cátia Sofia Ferreira Coelho

Orientação: Professora Doutora Teresa Ferreira

Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Análise química, morfológica e microbiológica de negativos fotográficos do século XX

Cátia Sofia Ferreira Coelho

Orientação: Professora Doutora Teresa Ferreira

Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2015

Quero agradecer à minha orientadora Prof. Dra. Teresa Ferreira pela oportunidade que me deu em poder realizar este trabalho, pela sua orientação, por todo o apoio, compreensão e disponibilidade demonstrada. Agradeço também à minha coorientadora Prof. Dra. Ana Teresa Caldeira que sempre se mostrou disponível na realização deste trabalho, pela sua ajuda e incentivo.

Agradeço também a Francisco Almeida e à Dra. Rita Vaz Freire pela disponibilização da coleção de negativos. Ao Dr. Luís Pavão um muito obrigado pela disponibilização dos negativos contemporâneos.

Um muito obrigada à Cátia Relvas, à Margarida Nunes por toda a disponibilidade, ajuda e apoio que me deram no decorrer deste trabalho.

Quero agradecer também à Sónia Costa pelas fotografias tiradas aos negativos e à Ana Margarida Cardoso pela sua ajuda na análise dos resultados de ATR-FT-IR.

A todo o pessoal do Laboratório de Biotecnologia, mas em especial à Dona Helena, Dona Esperança, Tânia Rosado, Marina, um muito obrigada por toda a ajuda, apoio e paciência, assim como a todos os que trabalham no Laboratório HERCULES e que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar.

Agradeço ao Denis Rodrigues pelas análises de pirólise por ele efetuadas no Laboratório José de Figueiredo. Um muito obrigada à Prof. Dra. Cristina Dias, à Dra. Ana Manhita e ao Sérgio Martins pela ajuda na análise e interpretação dos resultados da pirólise.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais pelo seu apoio, incentivo e esforço que sempre fizeram para me permitir continuar o meu percurso académico e ao meu namorado Cláudio, pela sua paciência, pelas palavras de força, por me apoiar incondicionalmente e por não me deixar desistir.

Agradecimentos	i
Índice geral	iii
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	ix
Índice de abreviaturas	xii
Resumo	xv
Abstract.....	xvii
Caraterização do problema	xix
Objetivos do trabalho	xxi
1. Introdução	1
1.1. História da fotografia	3
1.2. Negativos em acetato de celulose	6
1.2.1. O acetato de celulose	6
1.2.2. Constituição de um negativo	7
1.3. Deterioração de negativos com suporte de acetato de celulose	9
1.3.1. Deterioração química.....	9
1.3.2. Biodeterioração.....	11
1.3.2.1. Degradação enzimática da celulose	12
1.4. Técnicas analíticas usadas na caraterização material.....	14
1.4.1. Fotografia	14
1.4.2. Microscopia ótica	14
1.4.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR)	15

1.4.4. Espectroscopia de absorção molecular no Ultravioleta/Visível (UV/VIS)	16
1.4.5. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS)	17
1.4.6. Espectroscopia de fluorescência de raios-X.....	19
1.4.7. Micro-difração de raios-X (μ -DRX)	20
1.4.8. Pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS)	20
2. Metodologia.....	23
2.1. Estratégia adotada	25
2.2. Diagrama de trabalho	27
2.3. Procedimento experimental	30
2.3.1. Seleção de amostras.....	30
2.3.1.1. Amostras históricas.....	30
2.3.1.2. Amostras contemporâneas	30
2.3.2. Técnicas de análise usadas na caracterização química e morfológica das amostras.....	30
2.3.2.1. Fotografia.....	30
2.3.2.2. Microscopia ótica.....	30
2.3.2.3. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS).....	31
2.3.2.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR)	32

2.3.2.5. Espectroscopia de absorção molecular no Ultravioleta/Visível (UV/VIS)	32
2.3.2.6. Espectroscopia de fluorescência de raios-X	33
2.3.2.7. Micro-difração de raios-X (μ -DRX).....	34
2.3.2.8. Pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS).....	35
2.3.3. Estudo microbiológico.....	35
2.3.3.1. Isolamento de microrganismos	35
2.3.3.2. Identificação dos isolados bacterianos.....	36
2.3.3.3. Cultura dos isolados bacterianos na presença de matriz de película fotográfica	36
2.3.3.4. Avaliação da atividade celulolítica	36
3. Resultados e discussão.....	39
3.1. Caracterização material de negativos de meados do século XX	41
3.1.1. Fotografia e microscopia ótica	41
3.1.2. Microscopia eletrônica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS)	47
3.1.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR).....	62
3.1.4. Micro-difração de raios-X (μ -DRX)	67
3.1.5. Espectroscopia de fluorescência de raios-X (EDXRF).....	71
3.1.6. Pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS)	75
3.2. Caracterização material de negativos contemporâneos	79

3.3.	Caraterização microbiológica de negativos de meados do século XX	82
3.3.1.	Identificação dos isolados bacterianos	82
3.3.1.1.	Cultura dos isolados bacterianos na presença de película fotográfica contemporânea	83
3.3.2.	Avaliação do potencial biodeteriogénico de fungos filamentosos	86
4.	Comentários finais e perspectivas futuras	93
5.	Referências bibliográficas	99
6.	Anexos.....	107

1. Introdução	
Fig. 1.1. Imagem de um pombal obtida por Niépce em 1827	4
Fig. 1.2. Representação esquemática de uma secção transversal de uma película fotográfica.....	8
Fig. 1.3. Representação esquemática da degradação enzimática da celulose	13
2. Metodologia	
Fig. 2.1. a) lupa binocular; b) microscópio ótico de campo escuro; c) microscópio ótico de campo claro.....	31
Fig. 2.2. Microscópio eletrônico de varrimento com detetor de EDS.....	32
Fig. 2.3. Espectrómetro de IV com módulo de refletância total atenuada	32
Fig. 2.4. Espectrofotômetro de absorção molecular no UV/VIS.....	33
Fig. 2.5. Leitor de microplacas.....	33
Fig. 2.6. Espetrofotômetro portátil de fluorescência de raios-X	34
Fig. 2.7. Difrátômetro de raios-X.....	34
Fig. 2.8. Equipamento de cromatografia gasosa acoplado a um espectrómetro de massa	35
3. Resultados e discussão	
Fig. 3.1. Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N1; b) análise pontual por EDS na área não degradada do negativo N1	49
Fig. 3.2. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N1.....	50
Fig. 3.3. a) Imagem de MEV da área apresentada na Fig. 3.4; b), c) e d) análise pontual por EDS das diferentes zonas indicadas em a)	51
Fig. 3.4. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N2.....	52

Fig. 3.5. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N2; b) análise pontual por EDS da zona indicada em a)	53
Fig. 3.6. Mapas de EDS de uma área não degradada da amostra N3.....	54
Fig. 3.7. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N3; b) e c) análises pontuais por EDS das zonas indicadas em a)	54
Fig. 3.8. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N4.....	55
Fig. 3.9. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N4; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a).....	56
Fig. 3.10. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N5.....	56
Fig. 3.11. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N5; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a).....	57
Fig. 3.12. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N6.....	58
Fig. 3.13. a) Imagem de MEV da área degradada da amostra N6 apresentada na Fig. 3.14; b) ampliação (300x) de uma zona indicada de a); c) análise pontual por EDS da zona indicada em a)	59
Fig. 3.14. Imagens de microscopia ótica de campo escuro das secções transversais das amostras N1 e N4 (ampliação 200x)	60
Fig. 3.15. Mapas de EDS da secção transversal da amostra N1 onde se pode ver a distribuição dos elementos nas diferentes camadas.....	60
Fig. 3.16. Mapas de EDS da secção transversal da amostra N4 onde se pode ver a distribuição dos elementos nas diferentes camadas.....	61
Fig. 3.17. a) e b) Imagens de MEV das amostras N1 e N4 respetivamente indicando a espessura das camadas identificadas	62
Fig. 3.18. Espectros de FT-IR em modo ATR das amostras N1, N2 e N3	63
Fig. 3.18 continuação. Espectros de FT-IR em modo ATR das amostras N4, N5 e N6	64

Fig. 3.19. Difratomogramas das amostras N1, N2 e N3.....	69
Fig. 3.19 continuação. Difratomogramas das amostras N4, N5 e N6.....	70
Fig. 3.20. Espectros de fluorescência das amostras N1, N2, N3, N4, N5 e N6	73
Fig. 3.21. Cromatogramas das amostras N1, N4, N5 e N6	76
Fig. 3.22. a) Imagem de MEV da s superfície da película do rolo fotográfico; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a).....	80
Fig. 3.23. a) Imagem de MEV da s superfície da película cedida pelo Dr. Luís Pavão; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a)	81
Fig. 3.24. Espectros de FT-IR em modo ATR da película do rolo fotográfico e da película cedida pelo Dr. Luís Pavão	81
Fig. 3.25. Difratomogramas da película do rolo fofográfico, a preto e branco, da Kodak...82	
Fig. 3.26. Perfil de crescimento dos isolados bacterianos N1-A a N3-B durante 10h em meio de cultura líquido <i>Nutrient Broth</i> enriquecido com glucose	84
Fig. 3.27. Espectros de FT-IR em modo ATR das películas fotográficas retiradas das culturas de N3-B.....	85
Fig. 3.28. a) Espectros de FT-IR em modo ATR das películas contemporâneas utilizadas no ensaio antes deste iniciar, da gelatina e do acetato celulose; b) e c) espectros das películas retiradas do meio 1 e 2, respetivamente	90
Figura 3.29. Atividade celulolítica de culturas em meio Mandels com diferentes quantidades de carboximetilcelulose; a) <i>Trichoderma harzianum</i> ; b) <i>Aspergillus niger</i> ; c) <i>Penicillium brevicompactum</i> . Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0.05)	92

3. Resultados e discussão

Tabela 3.1. Imagens fotográficas dos negativos N1, N2, N3 e N4 sob diferentes iluminações.....	42
Tabela 3.1 continuação. Imagens fotográficas dos negativos N5 e N6 sob diferentes iluminações.....	43
Tabela 3.2. Imagens obtidas com lupa binocular evidenciando áreas degradadas de algumas das amostras. A ampliação utilizada encontra-se indicada na parte superior das imagens.....	45
Tabela 3.3. Imagens de microscopia ótica obtidas com microscópio de campo escuro de áreas degradadas e não degradadas	46
Tabela 3.4. Imagens de MEV de áreas não degradadas das amostras N1, N2, N3, N4, N5 e N6.....	47
Tabela 3.5. Imagens de MEV de áreas degradadas das amostras N1, N2, N3, N4, N5 e N6	48
Tabela 3.6. Contagens obtidas pela deconvulsão do espectro da área degradada e não degradada, divididas pelas contagens da região de interesse do respectivo pico de Compton e multiplicadas por 10000.....	74
Tabela 3.7. Tempos de retenção (Rt) dos fragmentos obtidos por Py-GC/MS das amostras N1, N4, N5 e N6.....	77
Tabela 3.8. Imagens de MEV da superfície das películas fotográficas contemporâneas	80
Tabela 3.9. Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação dos isolados bacterianos	85
Tabela 3.10. Imagens da superfície das películas fotográficas contemporâneas obtidas com lupa binocular	87

Tabela 3.11. Imagens de MEV da superfície das películas fotográficas; a) película retirada do meio 1; b) película retirada do meio 2; 1) e 2) as setas assinalam a presença de hifas e de esporos fúngicos, respetivamente88

- A – absorvância
- AC – acetato de celulose
- AN – abertura numérica
- ATR-FT-IR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada
- BSA – albumina sérica bovina
- CAB – acetato butirato de celulose
- CAP – acetato propionato de celulose
- CBH – celobiohidrolases
- CBR – rosa de Bengala cloranfenicol
- D – área degradada
- DNS – ácido dinitrossalicílico
- DRX – difração de raios-X
- EC – *Enzyme Comission*
- EnG – endoglucanases
- ES – elétrons secundários
- ER – elétrons retrodifundidos
- ExG – exoglucanases
- F – frente
- FPA- *filter paper activity*
- FRX – espectroscopia de fluorescência de raios-X
- GH - glucanohidrolase
- HR – humidade relativa
- IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*
- IV – espectroscopia de infravermelho
- MEA – malte extrato agar
- MEV-EDS – microscopia eletrónica de varrimento com espectroscopia de raios-x por dispersão em energias acoplada
- NA – nutriente agar
- ND – área não degradada
- Py-GC/MS - pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
- Rt – tempo de retenção
- T – transmitância

TAC – triacetato de celulose

TFF – trifenilfosfato

THM - hidrólise e metilação assistida termicamente

TMAH - hidróxido de tetrametilamónio

TSA - agar triptona de soja

UV – ultravioleta

V - verso

UV/VIS – ultravioleta/visível

β G - β -glucosidades

Resumo

As películas fotográficas em acetato de celulose são propensas a degradação química, o chamado *síndrome do vinagre* e a degradação microbiológica por fungos e bactérias. Neste trabalho foram estudados seis negativos fotográficos de uma coleção particular. Na caracterização material dos negativos foram utilizadas técnicas de análise não destrutiva, como a fotografia, a microscopia ótica, a microscopia eletrônica de varrimento, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada, a espectroscopia de fluorescência de raios-X e a micro-difração de raios-X. Foi ainda utilizada a pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. A colonização biológica das amostras históricas foi avaliada através do isolamento de microrganismos. Foi ainda avaliada a capacidade dos isolados bacterianos de crescerem na presença de películas fotográficas e determinada a atividade celulolítica de duas estirpes fúngicas de modo a avaliar a sua influência na biodeterioração.

Chemical, microbiological and morphological analysis of 20th century photographic negatives

Abstract

Cellulose acetate photographic negatives are prone to chemical degradation called *vinegar syndrome* and microbiological degradation by fungi and bacteria.

In this work six photographic negatives from a private collection were studied. A non-destructive characterization methodology which included photography under transmitted, raking and ultraviolet illuminations, observations in dark field and stereo microscopes, morphological and chemical evaluation by variable pressure scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, micro X-ray diffraction and energy dispersive X-ray fluorescence techniques were used in conjunction with microbiological studies. Sampling was required for pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. The biological colonization of historical samples was determined by isolation of microorganisms. Was also evaluated the ability of bacterial isolates to grow in the presence of photographic films and the enzymatic activity of cellulase of two different species of fungi was analysed to assess their influence on biodeterioration.

A deterioração de películas fotográficas pode ter origem química e biológica. O *síndrome do vinagre* é uma forma lenta de degradação química que afeta apenas materiais plásticos de acetato de celulose. Uma das mudanças físicas que ocorrem em estádios avançados de deterioração é a fragilização do suporte de plástico, no qual um material anteriormente flexível e forte se torna fraco e quebradiço. A deterioração microbiológica é um problema comum em coleções de fotografia e pode ser causada pela ação de bactérias e/ou fungos.

A conservação de coleções de fotografias, que podem também ser consideradas obras de arte, é muito importante pois estas coleções englobam uma diversidade de técnicas e contam a própria história de uma nação. São consideradas herança patrimonial regional e nacional que caracterizam determinadas épocas e costumes.

O conhecimento de materiais usados na produção e das causas da deterioração, recorrendo a técnicas de caraterização maioritariamente não invasivas e a estudos microbiológicos, é fundamental para o desenhar de condições de guarda e acondicionamento adequadas, e verificar a forma como estas se refletem no seu atual estado de conservação permitindo assim, após a conclusão do diagnóstico, escolher que procedimentos poderão ser adotados para a sua conservação ou restauro.

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral compreender os processos de produção e as causas subjacentes à deterioração de negativos históricos em acetato de celulose.

Objetivos específicos

- Conhecer e compreender a constituição de um negativo de acetato de celulose
- Utilizar técnicas não destrutivas na caracterização de negativos
- Avaliar o grau de degradação química e microbiológica dos negativos
- Isolar microrganismos que contaminam os negativos
- Avaliar a influência dos isolados bacterianos e de fungos filamentosos na degradação de negativos

Introdução

1.1. HISTÓRIA DA FOTOGRAFIA

Historicamente, sabe-se que ainda antes de existir a escrita, o homem primitivo já comunicava por meio de desenhos, pois a imagem precede a palavra escrita na ordem evolutiva da linguagem. Mesmo durante a evolução da escrita, tanto o desenho como a pintura e outros meios de comunicação visuais continuaram a ser importantes no processo cultural e civilizacional (Harrell, 2003). O surgimento da literatura e das artes representativas não parou a procura de um processo mais realista de registrar o mundo. De facto, as imagens comunicam em níveis diferentes dos da palavra, seja ela escrita ou falada. Mas é também verdade que tanto a pintura como o desenho ou a gravura não conseguiram satisfazer o desejo de retratar o mundo com o maior realismo possível (Harrell, 2003). A fotografia representa o detalhe, a minúcia, a perspectiva, a luz, o momento fugaz, a espontaneidade, e a velocidade que muitos procuravam, mas não conseguiam por outros meios (Harrell, 2003).

Enquanto técnica, a fotografia baseia-se em dois processos distintos: um físico e um químico. O processo físico envolve as leis da ótica (as objetivas e a caixa escura que permitem a formação e captura da imagem). O processo químico é o que permite o registo latente da imagem num suporte sensibilizado com cristais de prata que, depois de revelado e fixado, produz uma imagem permanente (Pavão, 2001).

No início do século XIX, a burguesia culta de Inglaterra e França interessou-se pelas aplicações práticas das novas descobertas científicas. Nesta altura eram muitos os investigadores que estudavam o processo para obter a fotografia. Um dos mais bem-sucedidos foi o litógrafo e inventor francês Nicéphore Niépce que em 1816 já tinha conseguido realizar uma imagem em câmara escura utilizando papel sensibilizado com cloreto de prata. Mas os tons ficavam invertidos e as suas buscas para sensibilizar provas positivas só resultaram em 1826 quando Niépce usou uma substância à base de verniz de asfalto (betume da judeia) que aplicada sobre vidro, endurecia e, associada a uma mistura de óleos, fixava a imagem. Em 1827 Niépce expôs uma placa de estanho coberta com betume da judeia na câmara escura e obteve, depois de uma exposição de oito horas, uma imagem de um pombal (Fig. 1.1.), que era a vista da janela da sua sala de trabalho (Carvalho, 2006).



Figura 1.1. Imagem de um pombal obtida por Niépce em 1827 (Carvalho, 2006).

Mas o sistema heliográfico ainda não era o adequado para a fotografia pois não reduzia a duração da exposição necessária à obtenção de imagens. Em 1827 Niépce associa-se a Louis Daguerre e os dois prosseguiram as suas investigações em comum (Carvalho, 2006). Depois da morte de Niépce em 1833, Daguerre continuou as suas experiências em Paris, com chapas revestidas a prata e sensibilizadas com iodeto de prata. Em 1835 descobriu que o vapor de mercúrio revelava as imagens, o que permitia reduzir radicalmente a duração da exposição. Mas faltava saber como parar a ação da luz sobre a prata, o que provocava o escurecimento da imagem até ao seu desaparecimento. Em 1837 Daguerre descobriu um processo para interromper a ação da luz, que incluía um banho de cloreto de sódio. Data desse ano aquela que é considerada a primeira fotografia, o daguerreótipo. Este é uma imagem fotográfica, que tem por base uma chapa de cobre coberta com uma camada de prata polida. As zonas claras são formadas por uma amálgama de mercúrio e prata e as zonas escuras são apenas a prata polida refletindo uma superfície negra (Carvalho, 2006; Pavão, 2001).

Quando foi anunciada a invenção do daguerreótipo apareceram outros a reclamar igualmente para si este feito. Um deles foi o inglês William Fox Talbot, que em 1835 tinha conseguido obter o que pode ser considerado o primeiro negativo da história da fotografia, denominado calótipo. O processo resumia-se a preparar uma folha de papel com sais de prata, tornando-a sensível à luz. Quando exposta ao sol, o cloreto de prata escurecia e ao fim de alguns minutos formava-se uma imagem de fundo avermelhado, com a silhueta dos objetos recortada. A imagem continuaria a escurecer se

os sais sensíveis à luz não fossem removidos e, para o fazer, Talbot usou uma solução concentrada de cloreto de sódio. Talbot designou estas provas como “desenhos fotogénicos” (Carvalho, 2006; Pavão, 2001).

O suporte ideal para negativos deve ser transparente, plano, de superfície polida, estável e barato. No ano de 1850 o material que mais se aproximava destas características era o vidro. Contudo o vidro não era capaz de segurar os sais de prata, sendo necessário algo mais que funcionasse como ligante entre o vidro e os sais de prata (Pavão, 2001). Os primeiros negativos em vidro usavam clara de ovo como ligante. Em 1851 surge outro processo de fazer negativos em vidro, apresentado pelo escultor inglês Frederick Scott Archer que usou como ligante uma substância designada por colódio. O colódio é um líquido viscoso, que depois de seco forma sobre o vidro uma película transparente e impermeável (Carvalho, 2006; Pavão, 2001).

Em 1871, Richard Leach Maddox, médico e microscopista inglês, fixa o brometo de prata em uma suspensão gelatinosa, criando assim o processo de chapas secas. Maddox espalhou sobre o vidro uma solução de gelatina contendo sais de prata, em que eram predominantes os sais de brometo de prata, formando-se uma fina película que se denominava por emulsão. Depois de seca, a emulsão permanecia firmemente agarrada ao vidro e mantinha-se inalterada durante bastante tempo. Esta invenção foi de grande importância para a fotografia e foi nos anos seguintes aperfeiçoada por John Burgess, Richard Kennett e por Charles Harper Bennet que conseguiram fabricar placas secas mais leves e de utilização mais cómoda que começaram a ser fabricadas na Europa e nos Estados Unidos a partir de 1878 (Carvalho, 2006; Kodak, 2014; Pavão, 2001).

Em 1883 o vidro, frágil e de manuseamento difícil, foi substituído por película flexível. George Eastman produziu e comercializou um rolo fotográfico em que a emulsão de gelatina com brometo de prata assentava sobre uma tira de papel. Em 1889 é lançada no mercado a primeira película com suporte de plástico, o nitrato de celulose. O suporte de nitrato de celulose é instável e muito inflamável constituindo um risco para os locais onde se acumula como, por exemplo, arquivos de fotografia e armazéns de bobines de cinema. Em 1924 foi lançada a película em diacetato de celulose, designada por *safety* por não arder tão facilmente como o suporte de nitrato de celulose. Em 1949 surgiu a película em triacetato de celulose, mais robusta, que substituiu o nitrato de celulose em todas as suas aplicações. Na década de 1950 surge finalmente o poliéster, o

suporte plástico de melhor qualidade e maior estabilidade. Foi introduzido na indústria fotográfica em 1955 (Pavão, 2001).

Desde a invenção do daguerreótipo que os fotógrafos e cientistas procuravam fazer fotografia a cores. Já em 1840 existia a preocupação de melhorar a sensibilidade à cor dos filmes a preto e branco. Em 1873 Hermann W. Vogel, fotoquímico alemão, descobriu o processo de tornar o brometo de prata sensível às radiações verdes e amarelas e em 1884, também às radiações laranja e vermelhas. Este processo, denominado sensibilização óptica, deu origem em 1873 às primeiras placas ortocromáticas (sensíveis a todas as radiações, excepto ao vermelho e hipersensíveis à radiação azul). Ficaram assim lançadas as bases para a realização da fotografia a cores (Carvalho, 2006).

O primeiro material a cores foi inventado em França pelos irmãos Lumière, a placa de cores *autochrome*. Uma placa *autochrome* consiste numa chapa de vidro coberta por minúsculos grãos transparentes de amido de batata com as três cores primárias, e para preencher os interstícios que pudessem deixar passar a luz, a chapa era coberta com uma camada muito fina de pó negro. Sobre esta matriz, era colocada uma camada de emulsão pancromática de brometo de prata. O resultado era um positivo transparente que teve sucesso imediato devido à melhor sensibilidade à cor e à sua relativa facilidade de revelação (Carvalho, 2006). Em 1935 surgiu no mercado o primeiro processo cromogéneo, lançado pela Kodak com o nome comercial de *Kodachrome*. Num processo cromogéneo, as cores são geradas durante o processamento. As cores não estão na emulsão no momento da exposição, sendo fabricadas quimicamente nos banhos de processamento. As películas cromogéneas usam os sais de prata para registarem a luz, mas não usam a prata na imagem final. A prata é removida no processamento, ficando apenas os corantes (Pavão, 2001). Em 1946, a Kodak desenvolveu um novo processo cromogéneo, de corantes integrados na emulsão.

1.2. NEGATIVOS EM ACETATO DE CELULOSE

1.2.1. O ACETATO DE CELULOSE

O acetato de celulose foi desenvolvido no início do século XX como uma alternativa segura ao nitrato de celulose, muito inflamável. É predominantemente utilizado na

indústria têxtil e alimentar, em membranas de diálise, filtros de cigarro e película fotográfica (Schilling *et al*, 2010; Lucena *et al*, 2003).

O acetato de celulose insere-se na categoria dos polímeros semissintéticos porque tem origem numa fonte natural, a celulose. A celulose é uma substância vegetal, branca, insolúvel em água, constituída por fibras mais ou menos longas conforme o tipo vegetal de origem e com grande resistência mecânica. As fibras de celulose têm uma estrutura complexa, cuja unidade básica é um açúcar, a glucose. (Pavão, 2001; Schilling *et al*, 2010). A glucose é formada por carbono, hidrogénio e oxigénio, agrupados numa molécula com a forma de um anel. Os anéis associam-se, formando uma cadeia grande, que pode ter de comprimento 3000 a 5000 anéis de glucose. A ligação entre os anéis é relativamente forte, o que faz com que uma cadeia de moléculas de glucose tenha uma certa solidez. As fibras de celulose resultam do agrupamento destas longas cadeias, em conjuntos cada vez mais complexos: primeiro, sob a forma de lamelas em que as cadeias se dispõem lado a lado; depois numa estrutura designada por fibrilas, constituída pelo empilhamento de lamelas; do agrupamento de muitas fibrilas resultam os feixes; finalmente da reunião de feixes resultam as fibras de celulose (Pavão, 2001).

Os plásticos formam-se quando são acrescentados grupos laterais à cadeia de celulose, ou seja, se a celulose for tratada com ácido nítrico e sulfúrico forma-se o nitrato de celulose e se for tratada com ácido acético, obtém-se o acetato de celulose. Para formar o plástico, a celulose é tratada quimicamente e ainda no estado líquido, é distribuída sobre uma superfície plana, onde seca, formando-se a película transparente e plana que conhecemos (Pavão, 2001).

1.2.2. CONSTITUIÇÃO DE UM NEGATIVO

Um negativo é constituído por várias camadas (Fig. 1.2.), cada uma com funções distintas. De cima para baixo, a primeira é uma camada de proteção que permite prevenir a deterioração mecânica da imagem (Langford, 1996).

A emulsão é a camada seguinte, constituída pela substância formadora da imagem, a prata, que se encontra dispersa num meio transparente, a gelatina, que funciona como ligante. São em prata as imagens da grande maioria das provas e negativos a preto e branco (Langford, 1996; Pavão, 2001).

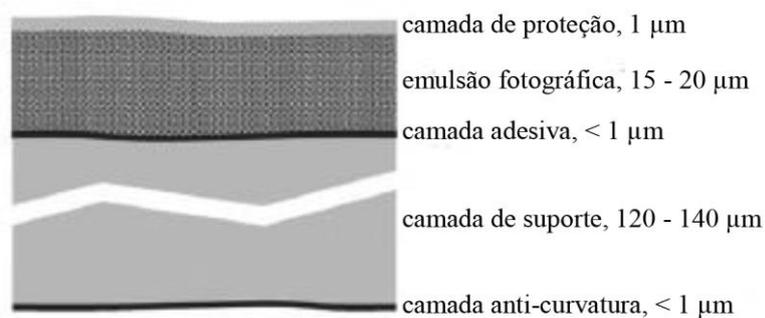


Figura 1.2. Representação esquemática de uma secção transversal de uma película fotográfica (Gaspard et al, 2007).

A camada adesiva é a camada que une as diferentes camadas ao suporte. É constituída por uma mistura de gelatina e ésteres de celulose, como o nitrato de celulose (Valverde, 2005).

O suporte é a camada que tem como objetivo servir de estrutura para a imagem, dando consistência ao objeto fotográfico. Os suportes compostos por ésteres de celulose são fabricados usando geralmente, o método de evaporação de solvente, ou seja, consiste na dissolução do polímero, sob a forma de pastilhas ou flocos, após o processo de esterificação inicial, num solvente adequado ou geralmente, num conjunto de solventes (Horvath, 1987). Durante a década de 1950 o solvente utilizado era o diclorometano (Valverde, 2005). Um suporte de película fotográfica deve ser estável, suportar variações de temperatura e humidade, não deformar, ou seja, não curvar, ondular ou distorcer, não deve absorver água, deve ser quimicamente estável e não ser combustível. Ao suporte de acetato de celulose é adicionado um plastificante, como o trifenilfosfato (TFF), que tem como função proporcionar uma maior flexibilidade e resistência ao material (Pavão, 2001; Wypych, 2004). O plastificante sozinho ou combinado com compostos clorados, como o cloreto de etileno, funciona como retardador de chama, ou seja, evita a combustão e retarda a propagação de incêndios depois da ignição (Veen & Boer, 2012; Patente US1994597). A mistura resultante é moldada por espalhamento sobre um tambor ou uma correia aquecida a uma velocidade lenta o suficiente para que ocorra a evaporação do solvente e o suporte atinja uma determinada resistência. O suporte é então passado através de uma série de câmaras aquecidas para remover os solventes residuais. Nesta fase são aplicados os revestimentos especiais e as camadas adesivas. A evaporação do solvente prossegue até que o suporte é enrolado no seu formato final (Horvath, 1987).

A última camada é uma camada anti-curvatura que permite contrariar as tensões físicas que se desenvolvem, proporcionando estabilidade à película. Esta é uma camada de gelatina que contém corantes anti-halo incorporados que impedem que parte da luz que atravessa a película seja refletida na base do suporte, expondo os sais de prata à luz. Estes corantes, originalmente de cor azul ou rosa, aquando do processamento da película, são reduzidos tornando-se incolores (forma leuco) e solúveis, mas ao sofrerem oxidação retornam à sua cor original (Epp, D., 1995; Valverde, 2005).

A película pode também ter outros revestimentos que impedem que do contacto entre superfícies possa resultar a produção de eletricidade estática (Horvath, 1987).

1.3. DETERIORAÇÃO DE NEGATIVOS COM SUPORTE DE ACETATO DE CELULOSE

Designa-se por deterioração as transformações físicas e químicas que ocorrem nas espécies fotográficas após o processamento (Pavão, 2001). A deterioração pode ser causada por manuseamento incorreto. Exemplo disso é a visualização de impressões digitais e manchas de sujidade ou gordura. Pode ainda ser devida às condições ambientais, como variações de temperatura e humidade, que causam o desvanecimento da imagem, amolecimento da gelatina e deformações físicas, como ondulação e curvatura. A deterioração das espécies fotográficas pode ainda ter origem biológica, devido à ação de insetos e roedores ou de fungos e bactérias.

1.3.1. DETERIORAÇÃO QUÍMICA

A investigação sobre o acetato de celulose continua em curso devido à sua prevalência em coleções de artefactos e obras de arte desde o início do século XX (Littlejohn *et al*, 2013). Objetos feitos total ou parcialmente de acetato de celulose são uma parte importante do património cultural, particularmente em coleções de museus. Devido à potencial instabilidade e rápida deterioração desses objetos, um consórcio de instituições e laboratórios obteve financiamento da Comissão Europeia para um projeto de conservação intitulado “Preservação de artefactos de plástico em coleções de museus” (POPART). Este projeto procurou desenvolver uma estratégia para melhorar a

preservação de objetos de plástico, que inclui o acetato de celulose, identificando os riscos associados à exposição, limpeza, proteção e armazenamento dos artefactos e estabelecendo boas práticas (Schilling *et al*, 2010).

Os objetos em acetato de celulose e, nomeadamente, as películas são propensas à degradação. O processo de degradação avança continuamente, de forma lenta ou mais acelerada, dependendo da temperatura e da humidade relativa (HR) das condições de armazenamento (Poole, 1999). O *síndrome do vinagre* é uma forma lenta de degradação química que afeta apenas materiais plásticos de acetato de celulose. Uma das mudanças físicas que ocorrem em estádios avançados de deterioração é a fragilização do suporte de plástico, no qual um material anteriormente flexível e forte se torna fraco e quebradiço. No acetato de celulose os grupos laterais da cadeia principal de celulose são grupos acetato. Se na cadeia principal de celulose dois ou três átomos de hidrogénio forem substituídos por dois ou três grupos acetato forma-se o diacetato de celulose ou o triacetato de celulose, respetivamente (Schilling *et al*, 2010). Enquanto estes grupos se mantêm ligados à cadeia de celulose, o negativo mantém-se estável, mas quando ocorre quebra da ligação entre a cadeia principal e os grupos laterais começa a ocorrer libertação de ácido acético. A deterioração das películas de acetato de celulose é considerada uma reação autocatalítica pois o ácido acético, produto desta reação, vai funcionar como catalisador, ou seja, a partir de determinada concentração de ácido acético em contacto com a película, quanto maior a quantidade de ácido acético presente no meio, maior a velocidade da reação deterioração. A libertação de ácido ocorre dentro do suporte de plástico, difundindo-se gradualmente para a emulsão de gelatina, produzindo um odor forte a vinagre (Poole, 1999; Reilly, 1993).

O processo de degradação do suporte leva ao aparecimento de depósitos cristalinos ou bolhas na emulsão que resultam da migração do plastificante até à superfície, a qual depende da volatilidade do composto e do tamanho e forma da molécula de plastificante (Reilly, 1993). A perda de plastificante pode ser promovida por factores ambientais que dão origem a alterações estruturais no polímero. (Richardson *et al*, 2013).

Outra consequência do *síndrome do vinagre* é o aparecimento de coloração rosa ou azul devida à presença de corantes incorporados na camada anticurvatura e anti-halo. Antes de se iniciar o processo de degradação estes corantes encontram-se na sua forma reduzida, mas ao entrarem em contacto com o ácido acético formado neste processo, o meio ácido faz com que os corantes sejam oxidados e voltem à sua cor original, azul ou

rosa. As colorações rosas são encontradas em algumas películas Kodak, enquanto as azuis estão presentes em películas Agfa e Ansco (Reilly, 1993; Epp, D., 1995).

1.3.2. BIODETERIORAÇÃO

Os fenómenos de biodeterioração representam um conjunto de processos físicos e químicos naturais de deterioração em materiais diversos, como os que compõem os objetos considerados património cultural, e são causados pelo crescimento de organismos muito diferentes. Estes são chamados genericamente de biodeteriogénicos, mas todos eles são caracterizados pela capacidade saprotrófica de usar substratos para sustentar o seu crescimento e a sua reprodução (Pinzari *et al*, 2006).

A deterioração microbiológica é um problema comum em coleções de fotografia e é considerada uma causa importante de deterioração. O conhecimento da contaminação microbiológica nos arquivos fotográficos tem, por isso, grande interesse (Borrego *et al*, 2010; Lourenço & Sampaio, 2009).

Os microrganismos podem crescer em vários materiais, comprometendo a estrutura e a função dos substratos de diferentes formas. Os fungos causam alterações cromáticas como manchas de diferentes cores, tonalidades e texturas devido ao crescimento micelial e à produção de pigmentos. As bactérias desempenham um papel mais limitado na biodeterioração pois necessitam de condições de humidade mais elevadas, o que faz dos fungos, provavelmente, os principais contaminantes microbianos dos materiais fotográficos (Borrego *et al*, 2010; Lourenço & Sampaio, 2009).

O material fotográfico mais susceptível à ação dos microrganismos é a gelatina porque é uma substância orgânica e higroscópica. A contaminação bacteriana da gelatina pode ocorrer durante a sua fase de produção. Na indústria fotográfica tem sido observada contaminação da gelatina por bactérias do género *Bacillus* e *Pseudomonas*. Estas bactérias podem levar à liquefação da gelatina, através da sua hidrólise por ação de gelatinases (Abrusci *et al*, 2004; Kanemitsu *et al*, 2001). Poeiras e gordura das impressões digitais podem promover também o desenvolvimento microbiano, os quais perturbam a visualização das imagens fotográficas tanto pelo seu crescimento como pela produção de metabolitos. De facto, os microrganismos podem danificar a superfície do material pela produção de enzimas e ácidos orgânicos.

Lourenço e Sampaio (2009) estudaram a deterioração fúngica de fotografias de emulsão de gelatina, a cores e a preto e branco, induzindo a sua contaminação artificialmente. Estes autores verificaram que os materiais de cor são mais afectados por fungos do que os materiais a preto e branco. Concluíram ainda que o crescimento fúngico foi afectado em certa medida, pela reduzida quantidade de partículas de prata presentes nas imagens a preto e branco, e que as partículas de tinta presentes nas imagens a cores não têm efeito significativo sobre os fungos. Abrusci e colaboradores têm efectuado diversos estudos no âmbito da biodegradação de películas. Em 2004 estudaram a capacidade que as bactérias têm de degradar a gelatina avaliando a sua atividade através de métodos viscosimétricos. Estes autores concluíram que a viscosidade das soluções de gelatina inoculadas com bactérias e a sua evolução ao longo do tempo pode ser utilizada como um método quantitativo para avaliar a atividade da gelatinase e a biodegradação do material. Em 2009 estudaram a deterioração de películas de triacetato de celulose pela ação da bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, medindo a quantidade de dióxido de carbono produzido por esta bactéria. Esta bactéria não é capaz de hidrolisar a gelatina, mas consegue degradar o suporte de triacetato de celulose, funcionando a camada de gelatina como proteção do suporte.

1.3.2.1. DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA CELULOSE

Os microrganismos são capazes de degradar a celulose produzindo diversas enzimas com diferentes especificidades, que trabalham em conjunto.

As celulasas, também designadas por hidrolases, são enzimas que constituem um complexo celulolítico capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo a sua hidrólise. Estes enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a libertação de açúcares (Castro & Jr., 2010; Pérez *et al*, 2002).

Os enzimas do complexo celulolítico clivam ligações *O*-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (Castro & Jr., 2010).

A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, divide-se em três grandes grupos: as endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; as exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e as β -glicosidasases (β G), que hidrolisam oligossacáridos solúveis em glucose (Castro & Jr., 2010). A endoglucanase, que está classificada com o EC

3.2.1.4, possui como nome sistemático, segundo a IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 4- β -D-glucana-4-glucanohidrolase. É o enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Este enzima hidrolisa internamente o polímero da celulose, expondo as extremidades redutoras e não redutoras (Castro & Jr., 2010, Gottschalk *et al*, 2010).

A exoglucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91), atua sobre as extremidades redutoras e não-redutoras das cadeias de polissacáridos de celulose, libertando glucose ou celobiose como produtos principais (Gottschalk *et al*, 2010; Lynd *et al*, 2002). O grupo das exoglucanases é constituído pela celobiohidrolase (CBH) e pela glucanohidrolase (GH). A GH (EC 3.2.1.74) cujo nome sistemático é 4- β -D-glucana glucohidrolase é capaz de libertar glucose diretamente do polímero, hidrolisando a fibra celulósica (Castro & Jr., 2010). A CBH (EC 3.2.1.91), cujo nome sistemático é 4- β -D-glucana celobiohidrolase, participa na hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogénese que promove o aumento da hidrólise da celulose por tornar amorfas as regiões cristalinas, deixando a celulose mais exposta às celulases. 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).

O processo de hidrólise da celulose é finalizado através da ação da β -glucosidase (EC 3.2.1.21), que tem a propriedade de hidrolisar a celobiose e oligossacáridos solúveis em glucose (Castro & Jr., 2010; Gottschalk *et al*, 2010).

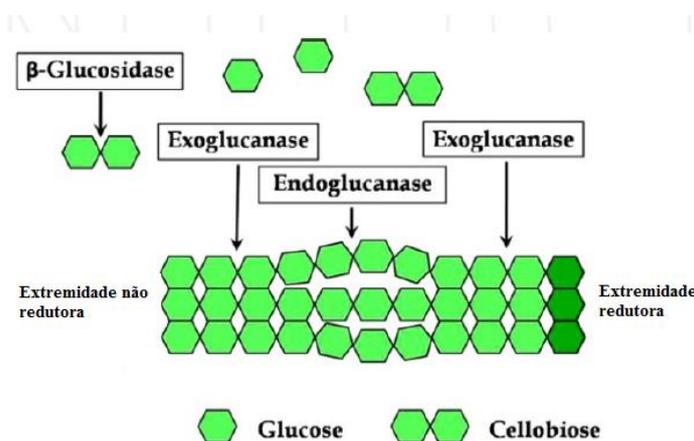


Figura 1.3. Representação esquemática da degradação enzimática da celulose (Matovic, 2013)

Os produtos da hidrólise da celulose estão disponíveis como fonte de carbono e energia para os microrganismos celulolíticos ou outros microrganismos que vivem no ambiente onde a celulose está a ser degradada. Na verdade, essa libertação de açúcares a partir da celulose é a principal base das interações microbianas que ocorrem em tais ambientes (Pérez *et al*, 2002).

1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS USADAS NA CARATERIZAÇÃO MATERIAL

Em conservação e, nomeadamente, em conservação de fotografias é importante conhecer as características dos materiais usados nos processos de produção e os produtos e processos de degradação para encontrar o melhor método de armazenamento ou exibição dos materiais e escolher o tratamento mais adequado quando é necessária intervenção (Christensen, 2007). As técnicas analíticas usadas na caracterização dos materiais desempenham assim um papel fundamental (Littlejohn *et al*, 2013).

1.4.1. FOTOGRAFIA

A documentação fotográfica no caso particular de negativos fotográficos é feita para análise da imagem capturada e diagnóstico do estado de conservação das peças e pode ser realizada sob diferentes tipos de iluminação, como luz refletida, luz transmitida, luz rasante e luz UV. A informação obtida permite avaliar com maior detalhe a superfície do objeto em estudo e verificar a existência de alterações topográficas e morfológicas.

1.4.2. MICROSCOPIA ÓTICA

A microscopia ótica é utilizada para ampliar objetos de pequenas dimensões e pode fornecer informação sobre a sua estrutura e morfologia, por vezes não detetáveis a olho nu, de um modo muito rápido. Este tipo de microscopia envolve a interação da radiação com a amostra, sendo possível trabalhar até ampliações de 2000 vezes (Bittencourt, 2008).

Em microscopia ótica existe uma diversidade de técnicas que podem ser utilizadas. As amostras podem ser examinadas por microscopia de campo claro onde a luz atravessa ou é refletida pela amostra; por microscopia de campo escuro, técnica de contraste em que apenas a luz difractada da amostra é utilizada para formar a imagem; por microscopia de contraste de fase, em que pequenas alterações no comprimento do trajeto óptico podem ser observadas como diferenças no contraste da imagem; por microscopia de fluorescência que utiliza uma radiação de comprimento de onda curto para excitar as moléculas fluorescentes presentes na amostra fazendo com que estas emitam radiação de um comprimento de onda maior; por estereomicroscopia onde é possível obter uma imagem tridimensional da amostra, entre outras (Araújo, 2007; Nikon, 2014; Stuart, 2007).

O microscópio é constituído basicamente por uma parte mecânica que serve de suporte, e uma parte ótica, constituída pela objetiva e 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 igual ao produto da ampliação da objectiva pela da ocular. Nos microscópios, destacam-se outras duas características principais: o poder de resolução e a abertura numérica. O poder de resolução é definido como a capacidade que o microscópio tem de distinguir dois pontos próximos. A resolução é melhor quando a distância que separa os dois pontos é pequena. 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 imagens fornecidas pelo sistema ótico, sejam nítidas. A resolução é função do comprimento de onda da luz utilizada e de uma característica das objetivas, conhecida como abertura numérica. A abertura numérica (AN) é definida pela quantidade de luz recebida de um objeto (Araújo, 2007; Bittencourt, 2008; Madigan *et al.*, 2010).

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

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica muito útil para a identificação de vários tipos de materiais fotográficos (Christensen, 2007). O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma das suas propriedades físico-químicas mais

características e, por isso, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação de compostos. Baseia-se nas vibrações dos átomos de uma molécula. A condição para que ocorra absorção de radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência do seu movimento vibracional. As vibrações podem envolver uma mudança no comprimento da ligação (estiramento) ou no ângulo da ligação (flexão) (Stuart, 2007). O espectrómetro registra o resultado na forma de uma banda de absorção. Um espectrómetro de grande sensibilidade é o espectrómetro com transformada de Fourier (FT-IR), que utiliza um interferómetro de Michelson. Este divide o feixe de radiação proveniente da fonte de infravermelho, refletido simultaneamente a partir de um espelho em movimento e de um espelho fixo. Os feixes refletidos voltam a combinar-se e passam através da amostra para o detetor e são reproduzidos na forma de um gráfico de tempo em função da intensidade do sinal denominado de interferograma.

A espectroscopia de infravermelho com refletância total atenuada (ATR) baseia-se no facto de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre reflexão. A fração do feixe de luz 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 fração da radiação que atinge a amostra é designada por onda evanescente. A profundidade de penetração desta onda depende do comprimento de onda, do índice de refração do cristal de ATR e do ângulo do feixe de luz (Bruker, 2011; Pineda *et al.*, 2008; Stuart, 2007).

1.4.4. ESPETROSCOPIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV/VIS)

A radiação ultravioleta (UV) e visível (VIS) é uma pequena parte do espectro eletromagnético. Espectrofotometria na região UV/VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, pois tem um custo relativamente baixo e um grande número de aplicações. A técnica baseia-se na propriedade que muitas espécies poliatômicas têm de absorver determinados comprimentos de onda da radiação UV/VIS. No processo de absorção, a energia dos fótons é transferida para as moléculas

provocando transições electrónicas, com transições vibracionais e rotacionais associadas. Uma vez que os níveis energéticos das moléculas são quantizados, apenas os comprimentos de onda cujos fotões têm energia idêntica à de uma transição permitida são absorvidos (Rocha & Teixeira, 2004; Leal, 2007).

Quando a radiação é absorvida por uma amostra, a irradiância do feixe de luz é reduzida. A irradiância é a energia por segundo, por unidade de área do feixe de luz. A radiação é tornada monocromática por ação de um monocromador. A radiação monocromática, com irradiância P_0 , passa através da amostra, sendo b o percurso ótico percorrido pela radiação. A radiação que não foi absorvida emerge da amostra com irradiância P . A transmitância, T , é definida como a fracção de radiação que atravessa a amostra:

$$T = P/P_0$$

A lei de Lambert-Beer estabelece a relação entre a absorvância (A), que corresponde ao inverso do logaritmo decimal da transmitância (T), e a concentração da espécie absorvente:

$$\log P_0/P = \log (1/T) = A = \epsilon.b.c$$

onde ϵ é a absorvidade molar do analito, b é a distância percorrida pelo feixe através da amostra e c a concentração da espécie absorvente (Rocha & Teixeira, 2004; Harris, 2007; Leal, 2007).

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

Em microscopia eletrónica de varrimento (MEV), a imagem de um objeto é criada através da utilização de um feixe de eletrões em vez de radiação como ocorre em microscopia ótica. Um microscópio eletrónico de varrimento permite ampliar objetos na ordem das 100 000 vezes e permite examinar áreas muito pequenas. A microscopia eletrónica de varrimento também pode ser combinada com a técnica de espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS), a fim de realizar a análise elementar das amostras (Stuart, 2007).

O princípio de funcionamento baseia-se na incidência de um feixe de eletrões finamente focado para explorar a superfície da amostra, seguindo-se a recolha dos sinais

eletrônicos emitidos pelo material-alvo. A maioria dos equipamentos utiliza como fonte um filamento de tungstênio que pode operar numa faixa de tensão de aceleração entre 1 e 50 kV. Da interação do feixe eletrônico com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e elétrons, entre os quais elétrons secundários (ES), elétrons retro-difundidos (ER) e raios-X característicos. Designam-se por elétrons secundários os elétrons de baixa energia (< 50 eV) emitidos da superfície da amostra. Estes elétrons têm origem nos processos de interação não elástica dos elétrons primários e retro-difundidos com os elétrons de menor energia de ligação. A emissão de ES varia de forma não regular com o número atômico do material mas apresenta grande sensibilidade às propriedades físicas e químicas e à contaminação da superfície. Destas características resulta que a imagem obtida por detecção de ES tem um forte contraste topográfico. A designação de ER identifica os elétrons emergentes da superfície da amostra com energia elevada próxima dos elétrons primários. A emissão de ER resulta de interações elásticas dos elétrons primários. A imagem gerada por ER fornece diferentes informações em relação ao contraste que apresenta, além de uma imagem topográfica (contraste em função do relevo) também se obtém uma imagem da composição da amostra (contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra). As áreas da amostra com número atômico maior correspondem na imagem às áreas claras e mais brilhantes e as de menor número atômico correspondem às áreas escuras e menos brilhantes. Os elétrons retro-difundidos e secundários são a base da MEV (Dedavid *et al.*, 2007; Sá, 2002; Stuart, 2007).

As amostras para poderem ser caracterizadas por microscopia eletrônica têm de apresentar boa condutividade elétrica superficial. A não existência de condutividade leva à necessidade de metalização, através da aplicação de um revestimento ultrafino, de ouro ou carbono. Devem ainda suportar o vácuo, e ser estáveis física e quimicamente, nas condições de observação/interação com o feixe eletromagnético (Sá, 2001). No entanto, para se evitar o revestimento das amostras e para a análise de amostras sensíveis que podem não ser estáveis no vácuo, o equipamento pode ser utilizado em modo de pressão variável (0,75-150 kPa) permitindo a obtenção de imagens de amostras não condutoras (Stuat, 2007).

A análise simultânea dos sinais recolhidos pelos detetores permite caracterizar cada ponto da amostra em termos de topografia (ES e ER), número atômico (ER), propriedades cristalinas (ER), composição química elementar (ER) e campos magnéticos (ER) (Sá, 2002).

Ao microscópio eletrônico de varrimento pode ser acoplado o sistema de EDS, o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semi-quantitativa das amostras, a partir da emissão de raios X característicos. A análise por EDS consiste na medição dos raios-X característicos emitidos de uma região microscópica da amostra bombardeada por um feixe de elétrons. Estes raios-X característicos são específicos do número atômico da amostra e, o seu comprimento de onda ou a sua energia podem ser utilizados para identificar o elemento. A conjugação das técnicas MEV/EDS permite obter imagens tridimensionais da amostra, e mapas de composição dos elementos da superfície da amostra (Dedavid et al., 2007; Sá, 2002).

1.4.6. ESPETROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X (FRX)

A espectroscopia de fluorescência de raios-X (FRX) é uma das técnicas chave no estudo dos materiais de interesse cultural porque é não-destrutiva. Trata-se de uma técnica de análise elementar qualitativa e quantitativa, que permite a identificação dos materiais componentes de um objeto, como também o estudo da sua proveniência e tecnologias de fabrico. Permite a análise de objetos únicos e de grande relevância artística e adequa-se à instrumentação portátil, o que possibilita o seu emprego *in-situ* e no interior de museus e laboratórios de restauro para a análise de obras de difícil locomoção, por serem frágeis ou de grandes dimensões (Ferretti, 2008).

O princípio físico da técnica baseia-se na utilização de radiação eletromagnética (raios-X) para induzir transições electrónicas nos níveis internos dos átomos constituintes da amostra. Essas transições podem resultar na emissão de radiação X de energia característica que permitem a identificação da espécie atômica envolvida na transição e a quantificação da sua abundância. Mais especificamente, neste processo a energia da radiação fluorescente permite identificar o elemento, enquanto a sua intensidade permite que seja medida a sua concentração na amostra analisada recorrendo a calibração (Ferretti, 2008).

1.4.7. MICRO-DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (μ -DRX)

A Difração de raios-X (DRX) tem sido amplamente utilizada na análise de objetos artísticos e históricos contendo materiais cristalinos. Esta técnica permite determinar o arranjo cristalino dos átomos nos sólidos. Isto é possível porque na maior parte dos sólidos (cristais), os átomos ordenam-se em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda dos raios-X. Ao fazer incidir um feixe de radiação X num cristal, este interage com os átomos presentes, ocorrendo o fenómeno de difração. A difração de raios-X ocorre segundo a Lei de Bragg, a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina):

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

em que n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação X incidente, d é a distância interplanar e θ corresponde ao ângulo de difração (Albers *et al.*, 2002; Na *et al.*, 2004; Stuart, 2007).

1.4.8. PIRÓLISE SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPETROMETRIA DE MASSA (PY-GC/MS)

A pirólise tem sido amplamente utilizada ao longo dos últimos 20-30 anos como uma técnica analítica na qual as macromoléculas são decompostas, na ausência de oxigénio, em espécies voláteis, mais pequenas, utilizando apenas energia térmica. O objectivo final da pirólise analítica é usar a informação cromatográfica dos produtos de pirólise para determinar a composição ou a estrutura da amostra original por isso, a pirólise, combinada com métodos analíticos modernos, tais como cromatografia gasosa (GC) e espectrometria de massa (Py-GC/MS) tornou-se uma ferramenta rápida, conveniente e poderosa para a caracterização de polímeros a partir de amostras heterogéneas complexas, não-voláteis. Os fragmentos observados são uma impressão digital de uma determinada amostra, tanto em termos da natureza do fragmento como da sua distribuição relativa (Keheyán, 2008; Sobeith *et al.*, 2008).

O pirolisador é ligado a uma coluna analítica do GC, através da porta de injeção. Um fluxo de gás inerte, azoto ou hélio, liberta os produtos da pirólise para a coluna, onde os componentes são separados. O método de detecção utilizado é tipicamente a

espectrometria de massa, mas outros detectores de GC também têm sido empregues de acordo com as intenções da análise (Chiavari & Prati, 2003).

O comportamento em fase gasosa dos fragmentos obtidos da decomposição térmica depende da sua volatilidade e polaridade. Para obter o melhor comportamento cromatográfico, foram introduzidas técnicas de derivatização. A reação de derivatização é conseguida em conjunto com a pirólise por adição de um reagente à amostra sólida (Chiavari & Prati, 2003). O procedimento introduzido por Challinor, designado por hidrólise e metilação assistida termicamente (THM), consiste na pirólise combinada com o reagente de metilação, TMAH (hidróxido de tetrametilamónio), que se mostrou vantajoso para a análise de alguns compostos orgânicos (Chiavari & Prati, 2003).

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

DURAÇÃO

Ano letivo de 2013/2014

AMOSTRAS EM ESTUDO

- Seis negativos, a preto e branco, do século XX, pertencentes a uma coleção privada (designados por N1 a N6)
- Quatro negativos contemporâneos, a preto e branco, cedidos pelo Dr. Luís Pavão
- Rolo fotográfico, a preto e branco, Tri X 400 da Kodak, adquirido na loja Colorfoto, em Lisboa

MODELO BIOLÓGICO

- Estirpes bacterianas isoladas das amostras históricas
- Estirpes fúngicas de uma coleção de culturas (*Aspergillus niger* e *Penicillium brevicompactum* FC13B)
- Estirpe fúngica com atividade celulolítica conhecida (*Trichoderma harzianum* CCM1 783)

TÉCNICAS UTILIZADAS

Para a caracterização dos negativos foram utilizadas técnicas de análise não destrutiva, como a fotografia, a microscopia ótica, a microscopia eletrónica de varrimento, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada, a espectroscopia de fluorescência de raios-X e a micro-difração de raios-X. Foi utilizada também uma técnica de análise destrutiva, a pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS). Na determinação da curva de crescimento dos isolados bacterianos na presença de película fotográfica e

na avaliação da atividade celulolítica foi utilizada a espectroscopia de absorção molecular no UV/VIS.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

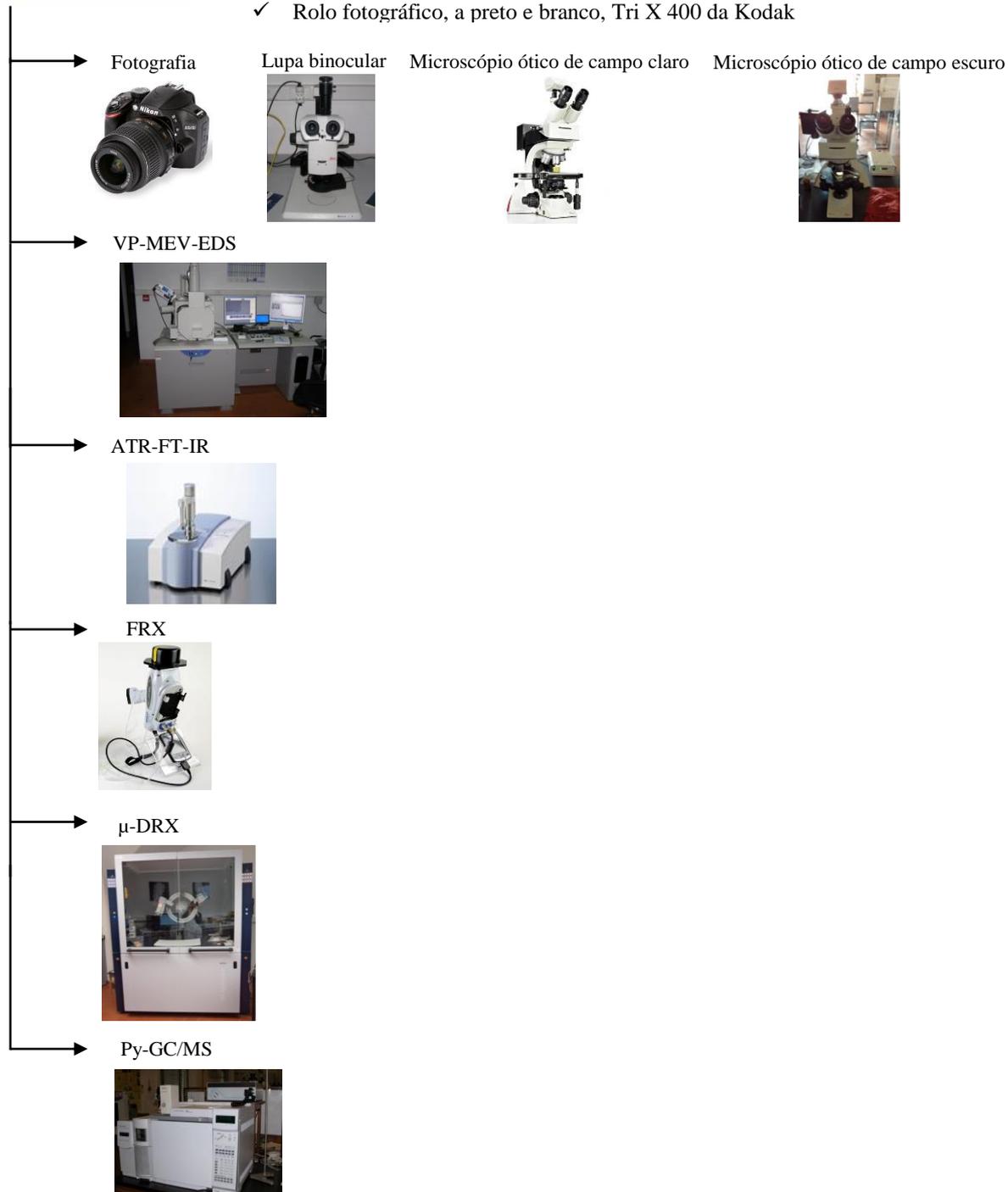
Na validação estatística dos resultados da atividade enzimática utilizou-se o programa SPSS para Windows, versão 19, Copyright©, Microsoft Corporation. Foram estudadas as diferenças encontradas nos níveis de atividade do enzima, para todos os tempos das culturas e para os três meios, recorrendo ao teste 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

Caracterização Material



- ✓ 6 negativos, a preto e branco, do século XX, pertencentes a uma coleção privada
- ✓ 4 negativos contemporâneos, a preto e branco, cedidos pelo Dr. Luís Pavão
- ✓ Rolo fotográfico, a preto e branco, Tri X 400 da Kodak



Isolamento microbiano

Amostras exibindo degradação



Amostra N1

Amostra N2

Amostra não exibindo degradação



Amostra N3

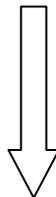
Placas com MEA, NA e CRB



Isolamento bacteriano (não houve crescimento fúngico)



Cultura dos isolados bacterianos na presença de matriz (película fotográfica)



Agitação orbital:
30 °C, 150 rpm



Leitura da absorvância a 600 nm

Recolha de alíquotas durante as primeiras 10 h e depois às 24 h, 48 h, 72 h e 240 h

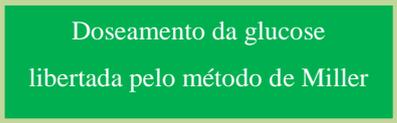
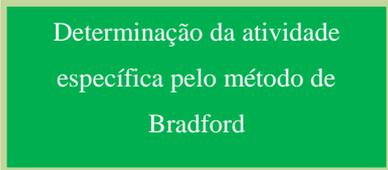
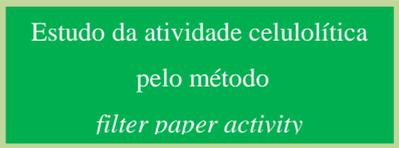
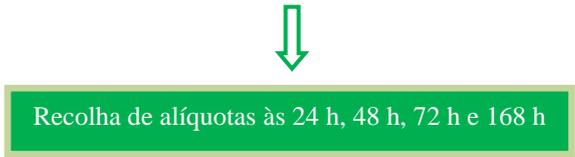
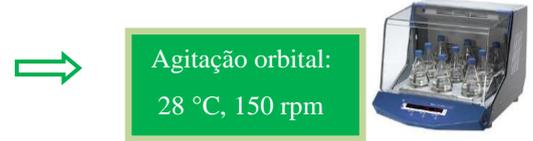
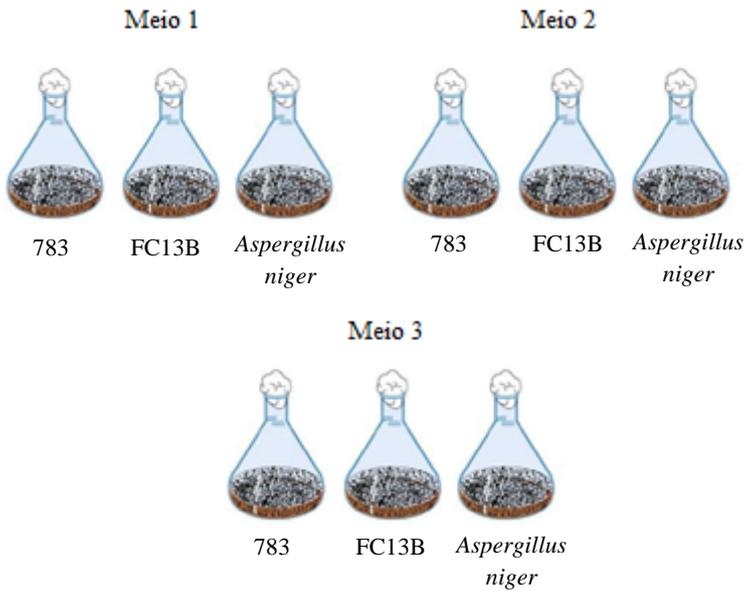
Recolha da película fotográfica

Caracterização da película por ATR-FT-IR e VP-MEV-EDS

Avaliação do potencial biodeteriorante de fungos filamentosos

Meio 1 ≠ Meio 2 ≠ Meio 3

Nos Meios 1 e 2 colocou-se, em cada balão de Erlenmeyer, película fotográfica contemporânea



2.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1. SELEÇÃO DE AMOSTRAS

2.3.1.1. Amostras históricas

A coleção de negativos em estudo é uma coleção privada pertencente a Ramiro Martins de Almeida, fotógrafo em Alcácer do Sal, e data da década de cinquenta do século XX. Estes negativos retratam pessoas da região.

Desta coleção foram selecionados seis negativos para estudo, dos quais três foram escolhidos para amostragem microbiológica. Destes, dois evidenciavam sinais de degradação e um aparentava estar em bom estado.

2.3.1.2. Amostras contemporâneas

Foram selecionadas amostras contemporâneas para serem utilizadas no estudo microbiológico. Destas amostras quatro foram cedidas pelo Dr. Luís Pavão, fundador e gerente da LUPA (Luís Pavão Limitada), empresa especializada em conservação e digitalização de coleções de fotografia. As restantes amostras provêm de um rolo fotográfico de acetato de celulose, a preto e branco, Tri X 400 da Kodak, adquirido na loja Colorfoto.

2.3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISE USADAS NA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E MORFOLÓGICA DAS AMOSTRAS

2.3.2.1. Fotografia

Imagens fotográficas para avaliação das peças e dos aspectos morfológicos foram obtidas sob luz rasante e radiação UV, usando uma câmara Nikon D3200 com uma lente micro-Nikkor 40 milímetros f / 2.8DX fixa num suporte. Foi também usada uma caixa de luz para obtenção de imagens sob luz transmitida. Foi ainda possível obter imagens em modo de transmissão usando lâmpadas UV.

2.3.2.2. Microscopia ótica

Para a análise de alterações morfológicas utilizou-se também uma lupa binocular (microscópio estereoscópico) de marca Leica e modelo M205C (Fig. 2.1a) e um

microscópio ótico de campo escuro de marca Leica e modelo DM 2500M (Fig. 2.1b). Foi também utilizado um microscópio ótico de campo claro de marca Leica e modelo DM 2500P (Fig. 2.1c) para visualização e identificação das espécies bacterianas isoladas. Aos três microscópios foi acoplada uma câmara digital Leica DFC 290 HD.

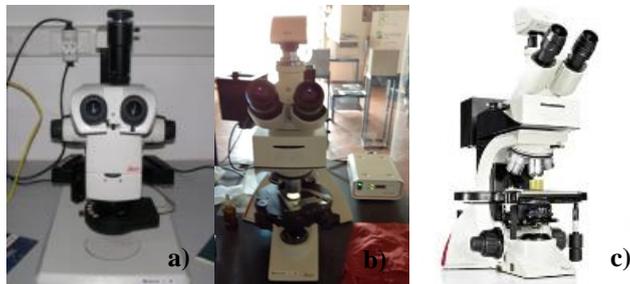


Figura 2.1. a) lupa binocular; b) microscópio ótico de campo escuro; c) microscópio ótico de campo claro.

2.3.2.3. Microscopia electrónica de varrimento e Espetroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS)

O microscópio electrónico de varrimento é um equipamento que pode fornecer rapidamente informação sobre a morfologia e identificação da composição de uma amostra sólida. Uma das vantagens da sua utilização é a alta resolução da análise (Dedavid *et al.*, 2007).

As análises por microscopia electrónica de varrimento (MEV) e microanálise por raios-X (EDS) foram realizadas usando um microscópio electrónico de varrimento HITACHI S-3700N com um espectrómetro de raios-X por dispersão em energia Brüker Xflash 5010 acoplado (Fig. 2.2). As análises foram realizadas no modo de pressão variável, com uma pressão de 30 Pa na câmara, evitando revestir as amostras com material condutor como o Au ou a grafite. A microanálise é *standerless* (sem padrões) quantitativa: os padrões utilizados são padrões internos contidos numa base de dados acoplada ao software do equipamento. As imagens foram obtidas em modo de eletrões retrodifundidos e foram realizadas com aceleração de 10 kV ou 15 kV enquanto nas análises de EDS foi usada uma aceleração de 20 kV.



Figura 2.2. Microscópio eletrônico de varrimento com detetor de EDS

2.3.2.4. Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma 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 Bruker com um módulo de ATR com cristal de diamante acoplado (Fig. 2.3). 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 2.3. Espectrômetro de IV com módulo de refletância total atenuada

2.3.2.5. Espetroscopia 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. Na avaliação do efeito degradativo dos negativos por células bacterianas foi utilizado um espectrofotômetro de absorção molecular no UV/Vis de marca e modelo Hitachi U-3010 (Fig. 2.4). A absorvância foi lida a 600 nm . No doseamento da quantidade de glucose libertada pela reação com ácido dinitrossalicílico (DNS) a absorvância foi lida a 540 nm .



Figura 2.4. Espectrofotômetro de absorção molecular no UV/VIS

O leitor de microplacas é um espectrofotômetro que opera na região do UV/VIS e permite a medição simultânea de várias amostras. Este equipamento permite a seleção de quaisquer comprimentos de onda entre 200 e 1000 nm e tem capacidade de analisar placas com 96 a 384 poços. Na determinação da concentração de proteína total em solução foi utilizado um leitor de microplacas da marca Thermo Scientific™ (Fig.2.5). A absorvância foi lida a 590 nm.



Figura 2.5. Leitor de microplacas

2.3.2.6. Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (FRX)

A espectroscopia de fluorescência de raios-X (FRX) é uma técnica não-invasiva amplamente utilizada na análise de artefatos. Na análise das amostras foi utilizado um espectrômetro portátil Brüker TRACER III-SD com uma fonte de ródio. Foi utilizado um filtro azul composto por titânio com uma espessura de 25.4 μm , e as condições de aquisição foram: 30 kV e 40 mA e tempo de aquisição de 300 s. O detetor acoplado ao equipamento é um detetor de silício Silicon Drift Detector (SDD) que permite uma resolução de energia de 149.68 eV para a radiação Mn K α a uma taxa de contagens de 100 kcps. Foi posicionado um copo de XRF, contendo água e coberto com uma película Proleene[®], na parte de trás dos negativos a ser analisados, de forma a fornecer uma ligeira pressão que mantém a amostra na sua posição final para ser analisada, diminuindo a distância entre a amostra e o detetor. Os espectros foram obtidos com o

software S1 PXRF (v.3.8.30) e analisados com o software ARTAX (v.5.3.15.1). Cada espectro é o resultado de três análises. Os espectros foram normalizados pelo pico de Compton.



Figura 2.6. Espectrofotômetro portátil de fluorescência de raios-X

2.3.2.7. Micro-difração de Raios-X (μ -DRX)

A difração de raios-X (DRX) desempenha um papel importante na análise de muitos dos materiais cristalinos utilizados na indústria fotográfica.

As análises foram realizadas diretamente sobre as amostras, sem preparação prévia. Foi utilizado um difratômetro Brüker AXS D8 ADVANCE equipado com um conjunto de espelhos Göbel e um detetor LynxEye 1D. Para o estudo foi utilizada a radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda_1=1.54056 \text{ \AA}$ e $\lambda_2=1.54439 \text{ \AA}$). Para a análise de áreas relativamente pequenas foi utilizado um colimador de 0.3 mm de diâmetro. As análises foram realizadas com um varrimento de 5° a $80^\circ 2\theta$, com um passo de $0.05^\circ 2\theta$ e com uma tensão e corrente elétrica de 40 kV e 40 mA, respectivamente.



Figura 2.7. Difratômetro de raios-X

2.3.2.8. Pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS)

A pirólise é frequentemente usada para caracterizar materiais artísticos de natureza orgânica, como os polímeros (Chiavari & Prati, 2003).

A caracterização do suporte foi feita através de pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS), utilizando um pirolisador Frontier Lab multi-shot EGA/Py-3030D, um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 equipado com uma coluna Grace At-5msTM com as seguintes características: 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno, 0.25 µm de espessura de filme, e um espectrômetro de massa Shimadzu GCMS-QP 2010 Plus. Antes da pirólise, cerca de 200-300 µg da amostra foi desarejada durante 2 min com hélio e depois pirolizada durante 12 s a 500 °C. Os produtos da pirólise foram separados na coluna, sendo o hélio (99% de pureza) usado como gás de arraste (fluxo de 1 mL min⁻¹). A identificação foi feita por comparação do espectro de massa EI da amostra obtido experimentalmente e utilizando a base de dados NIST do software AMDIS, no intervalo de razão massa/carga (m/z) 40 e 850.



Figura 2.8. Equipamento de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa.

2.3.3. ESTUDO MICROBIOLÓGICO

2.3.3.1. Isolamento de microrganismos

O estudo microbiológico foi realizado em três negativos históricos, dois apresentando degradação observável a olho nu e um que não evidenciava degradação. Para a recolha das amostras microbiológicas utilizaram-se zaragatoas estéreis que foram passadas na superfície dos negativos. Posteriormente, as zaragatoas foram colocadas em tubos de ensaio estéreis contendo cada tubo 1 mL de MRD (meio de ressuspensão). Os tubos foram submetidos a agitação (50 rpm), durante 48 h a 28 °C. Após incubação,

retirou-se de cada tubo volumes 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-se como procedimento a técnica de espalhamento. No Anexo II 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.

2.3.3.2. Identificação dos isolados bacterianos

Não ocorreu crescimento fúngico pelo que se trabalhou apenas com as estipes bacterianas isoladas. A análise dos isolados bacterianos foi feita por observação microscópica das colónias isoladas. Para a sua caracterização foram feitas preparações a fresco utilizando o método de Gram tendo sido posteriormente observadas ao microscópio ótico Leica DM2500P com as objetivas de 10x, 20x, 40x e 100x.

Os isolados bacterianos foram designados por N1-A, N1-B, N2, N3, N3-A e por N3-B.

2.3.3.3. Cultura dos isolados bacterianos na presença de matriz de película fotográfica

Utilizaram-se os seis isolados bacterianos obtidos como descrito no ponto anterior. Para a avaliação do crescimento destes isolados na presença de película fotográfica (rolo fotográfico, Tri x 400 da Kodak), inocularam-se 10 rampas de cada isolado com meio sólido TSA (agar triptona de soja) que foram incubadas 48 h a 30 °C. O ensaio foi preparado em duplicado pelo que para cada isolado bacteriano foram preparados dez balões de Erlenmeyer contendo 90 mL de meio de cultura líquido *Nutrient Broth* e 10 mL de glucose. Um dos balões de Erlenmeyer foi utilizado como controlo, contendo por isso apenas o isolado bacteriano. Os meios de cultura foram mantidos sob agitação orbital a 30 °C e 150 rpm. Nas primeiras 10 h foram retiradas alíquotas de hora a hora e, posteriormente, foram retiradas alíquotas às 24 h, 48 h, 72 h e 240 h. Leu-se a absorvância a 600 nm.

2.3.3.4. Avaliação do potencial biodeteriorogénico de fungos filamentosos

Utilizaram-se dois fungos (*Aspergillus niger* e *Penicillium brevicompactum* FC13B) de uma coleção de culturas, e uma estirpe com atividade celulolítica conhecida (*Trichoderma harzianum* CCMI 783) para termo de comparação.

Para a produção de celulases inocularam-se nove rampas com meio sólido malte extrato agar (MEA), que foram incubadas durante 5 dias a 28 °C. Prepararam-se três balões de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Mandels sem carboximetilcelulose (Meio 1), três balões de Erlenmeyer contendo meio Mandels com um quarto da quantidade de carboximetilcelulose do meio Mandels normal (Meio 2) e outros três balões de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Mandels com a quantidade normal de carboximetilcelulose (Meio 3). Arrastou-se a biomassa presente em cada rampa para dentro de cada balão. Nos balões de Erlenmeyer contendo o Meio 1 e o Meio 2 colocou-se película fotográfica contemporânea, cedida pelo Dr. Luís Pavão. Os meios de cultura foram mantidos sob agitação orbital a 28 °C e 150 rpm. Ao fim de 24 h, 48 h, 72 h e 168 h foram retiradas alíquotas e submetidas a centrifugação a 10000g durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante das culturas 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) cm² com uma massa de aproximadamente 50 mg. O substrato foi colocado em tubos de ensaio, adicionando-se de seguida 1 mL de tampão citrato a 0.05 mol dm⁻³ (pH 4.8) e 0.5 mL do extrato enzimático (sobrenadante das culturas). 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 o 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, que de seguida foram colocados a 100 °C durante 5 min. Posteriormente, adicionou-se a cada tubo 5 mL de água bidestilada. A absorvância da solução final foi lida a 540 nm contra um branco de água destilada que sofreu o mesmo tratamento. Foi feita uma curva de calibração com soluções padrão de glucose com concentrações entre 50 e 1000 mg L⁻¹. Fizeram-se triplicados das amostras e dos padrões.

A atividade enzimática foi expressa em relação ao conteúdo de proteína total presente no extrato enzimático, o que é designado por atividade específica. Para determinar a atividade específica recorreu-se ao método de Bradford (1976) que é um método colorimétrico 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) 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 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 590 nm, num leitor de microplacas. As amostras e padrões foram preparados em triplicado. A atividade específica foi expressa por número de unidades de enzima por miligrama de proteína (U/mg proteína).

Resultados e discussão

3.1 Caracterização material de negativos antigos

A coleção de negativos em estudo é uma coleção privada constituída por 1500 negativos de suporte em plástico e por 17 negativos em vidro. Os negativos de suporte em plástico encontram-se acondicionados em envelopes de papel com aspecto envelhecido, onde em alguns consta a data. Para este estudo foram selecionados seis negativos em película (N1 a N6) dos quais é conhecida apenas a data das amostras N3 e N4: 1954 e 1956, respetivamente, embora se pense que toda a coleção date de meados do século XX pela datação de outras amostras não selecionadas. A seleção das amostras teve como critério diferentes estados de degradação visíveis a olho nu.

Neste trabalho fez-se a caracterização material de negativos selecionados recorrendo a diferentes técnicas de caracterização: fotografia, microscopia ótica, microscopia electrónica de varrimento associada a espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR), espectroscopia de fluorescência de raios-X (FRX), micro-difração de raios-X (μ -DRX) e pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS). Fez-se também o estudo microbiológico das amostras através do isolamento de microrganismos da sua superfície e, posteriormente, fizeram-se culturas com os isolados na presença de película fotográfica contemporânea bem como a avaliação da atividade celulolítica de três estirpes fúngicas selecionadas de uma coleção de culturas. O estudo foi desenvolvido em áreas degradadas e não degradadas. Definem-se por áreas não degradadas, zonas onde a olho nu não é possível detetar qualquer sinal de degradação, enquanto as áreas degradadas referem-se a zonas do negativo onde a degradação é visível a olho nu, nomeadamente, erupções na superfície da película, aglomerados cristalinos, entre outros.

Foi ainda feita uma avaliação da coleção e do contexto do seu armazenamento através da utilização de AD-Strips (Anexo I).

3.1.1. Fotografia e microscopia ótica

Após inspeção visual dos negativos foram obtidas imagens fotográficas sob diferentes iluminações para observação mais detalhada da morfologia e do estado de degradação. As imagens fotográficas, apresentadas na Tabela 3.1 foram obtidas sob luz

transmitida, que permite visualizar melhor a imagem representada e as alterações causadas pelo processo de degradação. A chamada luz rasante foi também uma ferramenta valiosa na análise de aspectos topográficos e a iluminação UV permitiu distinguir a utilização de um composto fluorescente na produção de todos os negativos.

Os negativos foram fotografados pela frente, onde está presente a camada de emulsão, e pelo verso, onde se encontra a camada anti-curvatura, para comparação.

Tabela 3.1. Imagens fotográficas dos negativos N1, N2, N3 e N4 sob diferentes iluminações.

Legenda: F - Frente; V - Verso

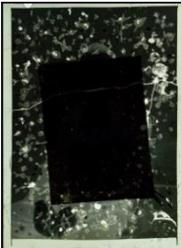
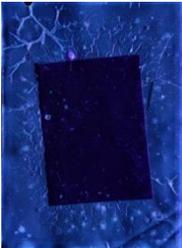
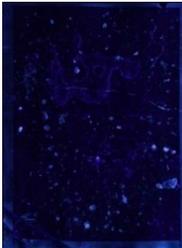
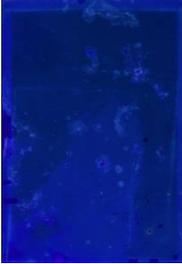
	Luz Transmitida		Luz Rasante		Luz UV	
	F	V	F	V	F	V
N1						
N2						
N3						
N4						

Tabela 3.1 continuação. Imagens fotográficas dos negativos N5 e N6 sob diferentes iluminações.
Legenda: F - Frente; V - Verso

	Luz Transmitida		Luz Rasante		Luz UV	
	F	V	F	V	F	V
N5						
N6						

As amostras N1, N2, N4, N5 e N6 apresentam estados de degradação evidentes, exibindo bolhas e canais, bem como a formação de alguns aglomerados de cristais. Quanto à amostra N3 não apresenta sinais visíveis de degradação. Uma das primeiras indicações de que a película de acetato de celulose está a iniciar um processo de degradação, nomeadamente o chamado *síndrome do vinagre*, é o odor característico a vinagre. O cheiro forte pode ser atribuído à quebra da ligação entre a cadeia principal do polímero e os grupos laterais acetato, começando a ocorrer a libertação de ácido acético. A perda dos grupos acetato contrai a cadeia do polímero e a película começa a deformar. A formação de canais é o resultado do desequilíbrio nas velocidades de deterioração da emulsão e do suporte. No seguimento do encurtamento do suporte, a estrutura da película enfraquece e não consegue reter o plastificante. Se este composto ficar retido entre as camadas de emulsão e anticurvatura, ocorre a formação de bolhas em toda a superfície do negativo mas se o plastificante não permanecer dentro das bolhas e for exposto ao ar cristaliza (Jamison, 2004), formando assim os depósitos cristalinos que se podem observar nas amostras N2, N5 e N6.

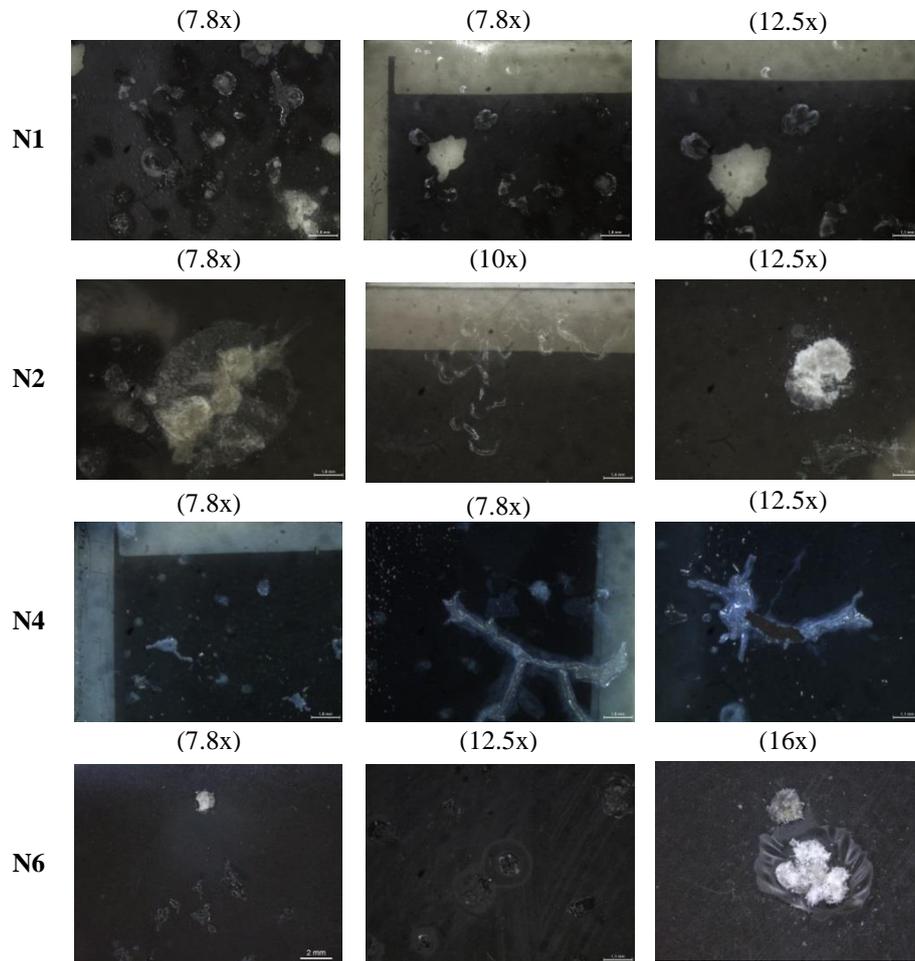
Das seis amostras, a N1 é a que se encontra em pior estado. A amostra N1 é frágil e teve parte de outro negativo colado, como se pode ver nas imagens da Tabela

3.1. Este segundo negativo foi removido e a amostra fragmentou-se devido à enorme fragilidade que apresentava. Em todas as amostras, a utilização de luz transmitida permitiu visualizar a imagem retratada à exceção da amostra N6 que tem um aspeto metalizado, apresentando uma forma de degradação designada por espelho de prata. O espelho de prata tem origem na ação combinada da humidade relativa elevada e de agentes poluentes que atuam sobre a imagem de prata provocando a oxidação da prata constituinte da imagem. Os iões prata migram até à superfície onde são depois reduzidos e depositam-se no meio ligante, tornando-o brilhante e apresentando cor de chumbo (Pavão, 2001). A luz rasante possibilitou visualizar mais pormenorizadamente canais e agregados presentes na superfície das amostras N1, N2, N4, N5 e N6. Na amostra N4 foi observada uma coloração azul devida provavelmente aos corantes anti-halo, que presentes na camada anticurvatura sob a forma leuco, na presença do ácido acético oxidam e retornam à sua cor original. O facto de ser uma coloração azul sugere que este negativo pode tratar-se de uma película da marca Agfa ou Ansco (Valverde, 2005).

Para a análise mais detalhada das alterações morfológicas utilizou-se uma lupa binocular e um microscópio ótico de campo escuro. As imagens obtidas com estes equipamentos (Tabelas 3.2 e 3.3) permitiram ampliar diferentes áreas degradadas dos negativos, detetadas nas imagens fotográficas, possibilitando visualizar com maior detalhe os canais e as bolhas, bem como a presença de cristais.

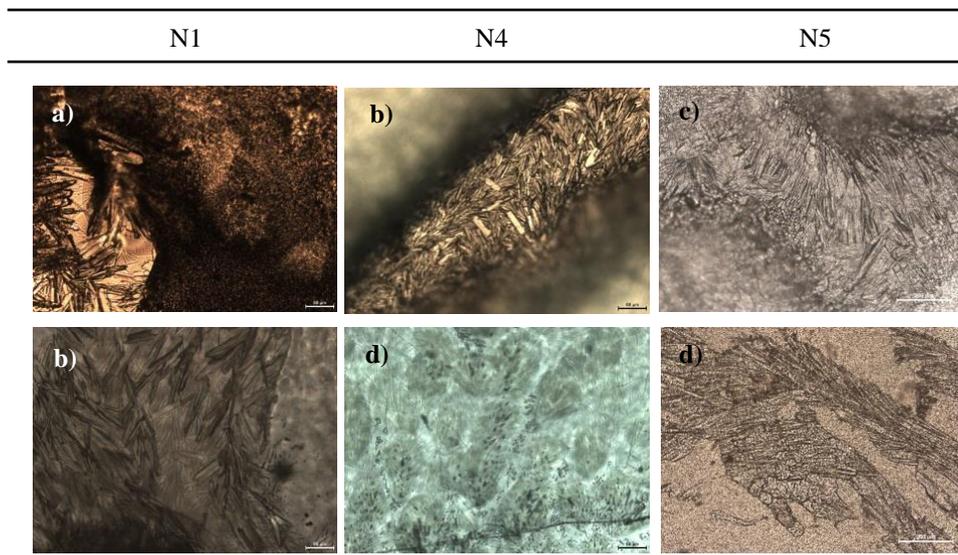
Na Tabela 3.2 apresentam-se imagens de áreas degradadas das amostras N1, N2, N4 e N6 obtidas com lupa binocular. As imagens obtidas para a amostra N1 permitiram ver, com maior detalhe, a formação de bolhas bem como a perda de parte da camada superficial do negativo. Na amostra N2 e N6 verifica-se a presença de aglomerados enquanto que as imagens de lupa binocular de uma área degradada da amostra N4 permitiram distinguir a formação de canais.

Tabela 3.2. Imagens obtidas com lupa binocular evidenciando áreas degradadas de algumas das amostras. A ampliação utilizada encontra-se indicada na parte superior das imagens.



Na Tabela 3.3 apresentam-se imagens de microscopia ótica obtidas com microscópio de campo escuro de áreas degradadas e não degradadas das amostras N1, N4 e N5. As imagens obtidas permitiram ver com maior detalhe a morfologia dos canais e bolhas.

Tabela 3.3. Imagens de microscopia ótica obtidas com microscópio de campo escuro de áreas degradadas e não degradadas. A imagem a) corresponde a uma bolha; as imagens assinaladas com b) correspondem a canais; c) corresponde a um aglomerado de cristais e d) corresponde a imagens da superfície das amostras.



Da observação das imagens fotográficas tiradas sob diferentes iluminações e das imagens obtidas com a lupa binocular e microscópio ótico de campo escuro podemos concluir que, à exceção da amostra N3, todas as amostras já iniciaram um processo de degradação apresentando-se frágeis e com diversas erupções na sua superfície. Observações semelhantes foram feitas por Ciliberto e colaboradores (2013) em películas cinematográficas de acetato de celulose. As amostras estudadas por encontravam-se degradadas e frágeis apresentando na sua superfície inúmeras bolhas, sendo possível também sentir um forte cheiro a vinagre, o que sugere que já se iniciou o processo de degradação.

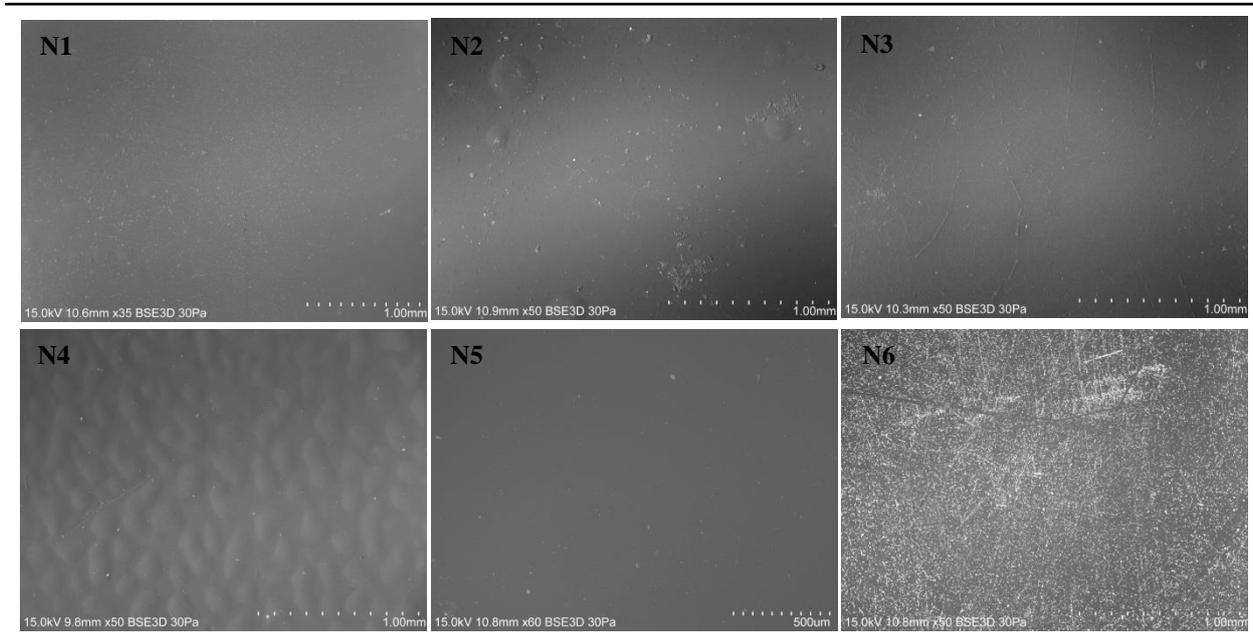
3.1.2. Microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia de raios-X por dispersão em energia

A combinação da microscopia electrónica de varrimento (MEV) com a espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS) tem sido amplamente utilizada na análise de materiais e também para a documentação e interpretação de processos de degradação (Schreiner *et al.*, 2007). A análise das amostras por MEV

permitiu comparar algumas características de áreas degradadas e não degradadas e a análise por EDS possibilitou determinar a composição química elementar dos materiais usados na produção dos negativos bem como a sua distribuição espacial.

Na Tabela 3.4 apresentam-se imagens de MEV de áreas não degradadas das seis amostras selecionadas. Como já foi referido anteriormente definem-se por áreas não degradadas, zonas onde a olho nu não são visíveis sinais de degradação. Ao observarem-se as imagens obtidas por MEV destas áreas verifica-se que as amostras N2, N3, N4 e N6 apresentam sinais de degradação. Na superfície das amostras N2 e N4 é possível observar-se a formação de bolhas. Das seis amostras selecionadas a amostra N3 é a única que, em toda a sua superfície, não apresenta de forma visível sinais de degradação contudo ao observar-se por MEV são visíveis partículas de sujidade, cuja origem é desconhecida, e o que, eventualmente, parece ser a formação de canais. Na superfície da amostra N6 observa-se a presença de inúmeras partículas, provavelmente de prata, que devido ao processo de degradação “espelho de prata” se tornam mais evidentes que nas restantes amostras.

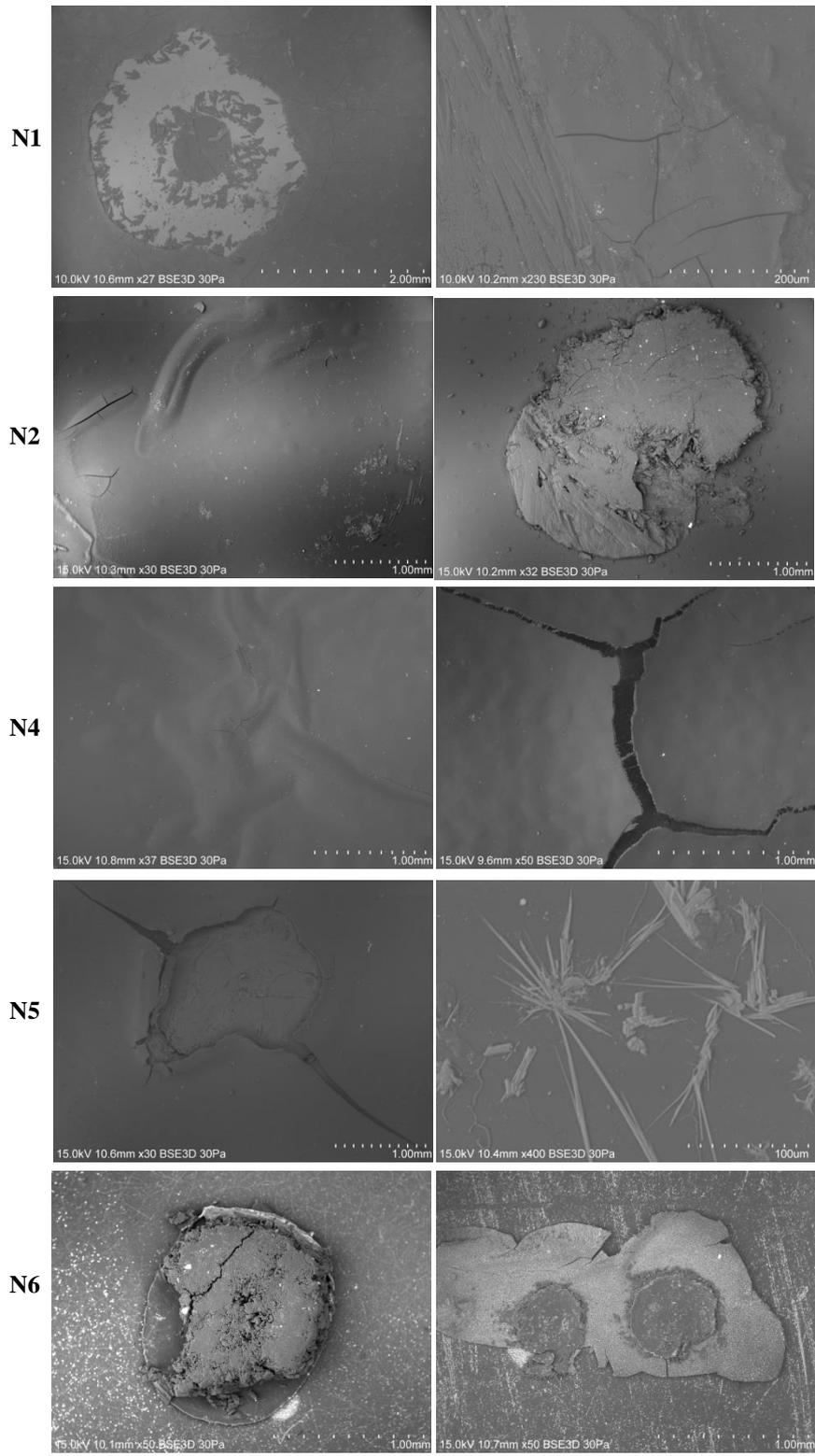
Tabela 3.4. Imagens de MEV de áreas não degradadas das amostras N1, N2, N3, N4, N5 e N6.



Na Tabela 3.5. apresentam-se imagens de MEV de áreas degradadas das amostras N1, N2, N4, N5 e N6 onde é possível ver as diferentes tipologias encontradas. Todas as amostras apresentam fissuras na sua superfície indicando que se encontram

frágeis. É visível também a formação de canais nas amostras N2 e N4 bem como a formação de aglomerados nas amostras N2, N5 e N6.

Tabela 3.5. Imagens de MEV de áreas degradadas das amostras N1, N2, N4, N5 e N6.



Na imagem de MEV da Fig. 3.1-a) apresenta-se uma área não degradada da amostra N1 onde se fez uma análise pontual por EDS (Fig. 3.1-b). Esta análise mostrou a existência essencialmente de fósforo e prata. A prata é utilizada no processo de formação da imagem e o fósforo deve-se provavelmente à utilização de trifenilfosfato (TFF), um plastificante frequentemente adicionado ao suporte de acetato de celulose durante a fase de produção para melhorar a resistência à humidade e diminuir o risco e a velocidade de combustão (Ciliberto *et al.*, 2013; Schilling *et al.*, 2010). Ferro e zinco também foram detetados em pequenas quantidades. A utilização de cloreto de zinco como catalisador no processo de produção do acetato de celulose é referida em patentes anteriores aos anos 50 do século XX (Patente US1908550, 1933). A acetilação da celulose ocorria na presença de catalisadores, sendo que a mistura reacional podia conter acetato de celulose, anidrido acético, ácido acético e cloreto de zinco (Patente US1908550, 1933). O ferro por outro lado pode dever-se a uma contaminação pelo recipiente onde ocorria a acetilação da celulose que numa patente de 1932 refere a utilização de um recipiente constituído por 18% de crómio, 8% de níquel e 74% de ferro (Patente US1840404, 1932).

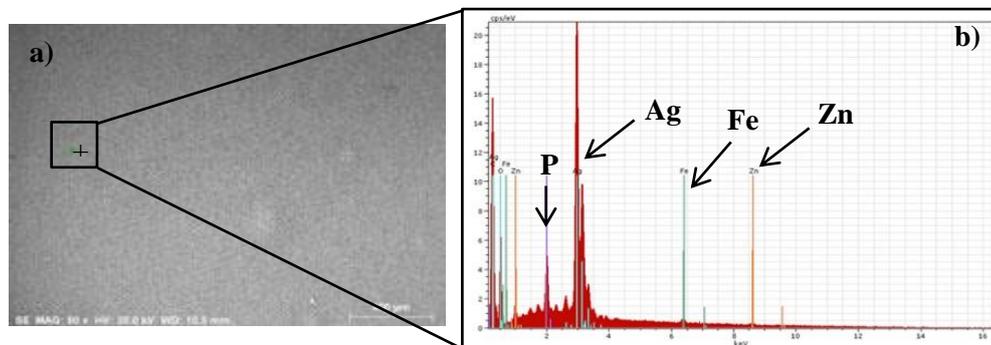


Figura 3.1. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N1; b) análise pontual por EDS na área não degradada do negativo N1.

Na Fig. 3.2 são apresentados os mapas de EDS de uma área degradada da amostra N1, onde é possível constatar a diferente distribuição dos elementos presentes. Na Fig. 3.3 são indicadas análises pontuais realizadas em diferentes zonas da amostra apresentada na imagem da Fig. 3.2. Como referido anteriormente, os negativos têm uma estrutura em camada. Numa área degradada esta estrutura deixa de ser mantida. Materiais de camadas mais interiores passam a estar acessíveis na superfície do

negativo. Esse é, por exemplo, o caso do composto contendo fósforo (o plastificante de trifenilfosfato) que terá migrado até a superfície.

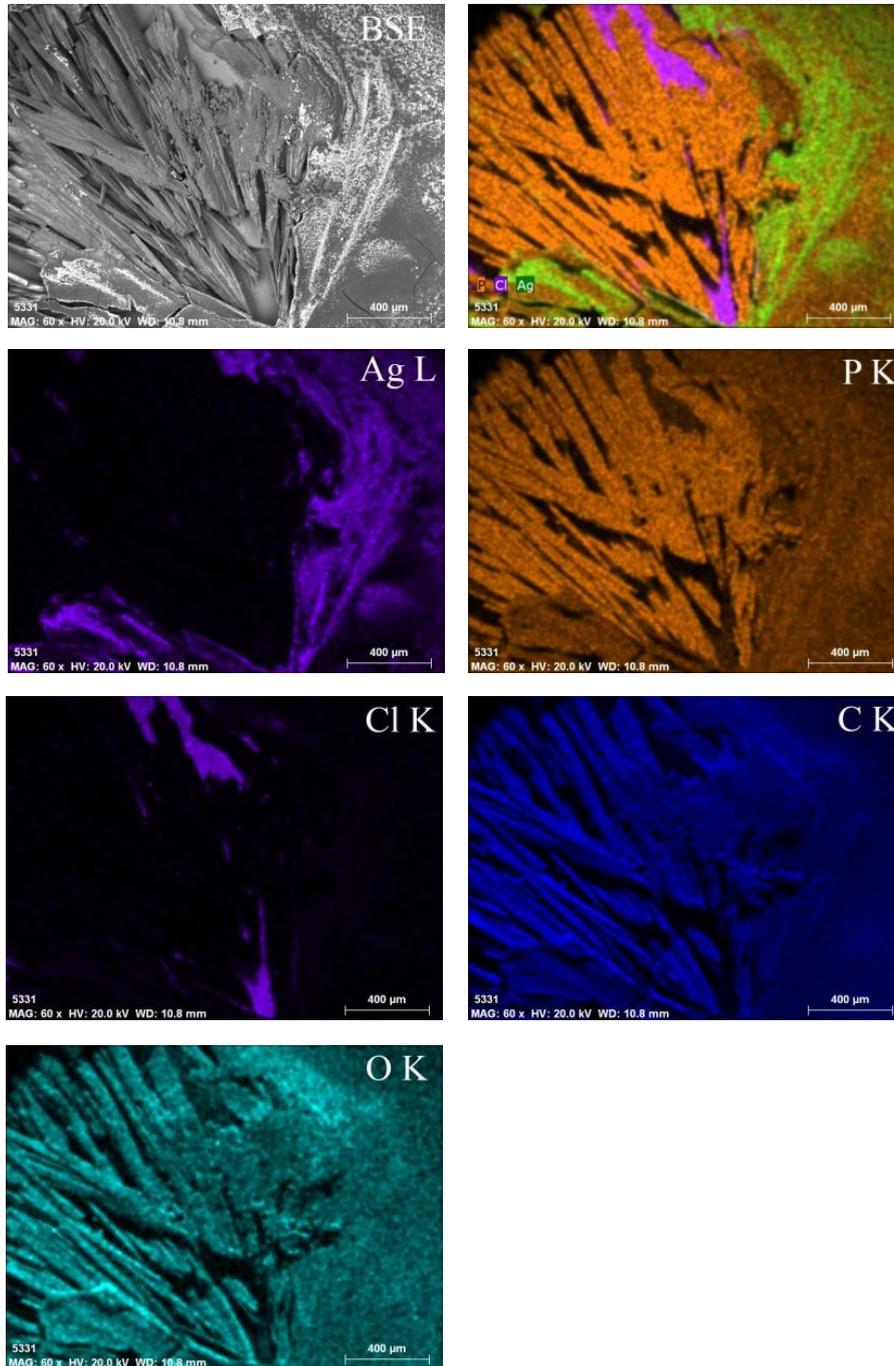


Figura 3.2. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N1.

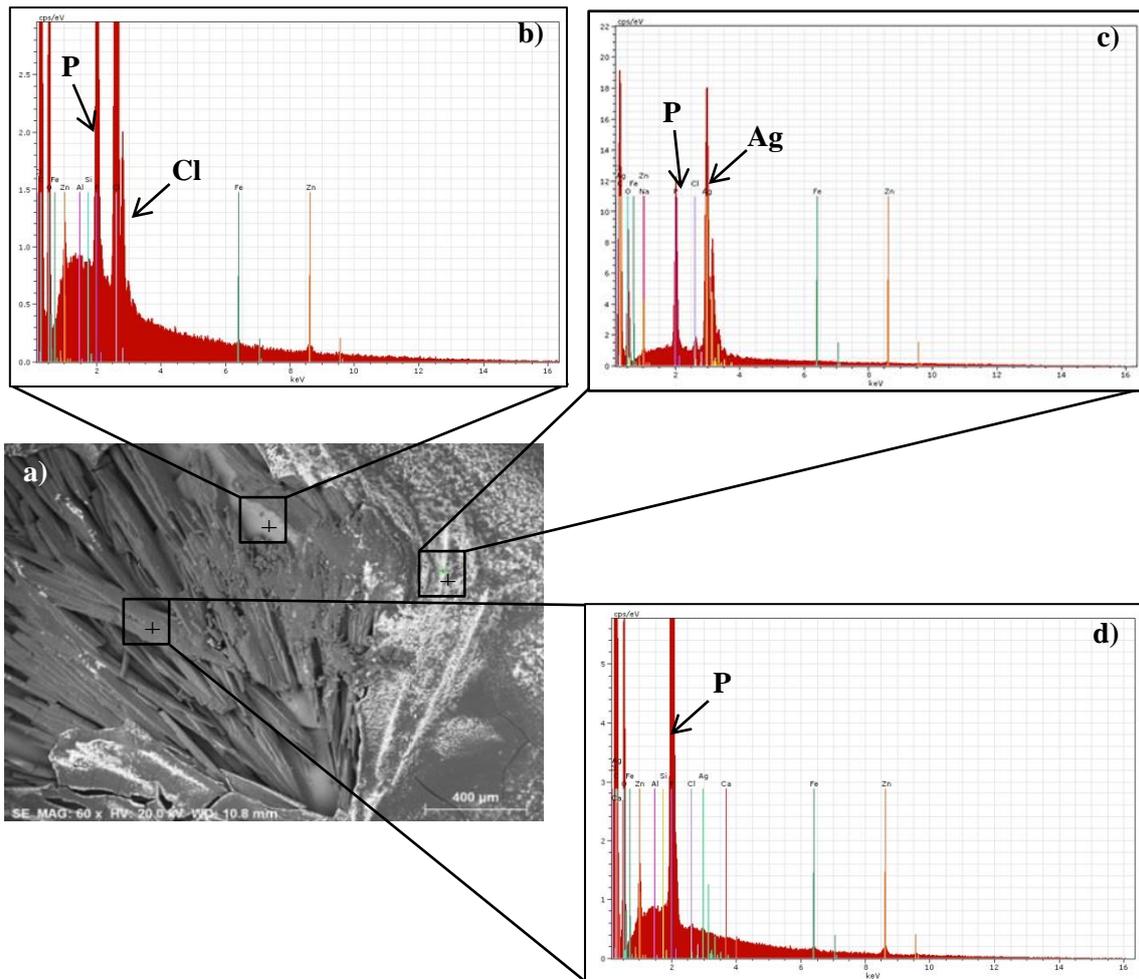


Figura 3.3. a) Imagem de MEV da área apresentada na Fig. 3.2; b), c) e d) análise pontual por EDS das diferentes zonas indicadas em a).

A presença de cloro não é facilmente explicável. De facto, foram questionados conservadores de fotografia e profissionais desta área e não foi encontrada uma resposta. Assim, uma hipótese que se coloca é dever-se a uma contaminação ocorrida durante a produção do negativo, onde o acetato de celulose era dissolvido numa mistura de diclorometano e metanol. Durante a década de 1950, o triacetato de celulose começou a ser fabricado em grande escala, devido à disponibilidade e baixo custo do diclorometano (Valverde, 2005). Outra possível explicação para a presença de cloro, e talvez a mais assertiva, é a utilização de um composto clorado em conjunto com o plastificante cuja função é a de retardação de chama. Os retardadores de chama, tal como o nome indica, evitam ou retardam a combustão da película (Veen & Boer, 2012). Diversas patentes que datam do início do século XX referem a utilização de plastificantes à base de fósforo combinados com compostos clorados, como o cloreto de etileno. O plastificante fosfato de tricloroetileno é referido como um composto resistente à

água e que é bem retido por composições de acetato de celulose (Patente US1994597, 1932; Patente US2761788, 1950). No entanto, como se verá adiante (Figs. 3.15 e 3.16), o cloro aparece numa camada acima e abaixo do suporte e não parece estar misturado com ele, ao contrário do que acontece com o fósforo. Por este motivo, a utilização de um composto clorado parece ter ocorrido em camadas delimitadas e não misturadas no suporte.

Na Fig. 3.4 apresentam-se os mapas de EDS de uma área degradada da amostra N2 onde é possível verificar que a superfície do negativo tem algumas fendas provocadas pelo encurtamento do suporte como consequência da perda dos grupos acetato. Nesta amostra não se detetou a presença de prata nem de cloro, embora tenham sido realizadas várias análises em áreas degradadas e não degradadas. Provavelmente, neste caso, o fósforo apresenta-se uniformemente distribuído pela superfície, mascarando a presença de prata e, eventualmente, de cloro, embora não seja possível dizer se, à semelhança do que se observou para a amostra N1, um composto clorado foi utilizado na produção do negativo.

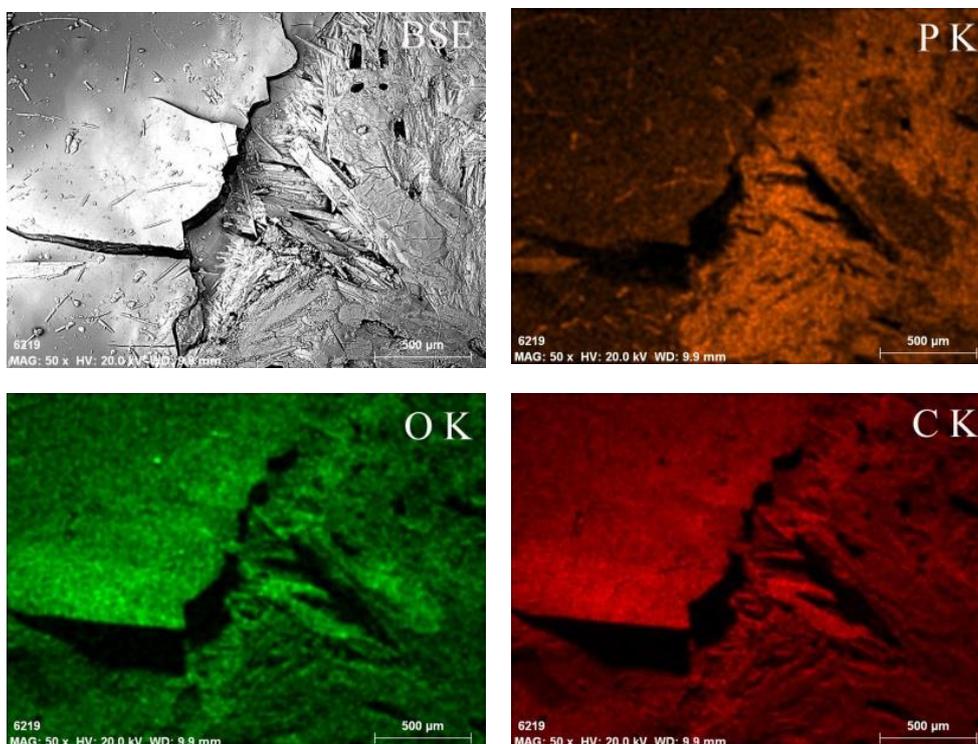


Figura 3.4. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N2.

Na Fig. 3.5 é apresentada uma análise pontual de uma área não degradada da amostra N2. Esta análise confirma a informação dada pelos mapas de EDS de que na sua superfície só se deteta o elemento fósforo.

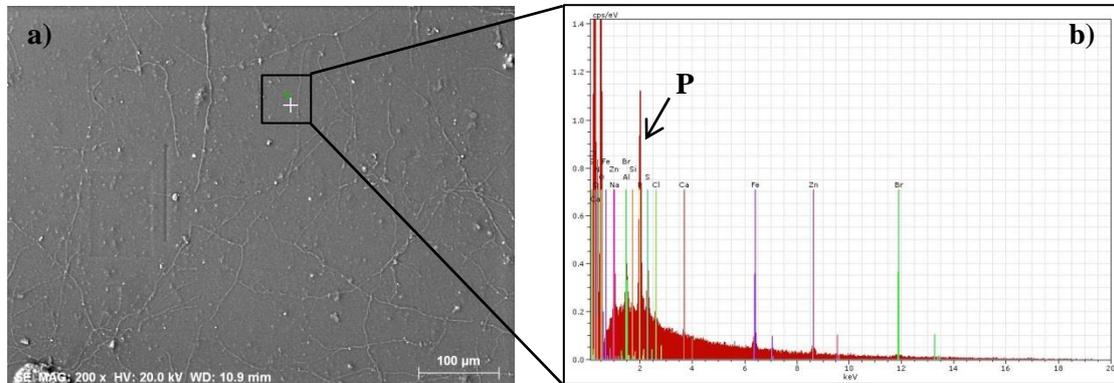


Figura 3.5. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N2; b) análise pontual por EDS da zona indicada em a).

Na Fig. 3.6 são mostrados os mapas de EDS da amostra N3 que, como já foi referido, não apresenta sinais de degradação visíveis a olho nu. No entanto, tal como se referiu, a observação por MEV sugere um estágio inicial do processo de degradação e visualizam-se aglomerados de partículas em grande quantidade. A análise por EDS permitiu detetar cálcio, enxofre, alumínio e silício que sugerem a presença de partículas de sujidade e poeiras, cuja origem é desconhecida e que não encontra paralelo entre as restantes amostras.

Na Fig. 3.7-b) e c) apresentam-se análises pontuais realizadas em diferentes zonas da imagem da Fig. 3.6. Os elementos fósforo e cloro (Fig. 3.7-b) sugerindo a presença provável de trifenilfosfato e de um composto clorado, remetem para materiais usados na produção do negativo, tal como no negativo N1, enquanto que a análise nas zonas de depósitos (Fig. 3.7-c) indica a presença de cálcio e enxofre, de origem desconhecida.

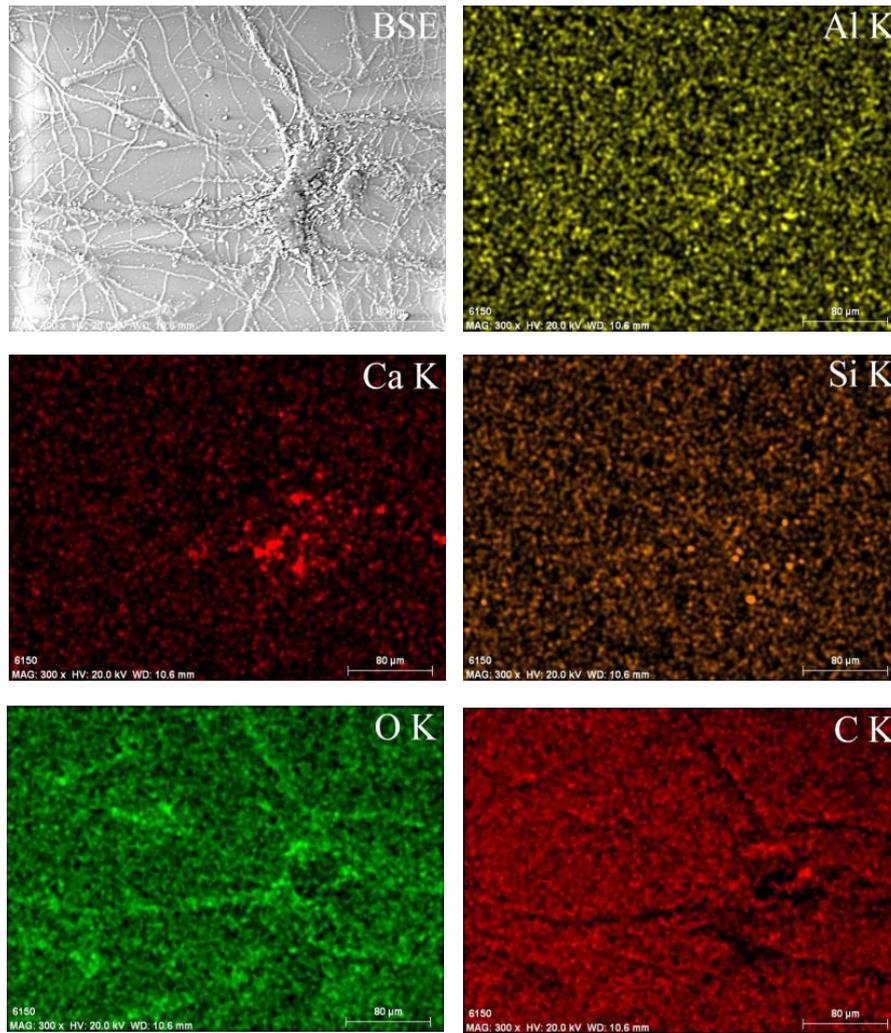


Figura 3.6. Mapas de EDS de uma área não degradada da amostra N3.

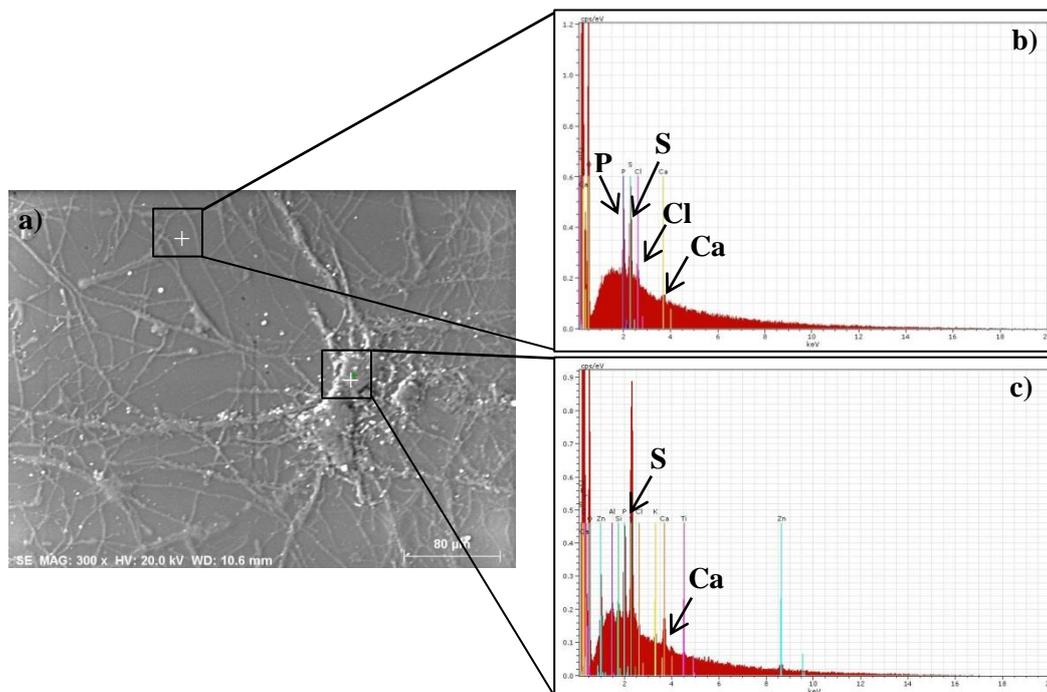


Figura 3.7. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N3; b) e c) análises pontuais por EDS das zonas indicadas em a).

Na Fig. 3.8 apresentam-se os mapas de EDS da amostra N4, que tal como a amostra N2 exibe na sua superfície algumas fendas. No mapa de EDS desta amostra é possível constatar a presença de fósforo na superfície do negativo e no interior da fenda e de cloro que se encontra no interior da fenda sugerindo que o composto clorado se encontra numa camada mais interior da película.

A análise por EDS de uma área na superfície do negativo (Fig. 3.9) permitiu confirmar a presença de fósforo, enxofre, ferro e zinco. A presença de enxofre pode dever-se a uma contaminação com tiosulfato, composto usado na fixação da imagem.

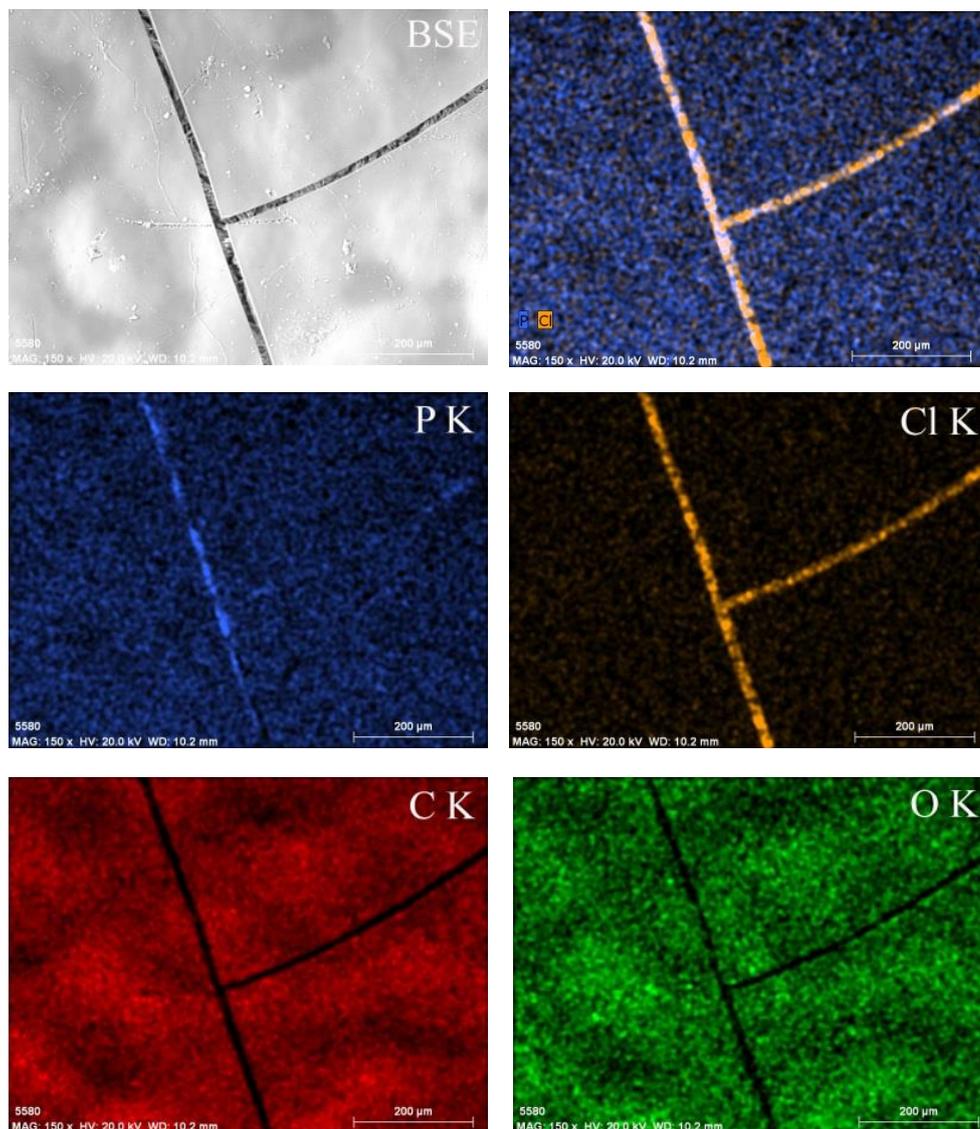


Figura 3.8. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N4.

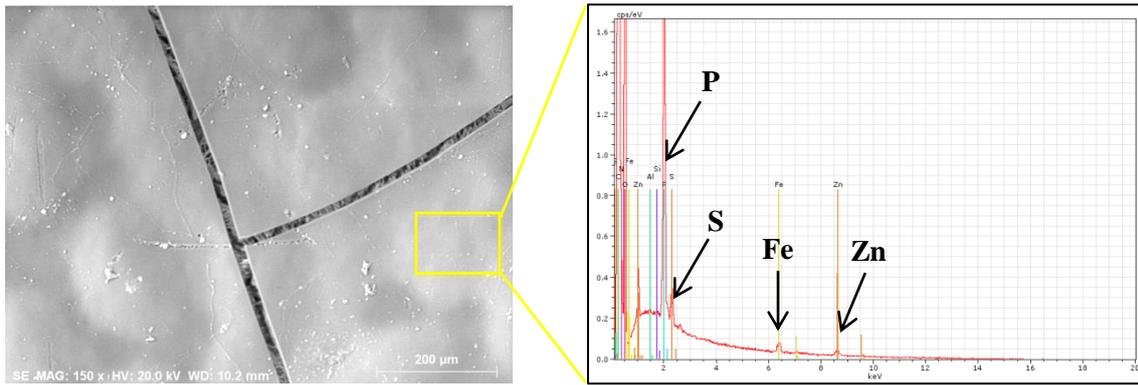


Figura 3.9. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N4; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a).

Os resultados obtidos para a amostra N5 são semelhantes aos da amostra N4. Os mapas de EDS (Fig. 3.10) obtidos numa zona com fenda mostram que o fósforo se encontra presente sobretudo nas camadas abaixo da superfície, dentro da fenda.

A análise pontual (Fig. 3.11) numa zona não degradada permitiu identificar a presença de fósforo, enxofre, ferro e zinco.

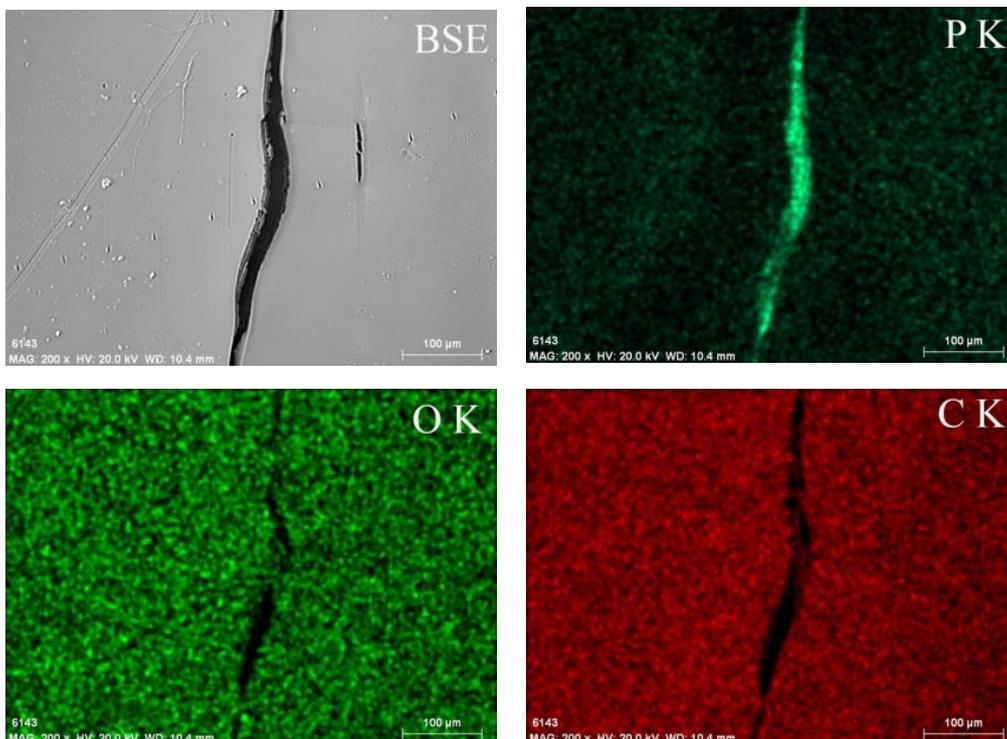


Figura 3.10. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N5.

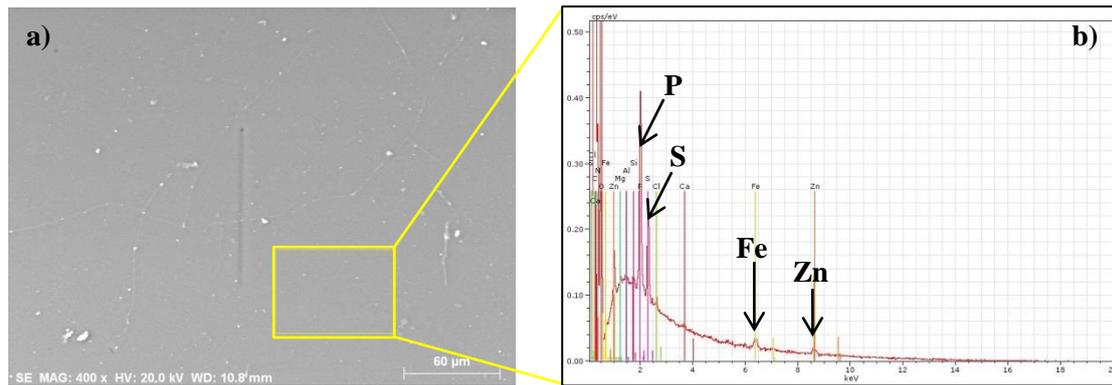


Figura 3.11. a) Imagem de MEV de uma área não degradada da amostra N5; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a).

Finalmente para a amostra N6, também foram feitas várias análises e na Fig. 3.12 apresentam-se os mapas de EDS de uma área degradada onde se observa a formação de aglomerados de cristais. No mapa de EDS desta amostra identifica-se os elementos fósforo, cloro e prata. O fósforo localiza-se nos cristais confirmando o que foi dito anteriormente. Com o encolhimento do suporte, o plastificante migra até à superfície da película ocorrendo assim a formação das bolhas e dos canais. Se não permanecer no interior destas erupções e for exposto ao ar, cristaliza. A prata, presente na camada de emulsão, encontra-se uniformemente distribuída na superfície da amostra. O cloro, distribuído na zona ao redor do aglomerado de cristais indica mais uma vez que o composto clorado provém de uma camada interior do negativo.

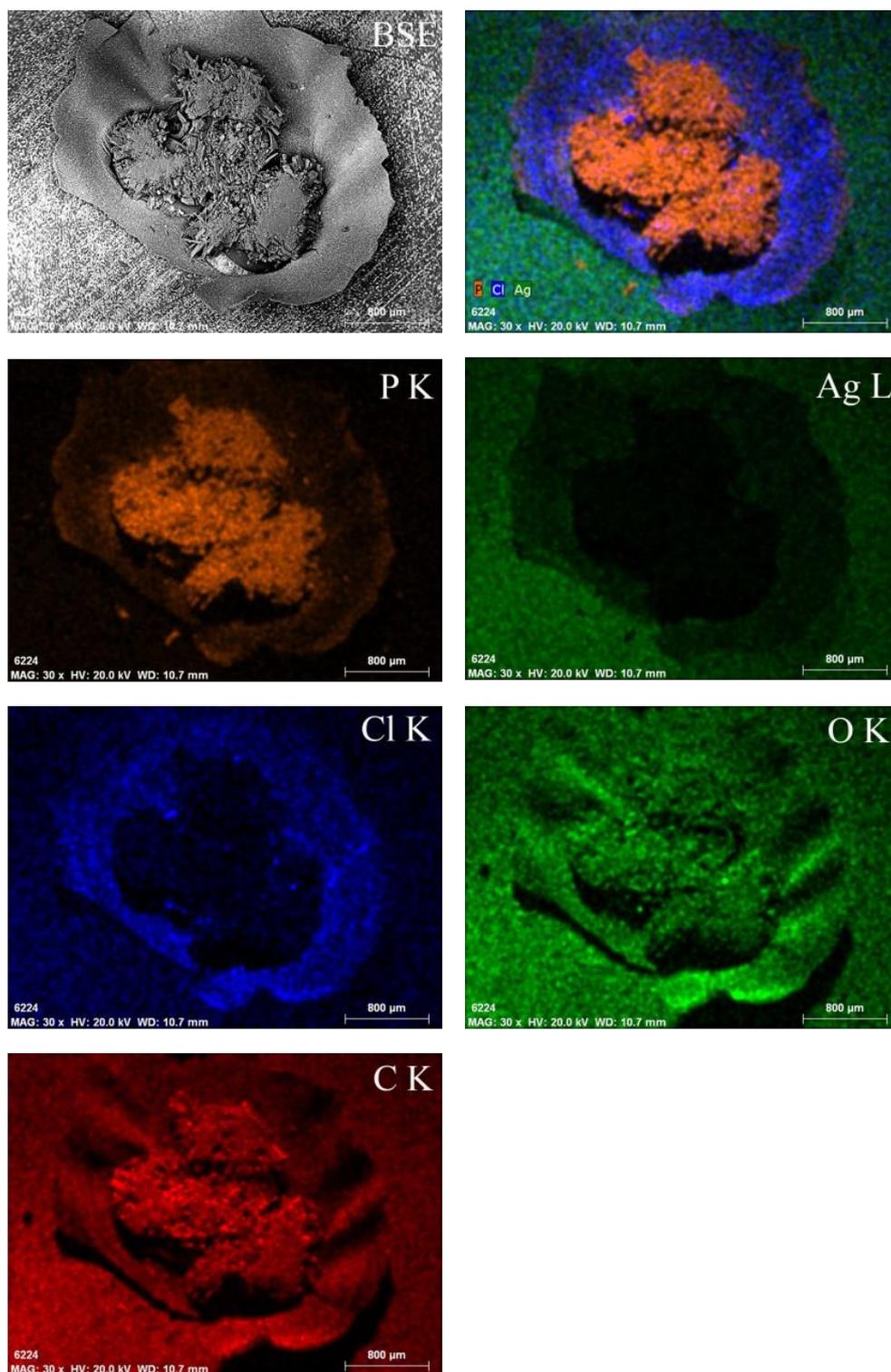


Figura 3.12. Mapas de EDS de uma área degradada da amostra N6.

Na Fig. 3.13-b é apresentada uma imagem de MEV, com ampliação de 300x, dos cristais observados na Fig. 3.13-a e a análise de EDS da Fig. 3.13-c indica que os cristais são de um composto contendo fósforo, muito provavelmente, o plastificante trifenilfosfato que cristalizou lentamente ao entrar em contato com o ar.

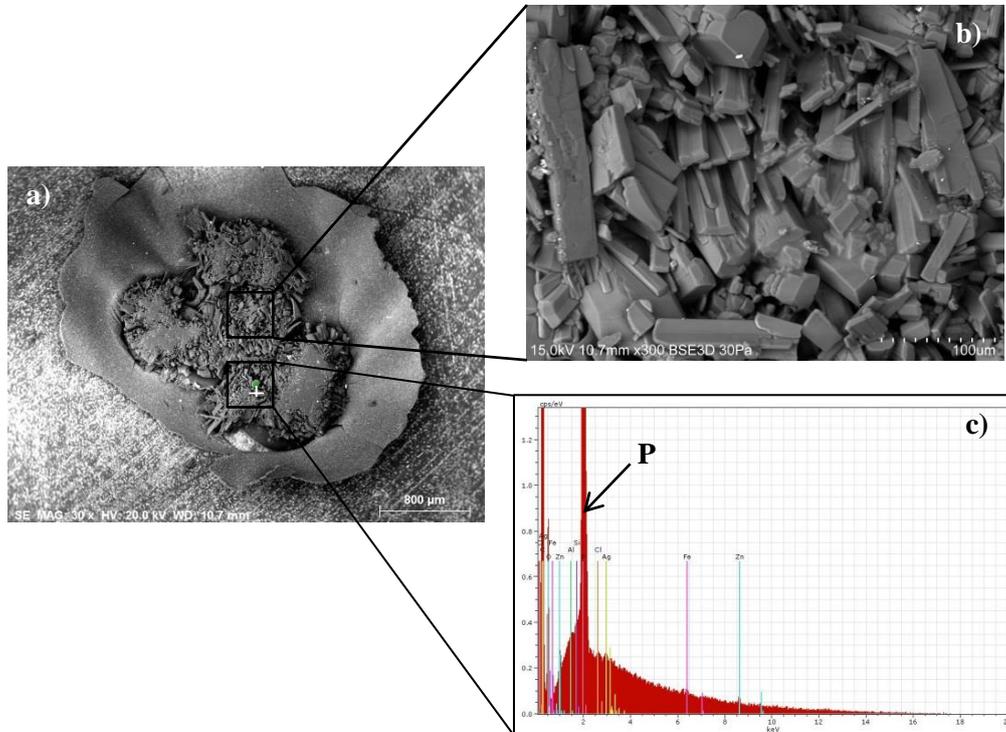


Figura 3.13. a) Imagem de MEV da área degradada da amostra N6 apresentada na Fig. 3.14; b) ampliação (300x) de uma zona indicada de a); c) análise pontual por EDS da zona indicada em a).

Para melhor compreender como se distribuem estes elementos nas diferentes camadas dos negativos foram feitas secções polidas, em corte transversal, dos negativos N1 e N4. A seleção destes negativos teve como critério o seu estado avançado de degradação possibilitando assim a retirada de uma pequena amostra. Estas secções foram observadas ao microscópio ótico de campo escuro (Fig. 3.14) e analisadas por MEV/EDS onde se pode ver as diferentes camadas que compõem o negativo: na parte superior, a camada de emulsão à base de gelatina, que contém as partículas de prata e ao centro, o suporte do negativo. Na parte inferior, parece existir uma outra camada que é em geral considerada como sendo uma camada anti-curvatura contendo corantes anti-halo e também gelatina (Ciliberto *et al.*, De 2013, Valverde, 2005).

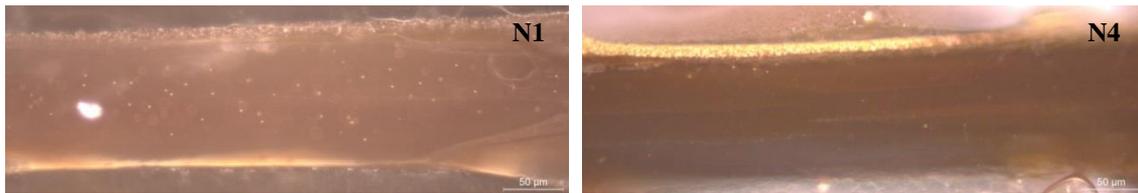


Figura 3.14. Imagens de microscopia ótica de campo escuro das secções transversais das amostras N1 e N4 (ampliação 200x).

Nas Fig. 3.15 e 3.16 apresentam-se os mapas de EDS das secções transversais das amostras N1 e N4 onde é possível ver a distribuição dos vários elementos nas camadas que constituem os negativos. As duas amostras apresentam comportamentos muito semelhantes.

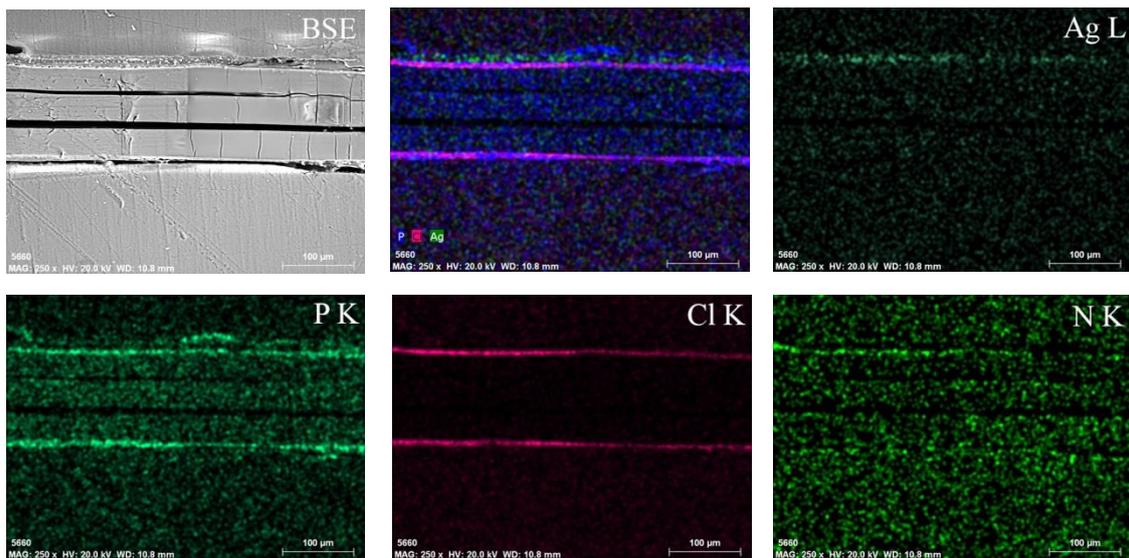


Figura 3.15. Mapas de EDS da secção transversal da amostra N1 onde se pode ver a distribuição dos elementos nas diferentes camadas.

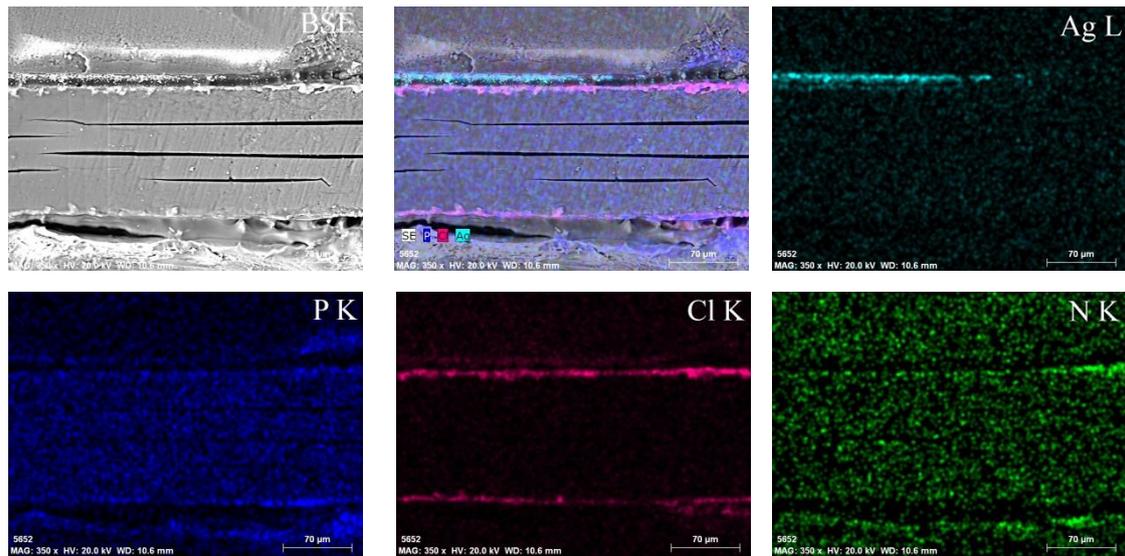


Figura 3.16. Mapas de EDS da secção transversal da amostra N4 onde se pode ver a distribuição dos elementos nas diferentes camadas.

A camada de suporte é rica em fósforo proveniente do plastificante. A perda de plastificante é um dos processos mais comuns de degradação do suporte de acetato de celulose (Littlejohn *et al.*, 2013). Na verdade, na amostra N1, parte do plastificante constitui uma camada imediatamente acima e abaixo do suporte, devido à lixiviação do fósforo. Na amostra N4 o fósforo parece estar mais uniformemente distribuído no suporte embora esteja presente também imediatamente acima e abaixo desta camada. Em ambos os cortes existe também duas camadas de cloro, situadas acima e abaixo do suporte. Como já foi referido anteriormente, a presença deste elemento não é fácil de explicar. Contudo a forma como o cloro está distribuído sugere que este foi aplicado como uma camada e não misturado no suporte pois nestas duas amostras não se deteta cloro no suporte. O azoto, embora esteja presente nos aminoácidos que compõem a gelatina, neste caso, parece constituir uma camada fina entre a gelatina e o suporte. Valverde (2005) refere a utilização de nitrocelulose para melhorar a aderência entre estas camadas.

Na Fig. 3.17 são apresentadas ampliações das imagens de MEV onde se indica a estimativa da espessura das camadas identificadas em ambos os cortes estratigráficos. Os negativos N1 e N4 têm aproximadamente 150 µm de espessura e a espessura da camada de emulsão ronda os 15 µm. Resultados semelhantes foram obtidos por Ciliberto e colaboradores (2013) para amostras de películas cinematográficas de acetato

de celulose. As partículas de prata na camada superior têm uma forma arredondada com um diâmetro inferior ou igual a 1 μm .

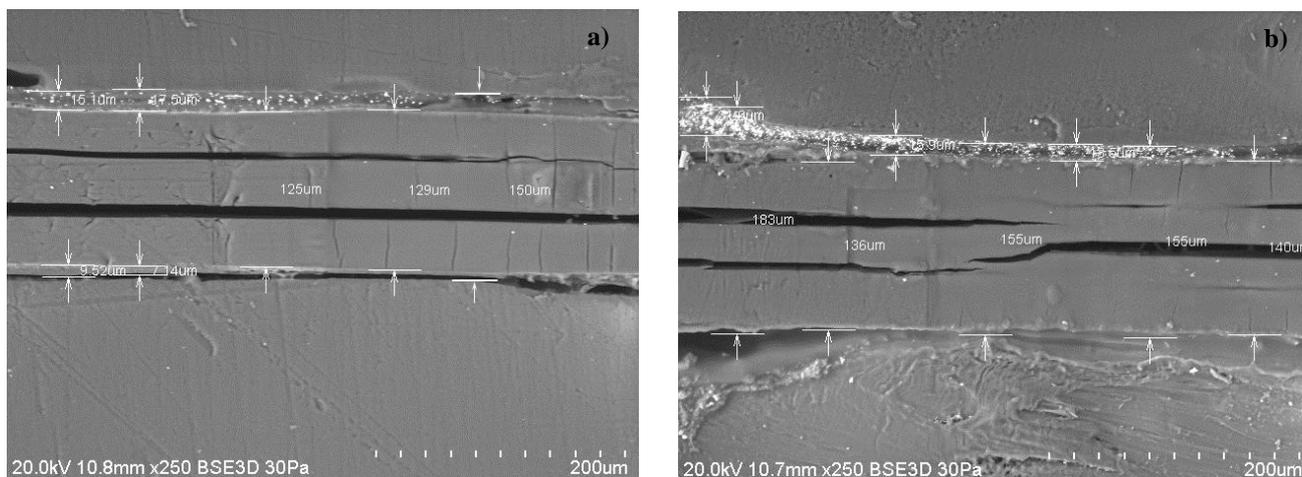


Figura 3.17. a) e b) Imagens de MEV das amostras N1 e N4 respectivamente indicando a espessura das camadas identificadas.

3.1.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é uma das técnicas mais amplamente utilizadas no estudo de bens culturais (Prati *et al.*, 2009). Quando esta técnica é utilizada em modo de reflexão total atenuada (ATR), oferece a possibilidade de investigar diretamente a composição química dos materiais sem preparação prévia da amostra (Schmitt & Flemming, 1998).

Os negativos fotográficos foram estudados por FT-IR em modo ATR, tendo sido analisadas áreas não degradadas e degradadas. No caso da amostra N1, analisou-se ainda uma camada mais interior do negativo denominada “interior”. Os espectros obtidos (Fig. 3.18) foram normalizados, permitindo a sua sobreposição e comparação. Para a interpretação dos mesmos, recorreu-se à base de dados do software OMNICTM. No anexo III, nas Figs. III.1 e III.2 apresentam-se os espectros de infravermelho do trifenilfosfato e do acetato de celulose obtidos nesta base de dados. Para a gelatina traçou-se um espectro de FT-IR em modo ATR de folhas de gelatina utilizadas em preparações culinárias (Fig. III.3 do anexo III). No anexo III é feita a identificação exhaustiva das bandas observadas nos espectros obtidos por comparação com as bandas de

trifenilfosfato, acetato de celulose e gelatina. No caso da amostra N3 só se apresentam as bandas identificadas no espectro de uma área não degradada pois esta amostra não apresenta sinais visíveis a olho nu de degradação em toda a sua superfície.

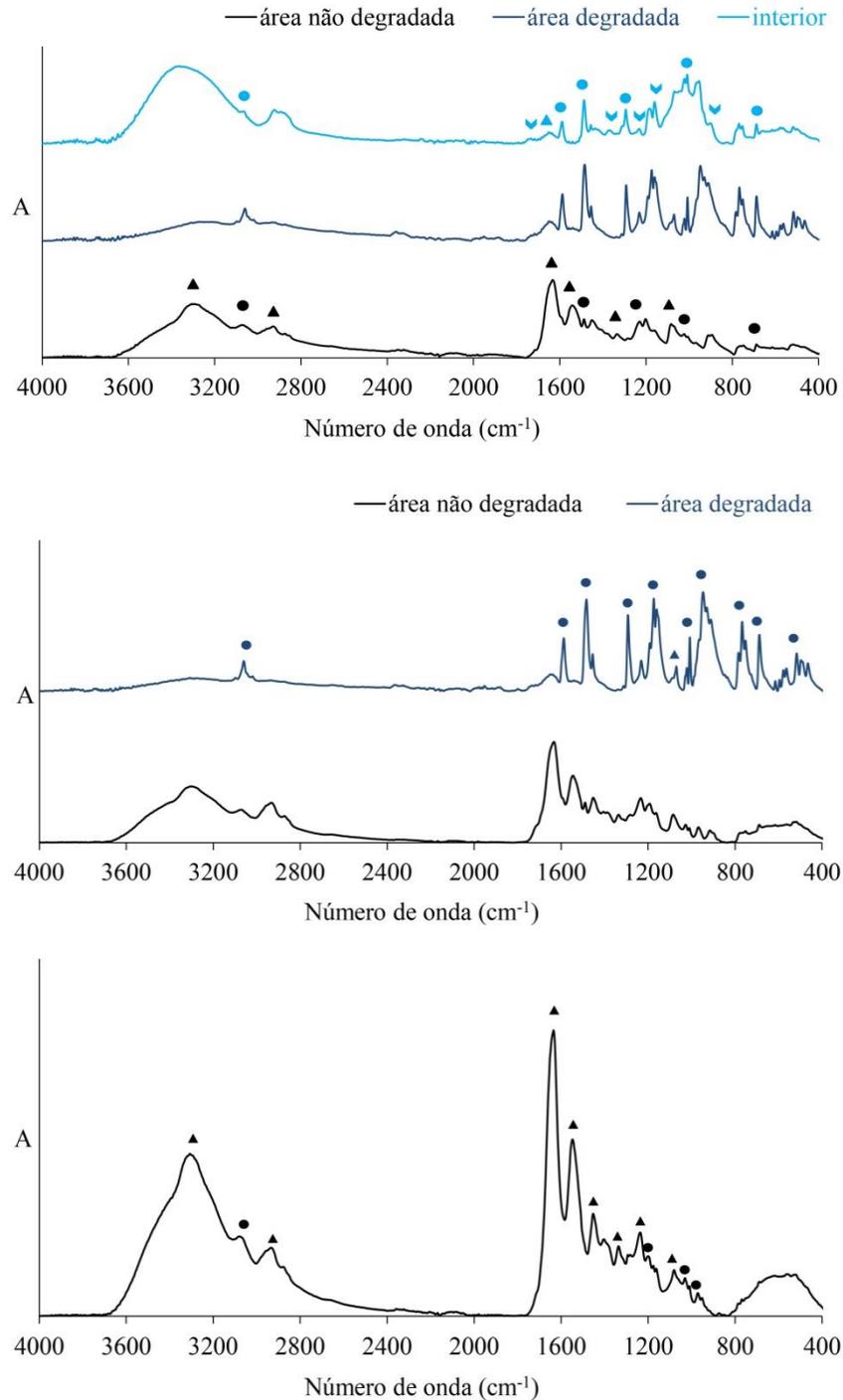


Figura 3.18. Espectros de FT-IR em modo ATR das amostras N1, N2 e N3.

Legenda: ▲ Gelatina ● TFF ▼ Acetato de celulose

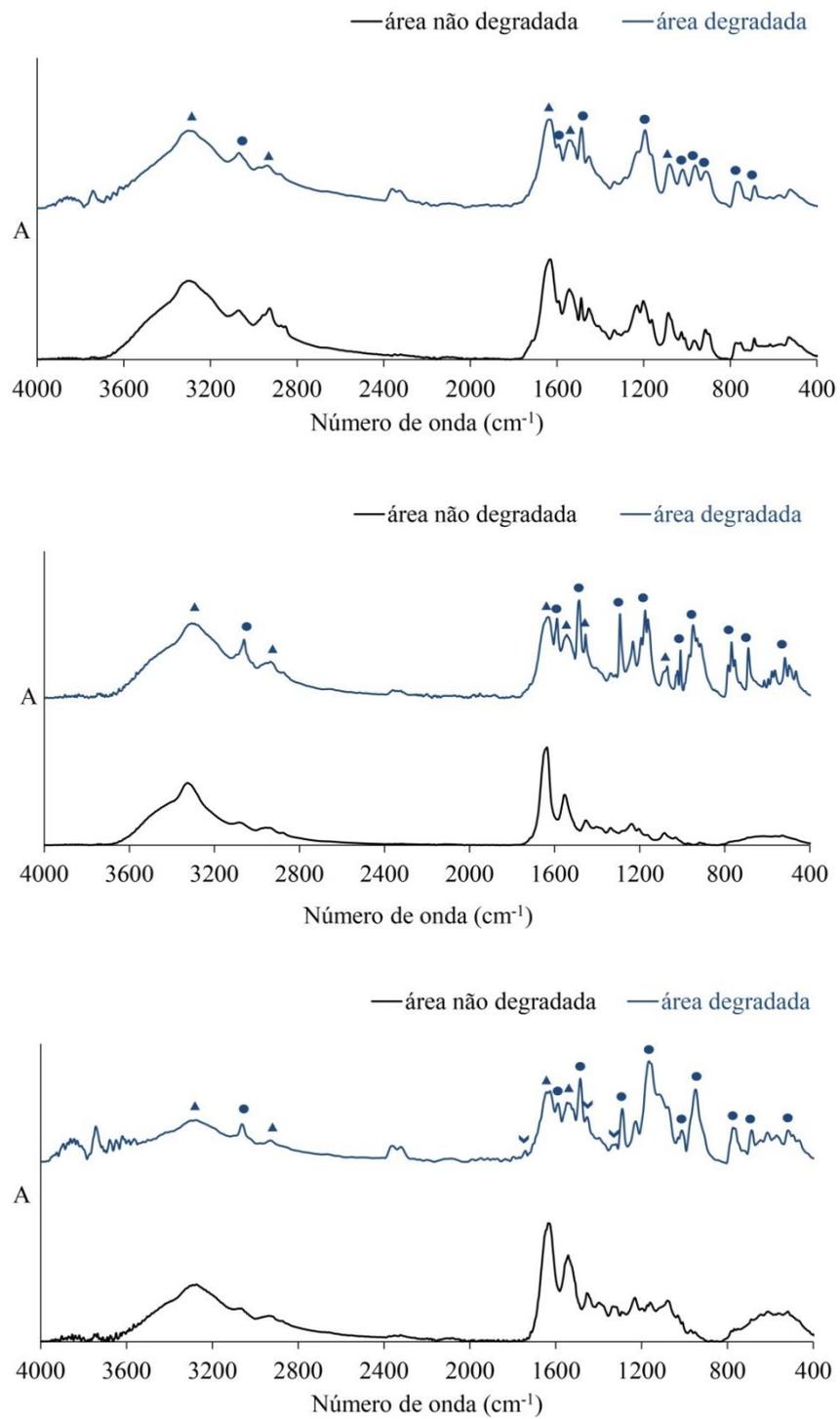


Figura 3.18 continuação. Espectros de FT-IR em modo ATR das amostras N4, N5 e N6.

Legenda: ▲ Gelatina ● TFF ▼ Acetato de celulose

Os espectros das áreas não degradadas de todas as amostras são muito semelhantes. Por comparação com espectros da base de dados, verifica-se que as amostras apresentam várias bandas indicadoras da presença de trifenilfosfato (TFF), nomeadamente, a 3060, 1587, 1487, 1230, 1020, 954 e 689 cm^{-1} e várias bandas que remetem para a presença de gelatina, tais como as bandas a 3300, 2930, 1633, 1543, 1455, 1337 e 1083 cm^{-1} .

A gelatina é uma proteína obtida comercialmente a partir de peles e ossos de animais. As proteínas são macromoléculas compostas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Nos espectros de infravermelho apresentam bandas características associadas ao grupo amida que são denominadas por bandas amida. Estas bandas representam diferentes modos de vibração da ligação peptídica. Nos espectros das amostras são identificadas as bandas correspondentes à amida I, amida II e amida III (Hanani *et al.*, 2011). A banda referente à amida I deve-se ao estiramento da ligação C = O e tem ainda contribuições do estiramento da ligação CN, deformação da ligação CCN e deformação da ligação NH. As bandas atribuídas à amida II e III resultam de diferentes contribuições, estiramento e deformação, das ligações CN e NH, respetivamente e de pequenas contribuições de deformação da ligação CO e de estiramento da ligação CC (Almeida *et al.*, 2012; Barth, 2007).

Os resultados obtidos estão de acordo com os obtidos por Schilling e colaboradores (2010) que caracterizaram por FT-IR amostras de ésteres de celulose, identificando a 1589, 1489 e a 960 cm^{-1} bandas que indicam a presença de trifenilfosfato. Por sua vez, Ciliberto e colaboradores (2013) nas suas amostras de películas cinematográficas de acetato de celulose identificaram bandas a 1646, 1540, 1488 e 755 cm^{-1} que correspondem aos grupos amina dos aminoácidos presentes na gelatina, concluindo que a camada de emulsão é constituída por gelatina.

Para todas as amostras foi comparada uma área degradada e uma área não degradada. Na amostra N1 foi feita uma comparação entre uma área que apresentava bolhas (área degradada) e uma área não degradada. O espectro da área degradada destaca a presença de TFF, enquanto as bandas de gelatina praticamente desapareceram. Este resultado está de acordo com o facto de que nas zonas degradadas a camada de emulsão ter sido perdida e o trifenilfosfato lixiviou do suporte formando-se assim as bolhas e os canais (Jamison, 2004; Littlejohn *et al.*, 2013). Uma vez que a amostra N1 está muito degradada, foi possível retirar uma parte das camadas externas e obter um espectro da parte interior do negativo. Este espectro, como já se referiu, chamado

“interior” na Fig. 3.10-a), apresenta várias bandas que foram atribuídas ao acetato de celulose, nomeadamente, a banda aos 1733 cm^{-1} devida ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ do grupo éster, a banda a 1237 cm^{-1} ao estiramento assimétrico da ligação $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ do grupo éster, a banda a 1068 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ ligada ao carbono do grupo carbonilo (banda sobreposta com uma banda de TFF) e a banda localizada na região de 1372 cm^{-1} , que se deve ao grupo metilo do acetato de celulose (Schilling et al., 2010; Cudell et al., 2011). A banda a 3364 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação OH e a banda a 1740 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$. Cudell et al. (2011) verificaram que à medida que avança o processo de desacetilação do suporte, a banda de absorção referente ao estiramento da ligação OH a 3332 cm^{-1} , aumenta em intensidade e, por outro lado, ocorre uma diminuição na intensidade da banda atribuída ao grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), a 1732 cm^{-1} , e um deslocamento desta banda para valores de menores número de onda. Paralelamente, a conversão a materiais celulósicos é acompanhada pelo aparecimento de bandas de absorção entre os 1200 cm^{-1} e os 950 cm^{-1} . Também Littlejohn et al. (2013) referem que à medida que o acetato de celulose sofre degradação, a intensidade da banda $\text{C}=\text{O}$ diminui enquanto a da banda $\text{O}-\text{H}$ aumenta. Para avaliar o avanço do processo degradativo, Littlejohn et al. (2013) estimaram a razão entre as intensidades $\text{C}-\text{OH}/\text{C}-\text{H}$ e $\text{O}-\text{H}/\text{C}-\text{H}$, uma vez que a intensidade da banda $\text{C}-\text{H}$ mantém-se constante para o acetato de celulose e a celulose, e verificaram que a razão $\text{O}-\text{H}/\text{C}-\text{H}$ aumenta consideravelmente à medida que a degradação aumenta, o que também é acompanhado por um deslocamento da posição da banda $\text{C}=\text{O}$. No caso das nossas amostras, a interpretação dos dados é difícil uma vez que o espectro do plastificante se sobrepõe parcialmente com o do acetato de celulose. No entanto, a relação entre as intensidades destas duas bandas obtidas para o espectro “interior” sugere que um forte processo de degradação está a ocorrer.

A amostra N2 encontra-se degradada apresentando bolhas, canais e cristais. O espectro da área degradada foi traçado numa zona de cristais. O espectro obtido, à semelhança da amostra N1, realça também a presença quase exclusiva de TFF apresentando bandas a $3060, 1588, 1483, 1008, 951, 768, 688$ e 517 cm^{-1} . A amostra N3 encontra-se em bom estado de conservação. De facto, o espectro traçado para esta amostra é muito semelhante ao espectro da gelatina (Fig. II.3 do anexo II) apresentando a 1635 cm^{-1} a banda característica da amida I, a 1548 cm^{-1} a banda da amida II e a 1236 cm^{-1} a banda característica da amida III. O espectro de FT-IR confirma assim a inspeção

visual e a própria análise de MEV/EDS. A amostra N4 apresenta uma coloração azul e na sua superfície é possível ver canais e bolhas. A área degradada escolhida para traçar o espectro foi uma área com bolhas. Os espectros da área não degradada e degradada da amostra N4 são semelhantes embora o espectro da área degradada apresente picos relativamente mais intensos de TFF em comparação com a área não degradada. A amostra N5 encontra-se também degradada apresentando diversas bolhas e a formação de alguns cristais. O espectro da área degradada foi traçado numa área com cristais. No espectro obtido para a área degradada é possível identificar diversos picos associados ao TFF que não são visíveis na área não degradada da amostra. O espectro da área não degradada da amostra N5 realça a presença de gelatina apresentando as bandas referentes às amidas I, II e III a 1636, 1553 e 1400-1200 cm^{-1} respetivamente. A superfície da amostra N6 encontra-se escurecida, com aspeto metalizado devido ao processo de degradação designado por “espelho de prata”, não sendo visível a imagem retratada. Esta amostra apresenta também a formação de aglomerados. O espectro da área degradada foi traçado numa área com cristais que destaca também a presença do plastificante TFF e é possível identificar algumas bandas atribuídas ao acetato de celulose tais como a banda a 1749 cm^{-1} que corresponde ao estiramento da ligação C=O, a 1437 cm^{-1} que corresponde à deformação da ligação CH_2 , e a banda a 1388 cm^{-1} que corresponde à deformação da ligação CH_3 .

Esta técnica permitiu confirmar a composição das diferentes camadas constituintes dos negativos. Os espectros obtidos nas áreas não degradadas de todas as amostras assemelham-se ao espectro da gelatina indicando assim de que é constituída a camada mais superficial do negativo, a camada de emulsão. Nas áreas degradadas das amostras é detetado o plastificante trifenilfosfato pois devido ao enfraquecimento do suporte, este deixa de conseguir reter o plastificante no seu interior. Este facto corrobora a informação obtida por MEV-EDS onde se detetou o elemento fósforo. O suporte dos negativos é de acetato de celulose contudo só se detectou a banda característica do acetato de celulose (1733 cm^{-1}) quando se removeu as camadas superficiais da amostra N1 e na amostra N6.

3.1.4. Micro-difração de Raios-X (μ -DRX)

A difracção de raios-X é uma técnica que fornece informações sobre a composição química e mineralógica de amostras cristalinas. No modo micro, é uma técnica adequada para a análise de amostras de dimensões reduzidas como as retiradas de obras de arte e de peças museológicas (Corbeil, 2004). Na indústria fotográfica, esta técnica desempenha um papel importante na análise de alguns dos materiais utilizados na produção dos espécimes fotográficos (Blanton, 2003). As análises por μ -DRX foram realizadas diretamente sobre as amostras, em áreas degradadas e não degradadas, sem tratamento prévio ou amostragem. Para a interpretação dos difratogramas obtidos recorreu-se à base de dados do software X'Pert HighScore 2.2. Na Tabela IV.1 do anexo IV é feita a identificação das riscas de difracção observadas nos difratogramas obtidos por comparação com as riscas dos difratogramas de trifenilfosfato, prata e de triacetato de celulose constantes na base de dados referida.

Na Fig. 3.19 são apresentados os difratogramas das amostras N1, N2, N3, N4, N5 e N6. Os difratogramas das áreas não degradadas e degradadas das amostras N1, N2, N4 e N5 foram traçados em áreas contendo canais enquanto na amostra N6 foi escolhida uma área com cristais. Para a amostra N3 analisou-se apenas uma área (área não degradada).

As amostras N1, N2, N4 e N5 apresentam um comportamento semelhante para as suas áreas degradadas e não degradadas. Nas primeiras é visível a presença de trifenilfosfato (TFF) cristalino e prata metálica. No caso das áreas não degradadas, a presença de trifenilfosfato e de prata é também detetada, mas em geral, a contribuição da baixa cristalinidade do suporte com uma banda alargada a aproximadamente $21^\circ 2\theta$ dominam o difratograma.

No caso da amostra N3, o difratograma tem duas contribuições: para valores de ângulo inferior a $30^\circ 2\theta$ observam-se as contribuições do que parece ser devido ao triacetato de celulose, embora esta atribuição deva ser cuidadosa uma vez que o grau de substituição do polímero que constitui o suporte é desconhecido e difícil de determinar; e a contribuição para valores superiores a $30^\circ 2\theta$ devido à presença de prata metálica.

Quanto à amostra N6, o comportamento entre área degradada e não degradada é semelhante às amostras anteriores. Porém, é de referir que as riscas de difracção correspondentes à prata metálica, em ambas as áreas, são proporcionalmente bastante

mais intensas do que nas amostras anteriores o que se deve à presença do chamado “espelho de prata” um dos processos de degradação detetados nesta amostra.

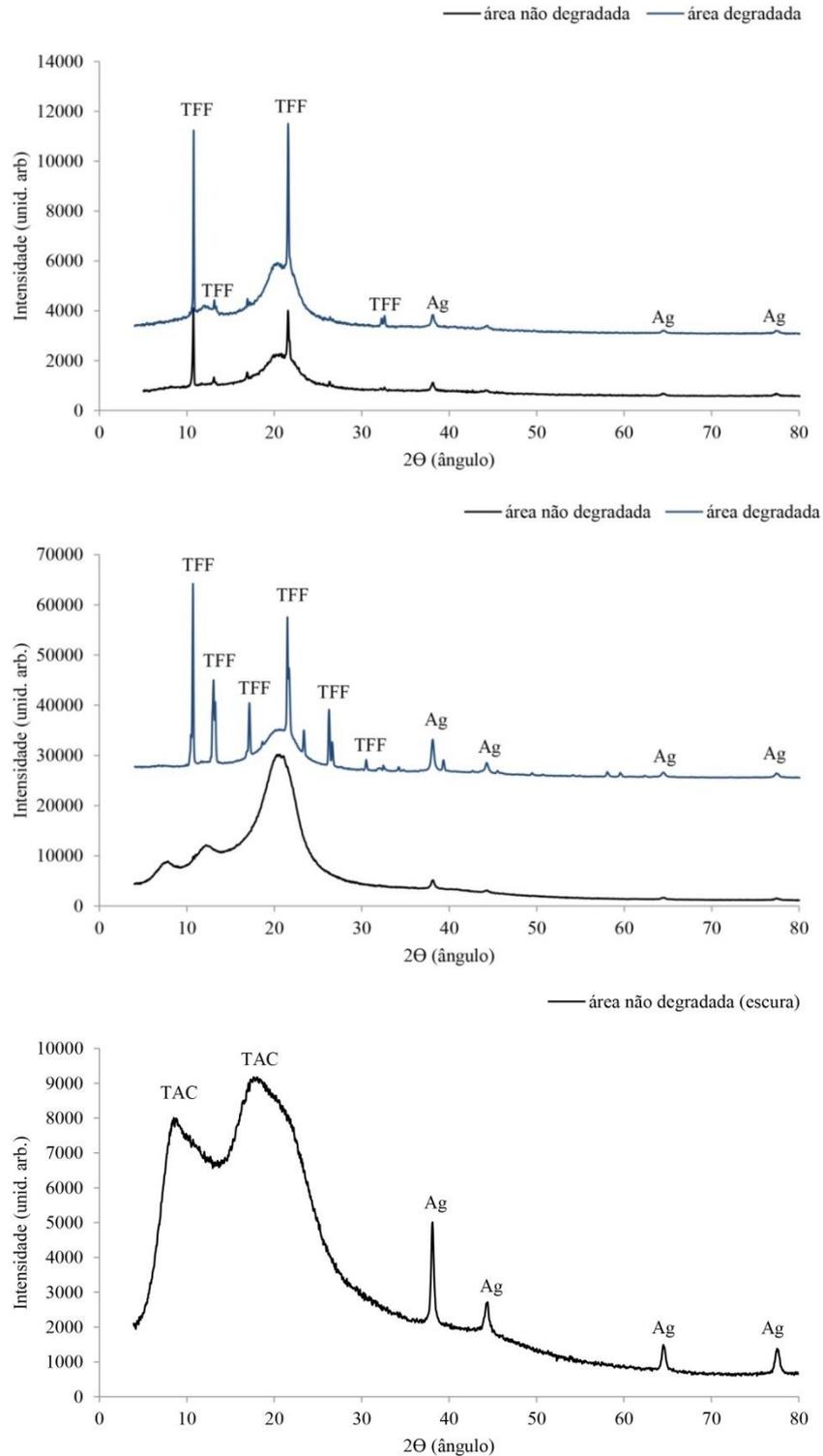


Figura 3.19. Difratomogramas das amostras N1, N2 e N3. Legenda: TFF – trifenilfosfato; TAC – triacetato de celulose; Ag – prata.

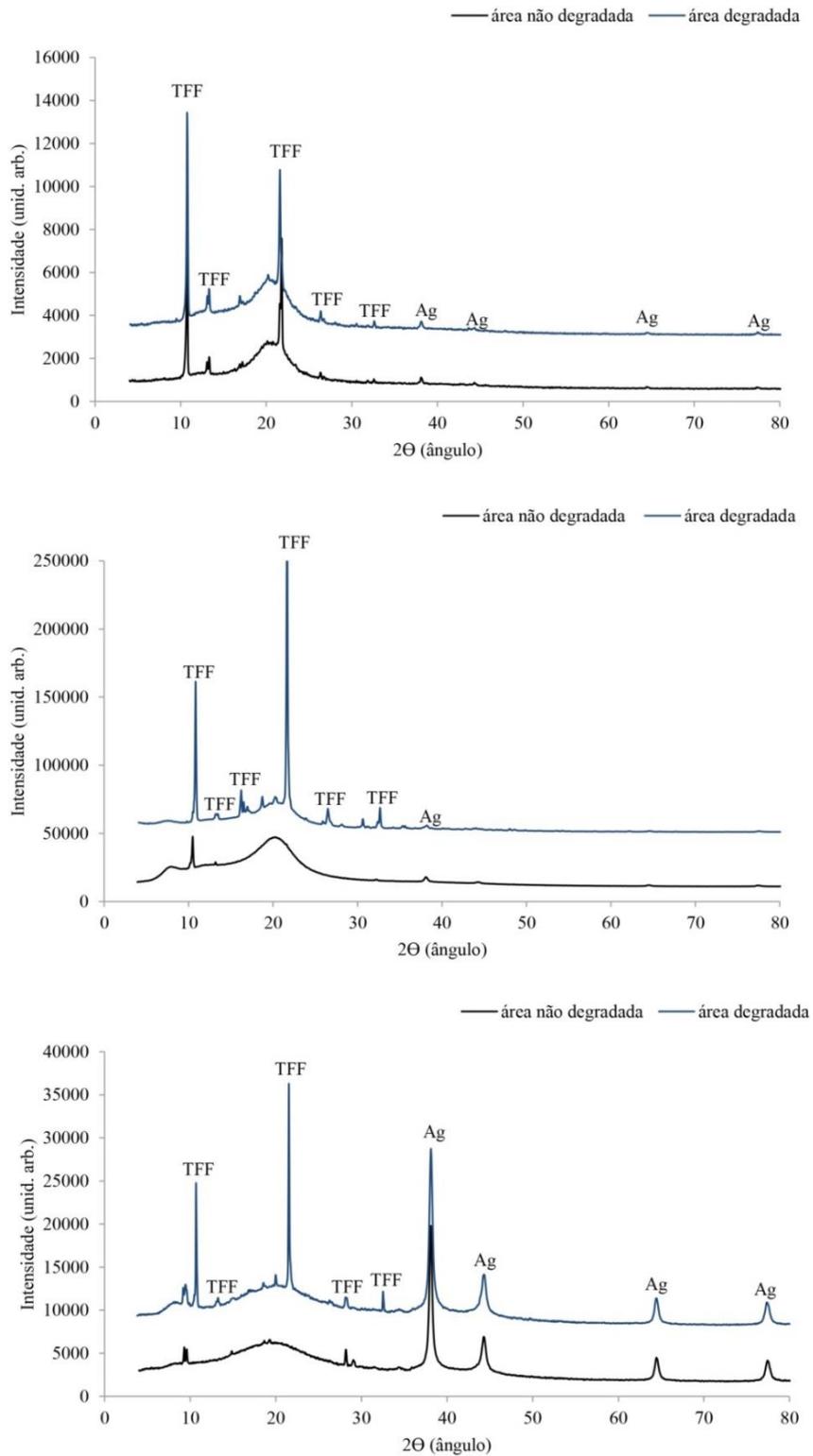


Figura 3.19 continuação. Difratogramas das amostras N4, N5 e N6. Legenda: TFF – trifenilfosfato; Ag – prata.

A análise por μ -DRX confirmou a presença de trifenilfosfato cristalino em todas as amostras, à exceção da amostra N3, corroborando as imagens apresentadas na Fig. 3.13 para a amostra N6, onde foi possível observar os cristais de trifenilfosfato. Foi identificado também a prata em todas as amostras. Na amostra N3 foram identificadas riscas de difração atribuídas ao triacetato de celulose o que sugere que o polímero que constitui o suporte desta amostra poderá ter um grau de substituição superior ao das restantes amostras em estudo. Por micro-difração foi possível também verificar que as áreas degradadas das amostras apresentam, comparativamente, trifenilfosfato do que as áreas não degradadas, o que já tinha sido também observado por MEV-EDS e por ATR-FT-IR.

3.1.5. Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (FRX)

A análise de fotografias por espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) é uma área em desenvolvimento, particularmente por se tratar de uma técnica não-invasiva de análise permitindo que não seja realizada amostragem. O uso desta técnica traz um conjunto de desafios para a interpretação dos dados, pois os espectros fornecem informação não só relacionadas com a imagem fotográfica, mas também com o seu suporte (Grieten & Casadio, 2010).

Na Figura 3.20 são apresentados os espectros de fluorescência de todas as amostras. A análise permitiu detetar os elementos P, S, Cl, Ca, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Br e Ag, em áreas degradadas e não degradadas. Os picos foram normalizados pelo pico de Compton, com desvio padrão associado. O titânio (Ti) detetado provém do filtro utilizado que é composto por este elemento enquanto que os elementos ródio (Rh) e paládio (Pd) devem-se ao equipamento.

Todas as amostras apresentam um comportamento semelhante para as suas áreas não degradadas e degradadas. Nas amostras N1, N2 e N4 observa-se a presença dos elementos fósforo, enxofre, cloro, cálcio, crómio, ferro, níquel, cobre, zinco e prata. O fósforo, o cloro e a prata, também detetados por análise EDS, correspondem ao plastificante trifenilfosfato, ao composto clorado e aos sais de prata presentes na camada de emulsão, respetivamente. Os elementos crómio, ferro, níquel e cobre podem estar associados com contaminação ocorrida durante o processo de fabrico dos negativos. O

zinco, também detetado por análise EDS, é provavelmente devido à utilização de cloreto de zinco como catalisador na produção de ésteres de celulose enquanto que uma explicação possível para a presença de enxofre nestas amostras é este dever-se a uma contaminação por tiosulfato usado na fixação da imagem ou pode ter ocorrido a corrosão da prata.

Nas amostras N5 e N6 observa-se a presença dos mesmos elementos, à exceção do cloro, detetados nas amostras referidas anteriormente enquanto que na amostra N3, para além do cloro também não foi detetado fósforo.

Na amostra N4, assim como nas amostras N2 e N6 foi detetado o elemento bromo sugerindo que as partículas fotossensíveis presentes na camada de emulsão são sais de brometo de prata.

Comparando os valores da Tabela 3.6 para as áreas não degradadas e degradadas das amostras verifica-se que nas últimas parece haver tendência para haver mais fósforo. Resultados semelhantes foram obtidos por MEV-EDS e por μ -DRX.

Foi feita também a comparação entre áreas não degradadas claras e escuras verificando-se que as áreas escuras apresentam mais prata, como seria de esperar. Ao analisar a tabela é possível verificar que das seis amostras a N6 é a que apresenta maior quantidade de prata possivelmente devido à presença do “espelho de prata”.

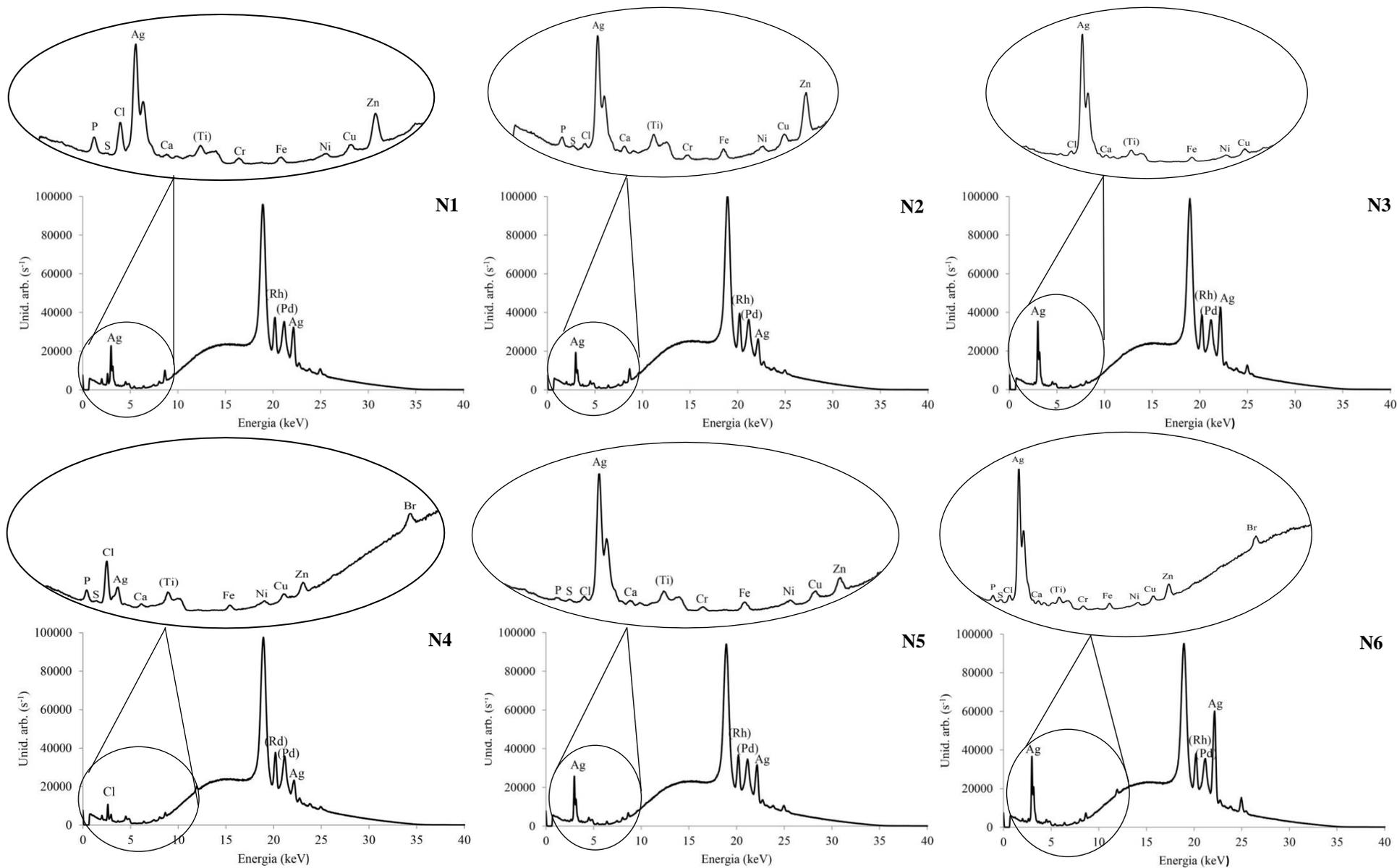


Figura 3.20. Espectros de fluorescência de áreas degradadas das amostras N1, N2, N4, N5 e N6 e de uma área não degradada da amostra N3.

Na Tabela 3.6 é feita uma semi-quantificação por desconvolução dos espectros, normalizados ao pico de Compton para efeitos de comparação.

Tabela 3.6. Contagens obtidas pela desconvolução do espectro da área degradada e não degradada, divididas pelas contagens da região de interesse do respetivo pico de Compton e multiplicadas por 10000 (média de três medições e desvio padrão). Legenda: nd – área não degradada; d – área degradada.

		P	S	Cl	Ca	Cr	Fe	Ni	Cu	Zn	Br	Ag
N1	nd	35.0 ± 1.7	4.2 ± 1.7	143.2 ± 3.2	10.3 ± 2.8	30.6 ± 3.8	43.4 ± 9.1	37.3 ± 5.5	57.5 ± 7.7	195.8 ± 22.6	-	1553.2 ± 275.6
	d	71.0 ± 20.0	3.5 ± 0.7	162.9 ± 26.0	13.1 ± 3.6	30.9 ± 0.9	41.8 ± 2.1	41.4 ± 0.7	62.1 ± 2.0	217.8 ± 24.7	-	1251.3 ± 218.5
N2	nd_clara	17.4 ± 3.3	10.9 ± 1.0	3.1 ± 2.4	24.7 ± 6.5	27.4 ± 2.8	51.8 ± 0.8	45.0 ± 0.5	65.6 ± 1.0	291.1 ± 16.8	1363.4 ± 1190.4	398.5 ± 279.6
	nd_escura	18.0 ± 1.6	9.4 ± 1.0	3.3 ± 1.6	20.7 ± 4.5	26.9 ± 0.6	52.2 ± 2.4	44.0 ± 2.1	67.8 ± 2.1	282.7 ± 10.3	-	715.4 ± 154.4
	d	78.0 ± 33.4	7.3 ± 2.8	*	21.5 ± 2.8	21.1 ± 0.6	49.9 ± 4.2	43.3 ± 1.2	63.7 ± 2.1	249.6 ± 5.3	-	866.3 ± 286.2
N3	nd_clara	-	10.0 ± 1.7	*	7.9 ± 1.5	6.9 ± 1.4	44.5 ± 0.4	41.4 ± 1.5	61.1 ± 0.3	16.1 ± 0.6	-	1493.4 ± 55.9
	nd_escura	-	-	*	8.3 ± 1.0	6.7 ± 0.5	41.0 ± 1.2	40.9 ± 1.1	61.7 ± 2.6	15.2 ± 3.5	-	2125.9 ± 168.4
N4	nd	64.5 ± 7.9	5.9 ± 0.6	226.2 ± 26.5	10.7 ± 1.9	3.9 ± 1.3	31.5 ± 3.8	40.2 ± 5.6	47.8 ± 6.8	61.7 ± 10.4	167.7 ± 20.0	779.3 ± 121.5
	d	65.1 ± 3.6	6.2 ± 0.6	239.1 ± 6.4	16.1 ± 1.8	3.7 ± 1.1	34.4 ± 0.6	44.4 ± 1.3	49.0 ± 1.3	84.7 ± 5.1	182.1 ± 3.6	805.0 ± 42.6
N5	nd_clara	17.3 ± 1.8	10.1 ± 2.1	*	18.7 ± 2.5	24.8 ± 0.3	49.0 ± 2.0	44.4 ± 2.1	67.9 ± 0.9	94.2 ± 12.3	-	509.5 ± 131.3
	nd_escura	10.2 ± 0.5	7.5 ± 1.2	*	11.5 ± 1.1	23.1 ± 1.8	52.9 ± 2.4	42.2 ± 1.7	66.0 ± 2.6	91.1 ± 16.2	-	1347.5 ± 65.2
	d	34.4 ± 23.6	8.4 ± 1.7	*	23.3 ± 8.1	20.0 ± 2.0	52.0 ± 4.2	42.8 ± 0.5	65.3 ± 1.4	84.9 ± 11.4	-	1104.2 ± 483.7
N6	nd	3.0 ± 0.9	25.5 ± 4.9	*	13.0 ± 1.1	7.7 ± 1.2	38.4 ± 0.6	43.2 ± 1.9	60.8 ± 1.6	131.6 ± 4.8	167.4 ± 30.5	3460.7 ± 133.8
	d	26.5 ± 20.1	21.4 ± 2.9	*	14.6 ± 0.1	26.0 ± 4.2	47.5 ± 6.0	40.5 ± 1.2	63.5 ± 1.1	126.3 ± 9.4	175.7 ± 36.9	3703.9 ± 105.8

* valor < 0.1

3.1.6. Pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS)

As impressões digitais dos materiais de origem polimérica são frequentemente obtidas por pirólise (Hacaloglu & Yalcin, 2012). A técnica de pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS) é particularmente importante para o estudo de ésteres de celulose e permite também a detecção de uma ampla gama de aditivos, mesmo em concentrações muito baixas (Schilling *et al.*, 2010).

Esta técnica permite confirmar a presença de acetato de celulose através da detecção de ácidos orgânicos de cadeia curta que se originaram a partir da decomposição pirolítica das cadeias laterais do polímero (Schilling *et al.*, 2010).

As amostras selecionadas para a análise através de Py-GC/MS foram as amostras N1, N4, N5 e N6. Estas amostras foram escolhidas tendo em conta o seu avançado estado de degradação, possibilitando assim a retirada de uma pequena amostra para a análise.

A principal reação de degradação do acetato de celulose é a desacetilação do grupo acetato. Esta reação, acelerada principalmente pela presença de água, leva à substituição dos grupos acetato por grupos hidroxilo formando-se assim ácido acético e seus derivados (Shashoua, 2006).

Os plastificantes são um importante componente dos ésteres de celulose. Através da técnica de Py-GC/MS foi detetado o plastificante trifenilfosfato corroborando os resultados obtidos por MEV-EDS onde se deteta a presença de fósforo em quase todas as análises, em todas as amostras, e por ATR-FT-IR em que o trifenilfosfato por vezes é tão evidente nas áreas degradadas das amostras que mascara a presença de outros compostos.

Na figura 3.21 são apresentados os cromatogramas das quatro amostras e na tabela 3.7 estão indicados os compostos identificados, os respetivos tempos de retenção (Rt) e a sua origem provável, por comparação com a base de dados NIST do software AMDIS

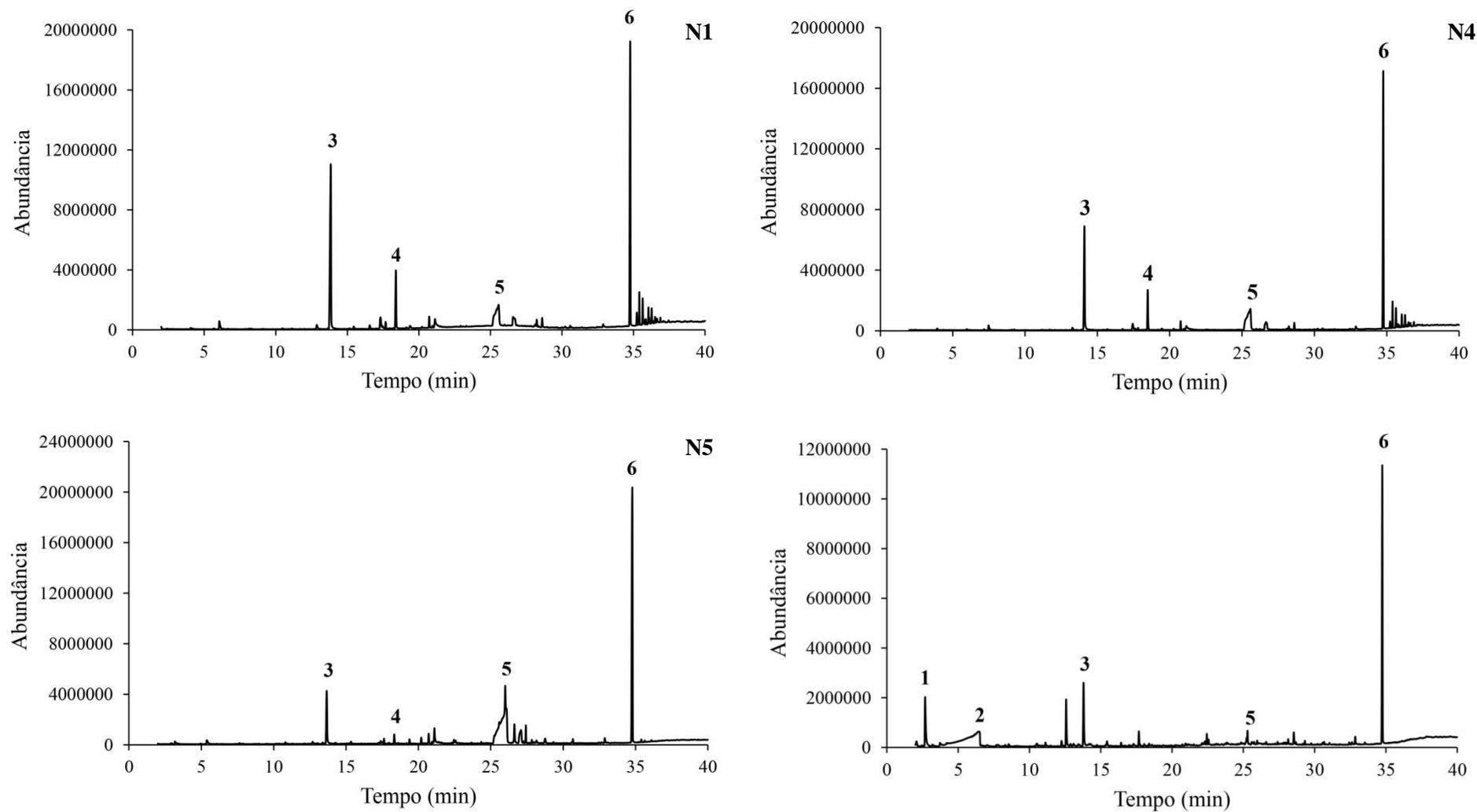


Figura 3.21. Cromatogramas das amostras N1, N4, N5 e N6. Legenda: 1 = anidrido acético; 2 = ácido butanóico; 3 = fenol; 4 = levoglucosanona; 5 = levoglucosano; 6 = trifenilfosfato.

Tabela 3.7. Tempos de retenção (Rt) dos fragmentos obtidos por Py-GC/MS das amostras N1, N4, N5 e N6. (TFF – trifetilfosfato)

Identificação do fragmento	Tempo de retenção (min)				Origem provável
	N1	N4	N5	N6	
Anidrido acético				2.683	Acetato de celulose
4-ciclopentano-1,3-diona	8.957			8.938	Acetato de celulose
5-metil-2(5H)-furanona	11.986			11.968	Acetato de celulose
Fenil éster do ácido acético	16.710			16.703	Acetato de celulose
fenol	13.842	14.100	13.663	13.796	Celulose e acetato de celulose
Ácido butanóico				6.433	Celulose
3-furancarboxaldeído	5.013			5.058	Celulose
2-furancarboxaldeído (furfural)	6.058			6.197	Celulose
2(5H)furanona	10.758		10.383	10.653	Celulose
5-metil-2-furancarboxaldeído	12.866			12.894	Celulose
2-hidroxi-3-metil-2-ciclopentanona	15.452	15.683			Celulose
2-metil-fenol	16.567			16.578	Celulose
3-metil-fenol	17.318	17.442			Celulose
metil éster do ácido furóico	17.470				Celulose
2,6-dimetil-fenol	18.225	18.329			Celulose
levoglucosenona	18.395	18.479	18.330	18.383	Celulose
2,4-dimetil-fenol	19.378	19.433			Celulose
1,4:3,6-dianidro- α -d-glucopiranose	20.723	20.754	20.709	20.726	Celulose
levoglucosano	25.567	25.570	25.255	25.201	Celulose
1,6-anidro- α -d-galactofuranose	26.644	26.655	27.087		Celulose
1-metil-1H-pirrole		3.369			Pirróis – Proteína
3-metil-1H-pirrole	6.658			6.691	Pirróis – Proteína
2-metil-1H-pirrole	7.173			7.215	Pirróis – Proteína
cloreto de trimetilfenilamônio	17.679		17.622	17.676	?
trifenilfosfato	34.766	34.763	34.777	34.752	TFF

Esta técnica permitiu também detetar compostos que indicam a presença de gelatina. Em todas as amostras foram detetados pirróis. Na amostra N4 foi detetado 1-metilpirrole ($R_t = 3.369$ min). Nas amostras N1 e N6 foi detetado o 3-metilpirrole ($R_t = 6.658$ min para N1 e de 6.691 min para N6) e o 2-metilpirrole ($R_t = 7.173$ min para N1 e de 7.215 min para N6). O pirrole é reconhecido como sendo um produto derivado dos aminoácidos hidroxiprolina e glutamina encontrado em proteínas de origem animal (Chiavari *et al.*, 1995; Kebelmann *et al.*, 2013).

Foram identificados em todas as amostras diversos compostos que indicam a presença de celulose entre os quais, fenol, levoglucosenona e levoglucosano (Keheyán, 2008). Na amostra N1 e N6 foi identificado o composto 4-ciclopentano-1,3-diona e nas amostras N1 e N6 foi ainda detetado o composto 5-metil-2(5H)-furanona que confirmam a presença de acetato de celulose (Moldoveanu, 1998). No cromatograma da amostra N6 foi detetado um pico de anidrido acético ($R_t = 2.683$) e um pico de fenil éster do ácido acético que também foi detetado na amostra N1 ($R_t = 16.710$ para N1 e de 16.703 para N6).

Tal como nos resultados obtidos por MEV-EDS, com Py-GC/MS também foi identificado um composto clorado. Nas amostras N1, N5 e N6 foi detetado o composto cloreto de trimetiletílfenilamónio. Na amostra N4 não foram identificados compostos clorados apesar de ter sido detetado cloro nesta amostra por análise EDS. Embora não seja possível estimar com exatidão a origem deste composto, a sua presença entre os produtos de pirólise pode ser devido à utilização de um composto clorado na produção de películas fotográficas.

Na amostra N6 foi ainda detetado ácido butanóico. As propriedades finais de um polímero podem ser modificadas pela adição, à mistura de reação, de ácido butanóico ou ácido propanóico obtendo-se acetato butirato de celulose (CAB) ou acetato propionato de celulose (CAP) respetivamente. Estas modificações tornam o polímero mais resistente. O CAP e o CAB foram introduzidos na indústria de filmes fotográficos, em 1924 e 1935, respetivamente (Schilling *et al.*, 2010).

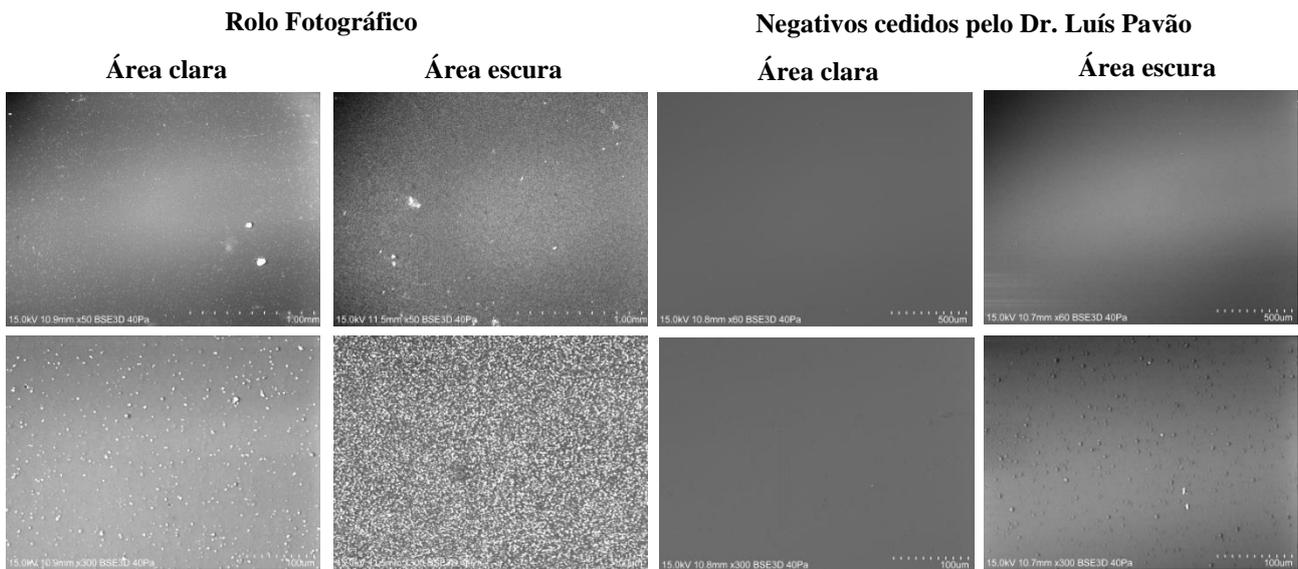
3.2 Caracterização material de negativos contemporâneos usados no estudo microbiológico

Foram selecionados negativos contemporâneos, a preto e branco, de acetato de celulose para serem utilizadas no estudo microbiológico pois necessitou-se de uma matriz não degradada de forma a ser possível avaliar a degradação causada pelos microrganismos. Na cultura dos isolados bacterianos na presença de película fotográfica foram utilizadas amostras provenientes de um rolo fotográfico de acetato de celulose, a preto e branco, Tri X 400 da Kodak, adquirido na loja Colorfoto e posteriormente revelado. Na avaliação da atividade celulolítica das estirpes fúngicas selecionadas utilizou-se quatro amostras de negativos contemporâneos cedidas pelo Dr. Luís Pavão, fundador e gerente da LUPA (Luís Pavão Limitada), empresa especializada em conservação e digitalização de coleções de fotografia. Foram utilizados negativos diferentes no estudo microbiológico pois as amostras provenientes do rolo fotográfico foram insuficientes para todo o estudo.

Neste subcapítulo faz-se a caracterização material dos negativos contemporâneos recorrendo às técnicas analíticas de microscopia eletrónica de varrimento associada a espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR) e por micro-difração de raios-X (μ -DRX) para avaliação da composição química e morfológica e efeitos degradativos induzidos pelos microrganismos.

Na Tabela 3.8 apresentam-se imagens de MEV da superfície das amostras, sob ampliação de 50x/60x e 300x, sendo possível observar que o rolo fotográfico apresenta uma maior dispersão de partículas, visíveis a estas ampliações. Comparando áreas claras e escuras, verifica-se que estas últimas são mais ricas em aglomerados – provavelmente de prata – e que no caso do rolo fotográfico a dimensão das partículas da área escura é muito menor.

Tabela 3.8. Imagens de MEV da superfície das películas fotográficas contemporâneas.



Nas Figs. 3.22 e 3.23 apresentam-se análises composicionais de áreas da superfície das películas onde é possível verificar que em ambas as amostras a sua superfície é constituída maioritariamente por prata.

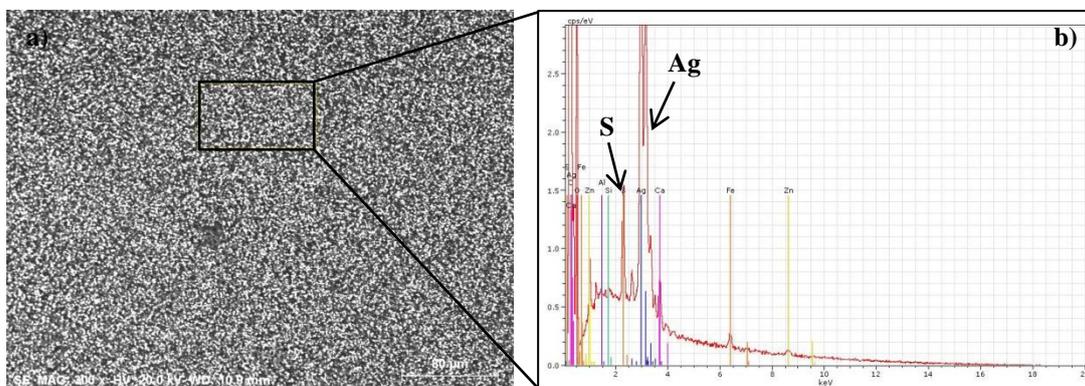


Figura 3.22. a) Imagem de MEV da superfície da película do rolo fotográfico; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a).

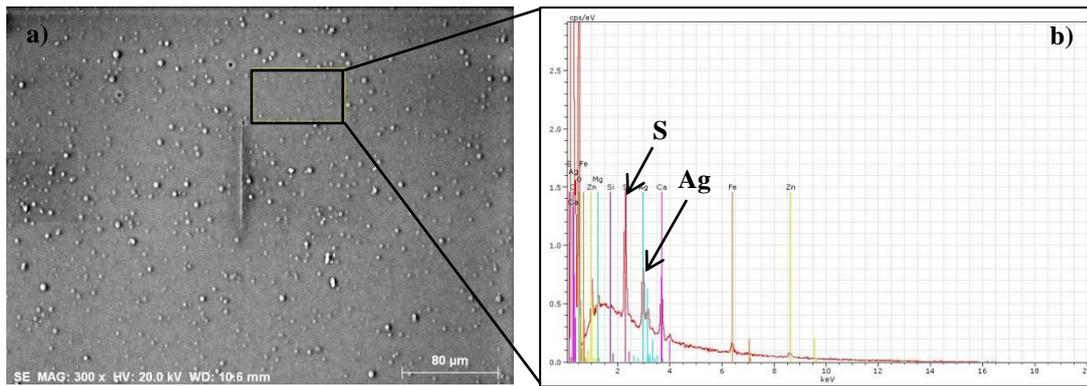


Figura 3.23. a) Imagem de MEV da superfície da película cedida pelo Dr. Luís Pavão; b) análise composicional (EDS) da área indicada em a).

Na fig. 3.24 apresentam-se os espectros de FT-IR obtidos em modo ATR das películas fotográficas contemporâneas. O espectro de FT-IR da película do rolo fotográfico indica que se trata de acetato de celulose (Fig. III.2 do anexo III) apresentando os seus picos característicos a 1745 cm^{-1} , 1368 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} e a 1045 cm^{-1} . Quanto ao espectro de FT-IR da película fotográfica, cedida pelo Dr. Luís Pavão, a presença de gelatina (Fig. III.3 do anexo III) apresentando a 1636 cm^{-1} , 1556 cm^{-1} e a 1455 cm^{-1} os picos que correspondem às bandas da amida I, amida II e à deformação da ligação CH, respetivamente. Para confirmar a natureza do suporte desta película analisou-se uma camada mais interior do negativo denominada “interior”. O espectro desta camada apresenta várias bandas atribuídas ao acetato de celulose confirmando-se assim a sua natureza.

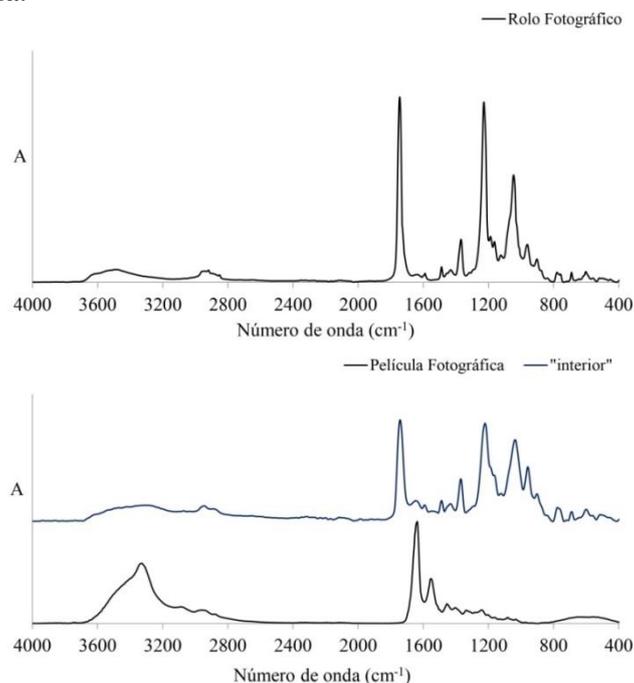


Figura 3.24. Espectros de FT-IR em modo ATR da película do rolo fotográfico e da película cedida pelo Dr. Luís Pavão.

Tendo em conta os resultados de FT-IR verifica-se que o suporte da película cedida pelo Dr. Luís Pavão é de acetato de celulose com emulsão de gelatina enquanto que para o rolo fotográfico apenas é possível afirmar que o suporte é de acetato de celulose. Nesta amostra não foi detetada gelatina provavelmente devido à grande quantidade de prata presente na camada de emulsão, visível nas análises EDS.

A película do rolo fotográfico foi analisada também por μ -DRX. Na Fig. 3.25 apresentam-se os difratogramas desta amostra, traçados numa área clara e numa área escura. Da análise dos difratogramas da amostra e das riscas de difração dos difratogramas do triacetato de celulose e da prata retiradas da base de dados (Tabela IV.1 do anexo IV) observa-se, em ambas as áreas, para valores de ângulo inferior a $30^\circ 2\theta$ contribuições do que parece ser devido ao triacetato de celulose (TAC) que confirma assim a constituição da camada de suporte deste negativo. Contribuição para valores superiores a $30^\circ 2\theta$ é devido à presença de prata metálica, detetada apenas na área escura o que está de acordo com o facto de que nesta área os sais de prata presentes na emulsão ao serem expostos à luz formam uma imagem latente, ou seja, invisível que ao ser submetida ao processo de revelação se vai tornar visível através da redução dos sais de prata em prata metálica (Ciliberto *et al.*, 2013; Langford, 1996).

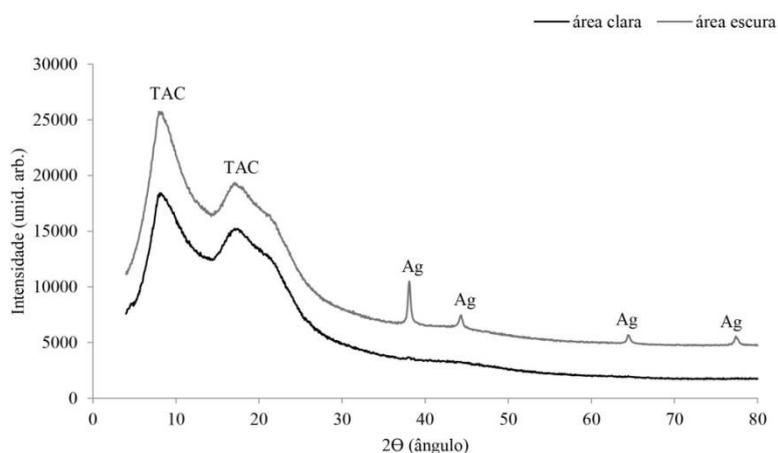


Figura 3.25. Difratogramas da película do rolo fotográfico, a preto e branco, da Kodak.

A análise das películas fotográficas contemporâneas por microscopia eletrónica de varrimento associada a espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IT) e por micro-difração de raios-X (μ -DRX) permitiu confirmar que o suporte das amostras é de acetato de celulose e a existência de emulsão de gelatina pelo menos na película cedida pelo Dr. Luís Pavão.

3.3 Caracterização microbiológica de negativos antigos

3.3.1. Identificação dos isolados bacterianos

Os negativos fotográficos antigos em estudo apresentaram sinais de contaminação biológica. As análises microbiológicas foram realizadas em áreas visivelmente degradadas e isolaram-se seis estirpes bacterianas. Cinco estirpes foram caracterizadas como cocos gram positivos e uma como bacilo gram negativo, o que sugere que estes microrganismos possam estar envolvidos nos processos de degradação dos negativos.

Borrego e colaboradores (2010) efetuaram um estudo de avaliação da qualidade do ar em arquivos fotográficos e estudaram a sua relação com a biodeterioração de fotografias/negativos estando patente a influencia dos microrganismos nestes processos de degradação de películas fotográficas celulósicas, mas também nouro tipo de películas nomeadamente cinematográficas (Abrusci *et al*, 2005) cinematográficas. De facto, as células vegetativas ou esporos de bactérias formadoras de endósporos são contaminantes comuns em ambientes interiores e podem colonizar as camadas que contêm gelatina durante o processo de produção.

3.3.1.1. Cultura dos isolados bacterianos na presença de matriz de película fotográfica contemporânea

Para verificar se as bactérias isoladas das amostras têm capacidade de degradar películas fotográficas montou-se um ensaio, descrito no capítulo 2, com o objetivo de avaliar se os isolados bacterianos teriam capacidade de crescer num meio contendo estas películas.

Na Fig. 3.26. apresentam-se as curvas de crescimento obtidas para cada um dos isolados bacterianos, designados por N1-A, N1-B, N2, N3, N3-A e por N3-B, durante 10 horas de cultura.

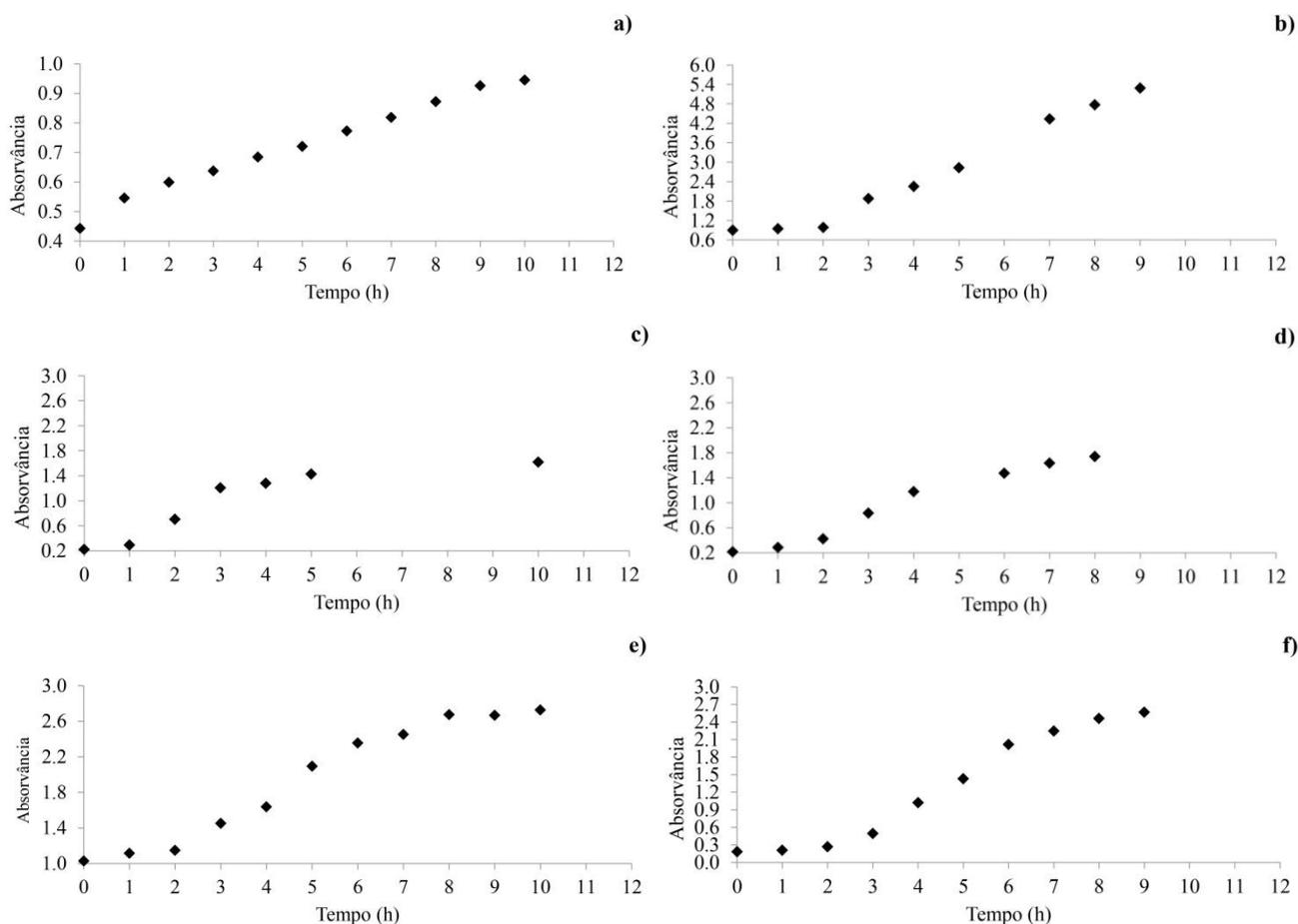


Figura 3.26. Perfil de crescimento dos isolados bacterianos N1-A a N3-B durante 10h em meio de cultura líquido *Nutrient Broth* enriquecido com glicose. Legenda: a) N1-A; b) N1-B; c) N2; d) N3; e) N3-A e f) N3-B.

A partir das curvas de crescimento calculou-se a taxa específica de crescimento (Tabela 3.9). Os valores da taxa específica de crescimento variam entre 0.05 h^{-1} e 0.39 h^{-1} o que corresponde a tempos de duplicação que variam entre 2h a 12h. Dos seis isolados bacterianos, o isolado N3-B é o que apresenta uma taxa específica de crescimento maior (Tabela 3.9), o que significa que este microrganismo possui uma maior capacidade de crescer na presença de película fotográfica em comparação com os restantes isolados evidenciando um maior potencial efeito biodeteriorígeno.

Apesar da presença de compostos potencialmente tóxicos presentes nos negativos, como a prata e os compostos utilizados na revelação, as bactérias isoladas conseguem crescer nestes suportes, o que pode revelar a sua adaptação a estes ambientes, com capacidade de proliferação e consequente alteração dos suportes fotográficos. Os isolados N3 e N3-B foram os que manifestaram maior potencial de

crescimento, e os isolados N1-A e N3-A foram os que revelaram menor potencial de crescimento, na presença das matrizes fotográficas.

Tabela 3.9. Taxa específica de crescimento e tempo de duplicação dos isolados bacterianos.

	Taxa específica de crescimento (h^{-1})	Tempo de duplicação (h)
N1-A	0.05	11.69
N1-B	0.18	3.54
N2	0.21	2.91
N3	0.24	3.28
N3-A	0.14	5.20
N3-B	0.39	1.75

As películas fotográficas utilizadas no ensaio anterior foram caracterizadas por FT-IR em função do tempo de cultura. A Fig. 3.27 apresenta os espectros de FT-IR em modo ATR obtidos para as películas fotográficas para a cultura do isolado N3-B. O espectro da matriz inicial (Fig. 3.27-a) e os espectros dos diferentes períodos de cultura assemelham-se ao espectro do acetato de celulose, apresentando as bandas características a 1745 cm^{-1} , 1368 cm^{-1} , 1228 cm^{-1} e a 1045 cm^{-1} . Os espectros das películas retiradas ao longo da cultura (Fig. 3.27-b a 3.27-e) apresentam ainda uma banda aos 1636 cm^{-1} , compatível com a amida I, uma das bandas características das proteínas. Ao observar os espectros obtidos verifica-se uma diminuição da banda relativa ao acetato de celulose em função do tempo de cultura e a banda da amida I, surge nas primeiras 24 horas do ensaio e vai diminuindo de intensidade ao longo do tempo.

Este comportamento foi também observado nas películas retiradas das culturas dos restantes isolados bacterianos (Anexo V).

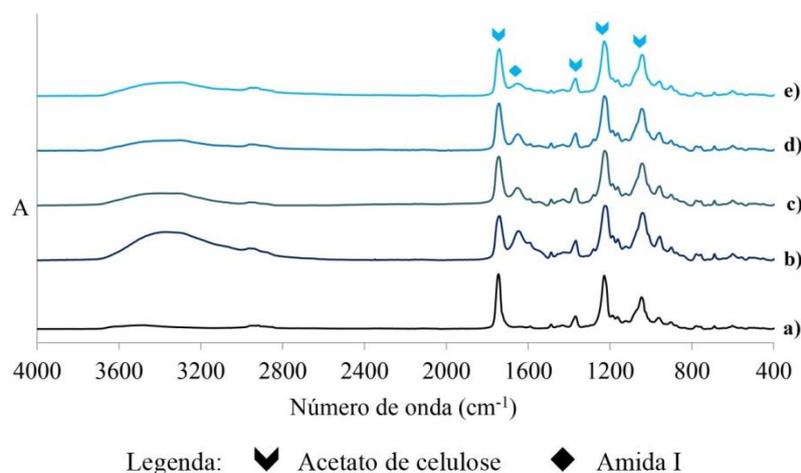


Figura 3.27. Espectros de FT-IR em modo ATR das películas fotográficas retiradas das culturas de N3-B. Legenda: a) Espectro da película antes do ensaio iniciar (0 horas); b) a e) espectros das películas retiradas das culturas ao fim de 24h, 48h, 72h e 240h respetivamente.

Estes resultados demonstram uma evolução na composição da película em presença das células bacterianas comprovando a sua potencialidade para interação com estas matrizes celulósicas o que mais uma vez evidencia o potencial biodeteriorogénico destas estirpes.

3.3.2. Avaliação do potencial biodeteriorogénico de fungos filamentosos

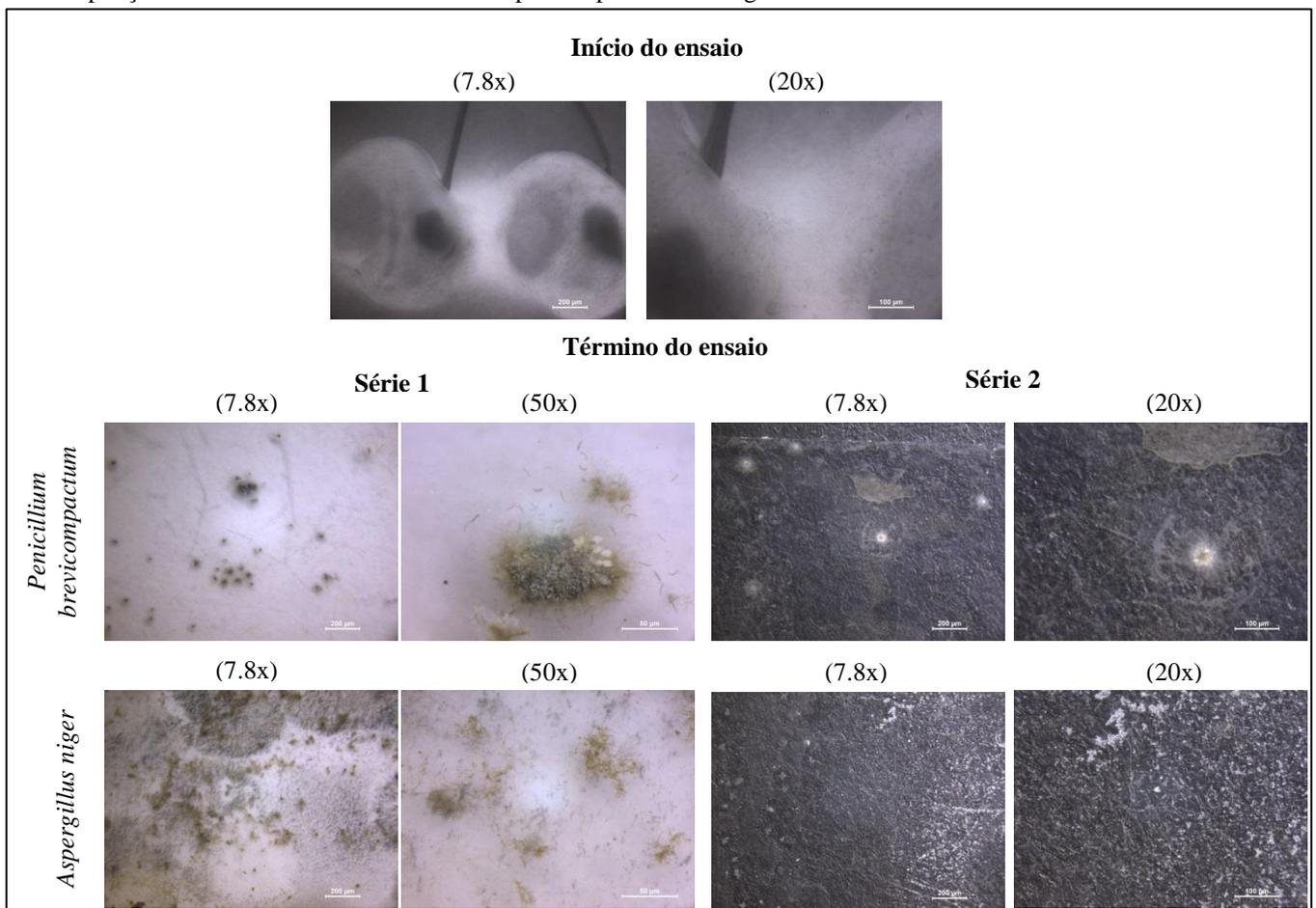
Nas amostras históricas não foram isoladas estirpes fúngicas contudo a bibliografia refere os fungos como microrganismos com potencial biodeteriorogénico. Borrego *et al* (2010) e Abrusci *et al* (2005) referem que os géneros mais frequentemente isolados de películas fotográficas são *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Outros fungos também presentes são associados aos géneros *Cladosporium*, *Mucor*, *Trichoderma* e *Phoma* (Abrusci *et al.*,2005).

A degradação de materiais fotográficos por fungos pode afetar a integridade do material devido à penetração das hifas do fungo no substrato. Os danos podem também ocorrer como resultado da ação enzimática. Os fungos podem produzir diversas enzimas como proteases e celulasas, capazes de destruir todos os componentes das películas desde a gelatina ao suporte. À presença dos fungos são também atribuídas alterações cromáticas tais como manchas de diferentes cores, tonalidades e texturas e ainda, devido ao crescimento micelar e à produção de pigmentos, pode ocorrer perda de nitidez da imagem (Sclocchi *et al.*, 2013; Borrego *et al.*, 2010). Lourenço & Sampaio (2009) e Abrusci e colaboradores (2005) induziram a contaminação de fotografias com emulsão de gelatina tendo verificado o crescimento dos fungos. Segundo este último autor o crescimento de bactérias e fungos geralmente pode ser observado no lado da emulsão como manchas irregulares e sem brilho. Os microrganismos podem degradar a emulsão até ao ponto de a tornar inutilizável.

Uma explicação possível para o facto de não terem sido isoladas estirpes fúngicas nas espécies fotográficas antigas em estudo pode dever-se à utilização de soluções de formaldeído (CH₂O), reconhecido antifúngico (Lourenço & Sampaio, 2009). Este composto é utilizado como endurecedor da gelatina, na produção de películas a preto e branco. Assim, para este trabalho, selecionaram-se duas estirpes de fungos filamentosos pertencentes a géneros reconhecidamente envolvidos na biodegradação das películas fotográficas: *Aspergillus niger* e *Penicillium*

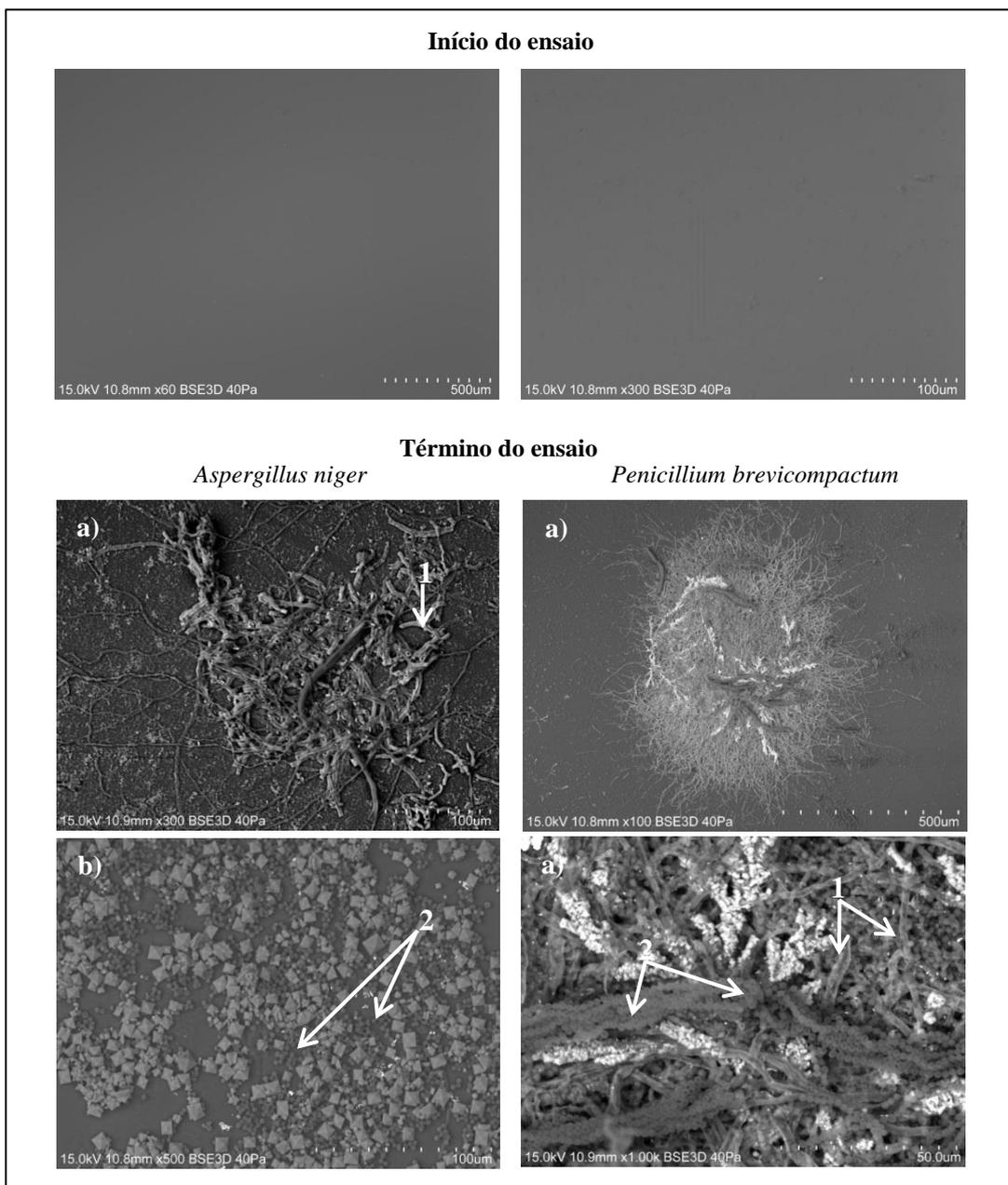
brevicompactum (FC13B) da coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia (HERCULES-Laboratório de Biotecnologia, Universidade de Évora) e utilizou-se ainda uma estirpe de *Trichoderma harzianum* (CCMI 783), produtora de enzimas celulolíticas, que funcionou como controlo positivo. Efetuaram-se culturas destes microrganismos na presença de matriz de película fotográfica contemporânea, como referido no capítulo 2. O meio de cultura utilizado no ensaio de controlo contém 10g/L de carboximetilcelulose que funciona como fonte de celulose para as estirpes fúngicas. Adicionalmente fizeram-se duas séries de ensaios utilizando o mesmo meio de cultura onde se substituiu a carboximetilcelulose por matriz fotográfica celulósica ou, na segunda série por película fotográfica e 2,5 g/L de carboximetilcelulose. Na Tabela 3.10 apresentam-se as imagens da película fotográfica, obtidas com a lupa binocular, antes do ensaio iniciar e após o seu término (sete dias). É possível verificar que as estirpes fúngicas utilizadas têm capacidade para proliferar utilizando esta matriz como substrato, o que é evidenciado pela presença de hifas e micélio nas duas séries de ensaios, para ambos os fungos.

Tabela 3.10. Imagens da superfície das películas fotográficas contemporâneas obtidas com lupa binocular. A ampliação utilizada encontra-se indicada na parte superior das imagens.



As películas fotográficas utilizadas neste ensaio foram caracterizadas por MEV-EDS e por ATR-FT-IR antes do ensaio decorrer e depois deste terminar para avaliar a ação dos microrganismos. Na Tabela 3.11 apresentam-se imagens de MEV da película retirada das culturas. A matriz fotográfica encontra-se visivelmente alterada sendo possível notar-se uma irregularidade superficial, e a presença de hifas e de esporos fúngicos, o que confirma a capacidade destas estirpes para crescerem neste material.

Tabela 3.11. Imagens de MEV da superfície das películas fotográficas; a) película retirada do meio 1; b) película retirada do meio 2; 1) e 2) as setas assinalam a presença de hifas e de esporos fúngicos, respetivamente.



Na Fig. 3.28 apresentam-se os espectros de FT-IR obtidos em modo ATR da película fotográfica contemporânea retirada dos meios 1 e 2. Na Fig. 3.28 (a) apresenta-se o espectro da película antes do ensaio iniciar e verifica-se que é semelhante ao espectro da gelatina. Nas Figs. 3.28 (b) e (c) apresentam-se os espectros das películas depois de terem estado em contacto com as estirpes fúngicas selecionadas, nos meios 1 e 2, respetivamente. A análise das películas mostrou que para ambos os meios e para as três estirpes fúngicas, a banda da gelatina (1636 cm^{-1}), identificada na película antes do ensaio começar, diminuí. Observa-se ainda o aparecimento de uma nova banda (1749 cm^{-1}) que não é visível nas películas no início do ensaio. Esta banda pode ser atribuída ao acetato de celulose presente no suporte, evidenciando a degradação da camada de gelatina e o aparecimento da camada mais interna da matriz, constituída por acetato de celulose. No espectro da película fotográfica retirada da cultura de *Aspergillus niger* com o meio sem carboximetilcelulose (meio 1) verifica-se uma maior diminuição da banda do acetato de celulose, sugerindo que nestes ensaios esta estirpe possa conduzir a maiores danos na estrutura das películas fotográficas. A fonte de carbono disponível para o crescimento das culturas neste caso provém unicamente do suporte da película fotográfica, daí, possivelmente, a maior extensão dos danos. Por outro lado estes resultados evidenciam o grande potencial biodeteriogénico destes microrganismos.

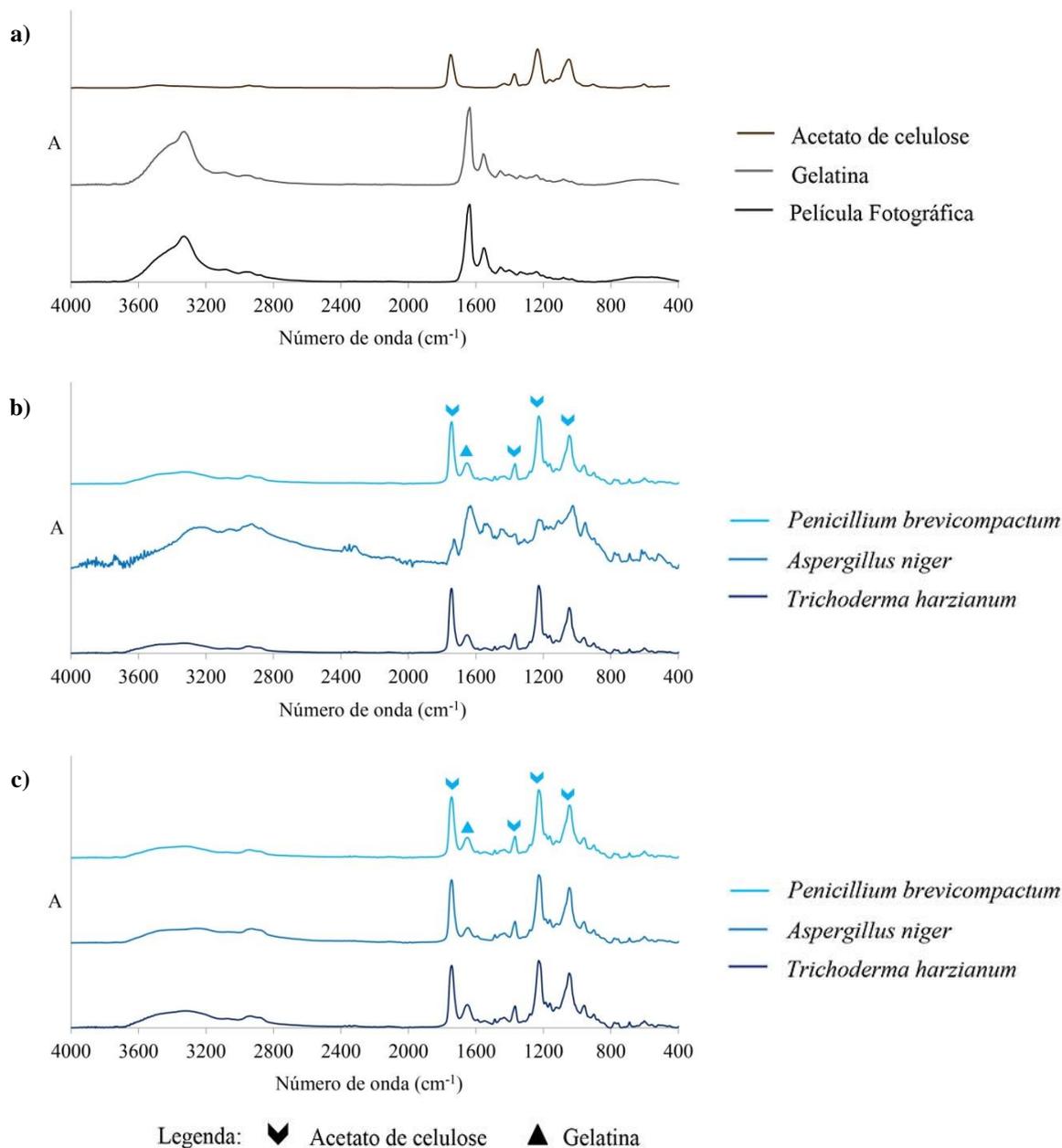


Figura 3.28. a) Espectros de FT-IR em modo ATR das películas contemporâneas utilizadas no ensaio antes deste iniciar, da gelatina e do acetato celulose; b) e c) espectros das películas retiradas do meio 1 e 2, respectivamente.

Tendo em conta os resultados obtidos, efetuaram-se ensaios de atividade celulolítica. Na Fig. 3.29 são apresentados os resultados desta atividade enzimática nos três meios. Os resultados mostram que existem diferenças significativas de atividade entre os diferentes meios ($p < 0.05$) (Anexo V). Foi no meio 3 que se verificou maior produção de enzimas celulolíticos por parte das três estirpes fúngicas selecionadas. No

meio sem carboximetilcelulose (meio 1) a produção de celulases por parte das três estirpes fúngicas foi menor do que nos outros meios.

A produção de celulases por parte de *Penicillium brevicompactum*, no meio 1, mantém-se constante ao longo das 168 h do ensaio enquanto que nos ensaios efetuados com os meios 2 e 3 se verifica um aumento da atividade a partir das 48 h havendo depois, às 168 h, uma diminuição da produção dos enzimas nestes meios.

A atividade específica do enzima celulase produzido na cultura de *Aspergillus niger* contendo o meio 1 e 2 foi cerca de 0.006 U/mg ao longo da cultura enquanto que no meio 3 se verifica um aumento da atividade específica do enzima às 48h para cerca de 0.016 U/mg que se mantém constante até o ensaio terminar. As culturas de *Aspergillus niger* no meio 1 correspondem a culturas em que a fonte de celulose é resultante da película fotográfica. O crescimento das células neste meio e os valores da atividade celulolítica obtidos nas culturas demonstram a capacidade destas células para crescerem nestas condições.

A produção de celulases por parte da estirpe *Trichoderma harzianum*, utilizada como controlo, é crescente do meio 1 para o meio 3 mas mantém-se constante, nos três meios, ao longo do ensaio.

Comparando a atividade específica entre os meios 2 e 3, verifica-se que a atividade da estirpe *Penicillium brevicompactum* no meio 3 é, em média, 63% superior à do meio 2 enquanto que as restantes estirpes apresentam um aumento, em média, de 55 %. Entre os meios 1 e 2, é na estirpe *Trichoderma harzianum* que se verifica um aumento maior da atividade celulolítica específica do meio 1 para o meio 2 de cerca de 47%, enquanto que na cultura de *Penicillium brevicompactum* também se verifica um aumento de cerca de 16%. A estirpe *Aspergillus niger*, nestes meios, mantém constante a sua atividade.

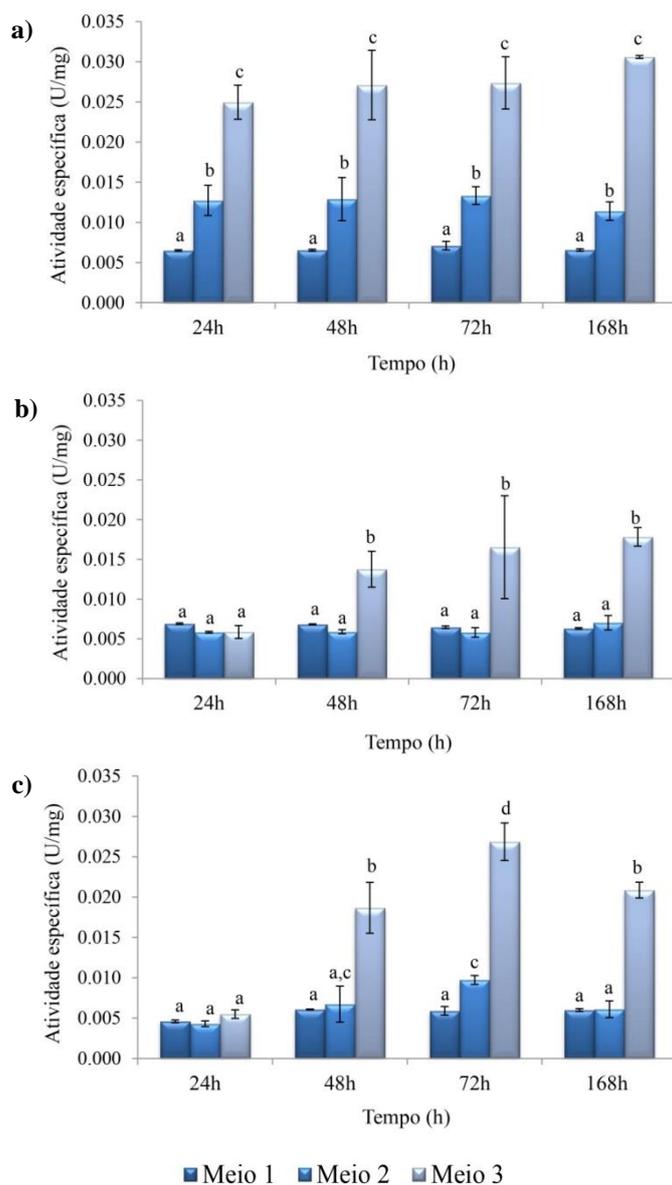


Figura 3.29. Atividade celulolítica de culturas em meio Mandels com diferentes quantidades de carboximetilcelulose; a) *Trichoderma harzianum*; b) *Aspergillus niger*; c) *Penicillium brevicompactum*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Os resultados obtidos permitem concluir que as estirpes fúngicas selecionadas conseguem crescer nesta matriz e utilizar a celulose nela presente, sendo o *Aspergillus niger*, das três estirpes selecionadas, o fungo que consegue utilizar melhor a matriz como substrato e por conseguinte aquele que danos mais severos pode causar nas películas fotográficas.

**Comentários finais e
perspetivas futuras**

Este trabalho consistiu na caracterização material de seis negativos, denominados N1 a N6, pertencentes à coleção privada do fotógrafo Ramiro Martins de Almeida, datados provavelmente de meados do século XX. A seleção das amostras teve como critério diferentes estados de degradação visíveis a olho nu. Foi realizado também o estudo microbiológico das amostras N1, N2 e N3.

Na caracterização material recorreu-se a seis técnicas de análise não destrutiva como a fotografia, a microscopia ótica, a microscopia eletrônica de varrimento associada a espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS), a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR), a espectroscopia de fluorescência de raios-X (FRX) e a micro-difração de raios-X (μ -DRX). Foi utilizada também uma técnica de análise destrutiva, a pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS).

A fotografia e a microscopia ótica permitiram obter imagens mais pormenorizadas da superfície das amostras sendo possível visualizar a formação de bolhas, canais e aglomerados de cristais em consequência do *síndrome do vinagre*.

A microscopia eletrônica de varrimento acoplada a espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (MEV-EDS) permitiu a análise morfológica e a caracterização química composicional das amostras históricas. Nas áreas não degradadas de todas as amostras deteta-se fósforo proveniente da utilização de trifetilfosfato, adicionado ao suporte para melhorar a resistência da película à humidade e para diminuir o risco e a velocidade de combustão (Ciliberto *et al.*, 2013; Schilling *et al.*, 2010). A presença de fósforo na superfície destas áreas sugere que apesar de a olho nu não serem visíveis sinais de degradação, estas encontram-se num estado inicial de degradação pois ocorreu a libertação de trifetilfosfato do suporte devido ao seu encurtamento em consequência da perda de grupos acetato da cadeia principal do polímero. Apenas na amostra N1 se deteta o elemento prata, presente na camada de emulsão dos negativos como sais de prata, utilizados na formação da imagem. Nas áreas degradadas de todas as amostras deteta-se fósforo, detetando-se também cloro nas amostras N1, N4 e N6. O cloro é proveniente de um composto clorado que embora não se possa afirmar qual a sua origem sabe-se que possivelmente foi utilizado como retardador de chama. A prata só foi detetada nas áreas degradadas das amostras N1 e N6.

A análise das amostras por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) em modo de reflexão total atenuada (ATR) forneceu informação

complementar à análise por EDS sobre a composição química das amostras. Os espectros obtidos nas áreas não degradadas de todas as amostras assemelham-se ao espectro da gelatina indicando de que é constituída a camada de emulsão enquanto que nas áreas degradadas das amostras é detetado o plastificante trifenilfosfato o que vai de encontro aos resultados obtidos por MEV-EDS. Como a amostra N1 se encontra muito degradada, foi possível retirar uma parte das camadas externas e obter um espectro da parte interior do negativo onde se observou a presença de várias bandas que foram atribuídas ao acetato de celulose, nomeadamente, a banda aos 1733 cm^{-1} devida ao estiramento da ligação C=O do grupo éster, a banda a 1237 cm^{-1} devida ao estiramento assimétrico da ligação O-C-C do grupo éster, a banda a 1068 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico da ligação O-C-C ligada ao carbono do grupo carbonilo e a banda localizada na região de 1372 cm^{-1} atribuída ao grupo metilo do acetato de celulose.

A análise das amostras por micro-difração de raios-X (μ -DRX) permitiu verificar que as amostras N1, N2, N4 e N5 apresentam um comportamento semelhante para as suas áreas degradadas e não degradadas sendo visível, nas primeiras, a presença de trifenilfosfato (TFF) cristalino e prata metálica. No difratograma da amostra N3, para valores de ângulo inferior a $30^\circ 2\theta$ observam-se as contribuições do que parece ser devido ao triacetato de celulose, embora esta atribuição deva ser cuidadosa uma vez que o grau de substituição do polímero que constitui o suporte é desconhecido e difícil de determinar e para valores superiores a $30^\circ 2\theta$ observa-se a contribuição devido à presença de prata metálica.

A espectroscopia de fluorescência de raios-X (FRX) permitiu detetar os elementos P, S, Cl, Ca, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Br e Ag, em áreas degradadas e não degradadas. O fósforo, o cloro e a prata, também detetados por análise EDS, correspondem ao plastificante trifenilfosfato, ao composto clorado e aos sais de prata presentes na camada de emulsão. Nas amostras N4, N2 e N6 foi detetado o elemento bromo sugerindo que as partículas fotossensíveis presentes na camada de emulsão são sais de brometo de prata.

Os resultados obtidos por MEV-EDS, ATR-FT-IR, μ -DRX e FRX sugerem que o trifenilfosfato está presente em maior quantidade nas áreas degradadas das amostras do que nas áreas não degradadas.

A análise das amostras N1, N4, N5 e N6 por pirólise seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (Py-GC/MS) confirmou os resultados

obtidos pelas técnicas anteriormente referidas detetando-se o composto trifenilfosfato e fragmentos de pirrole que se encontra presente em proteínas de origem animal como é o caso da gelatina. A presença de fragmentos de anidrido acético, 5-metil-2(5H)-furanona e de fenil éster do ácido acético confirmam a natureza do suporte das películas em estudo. Tal como nos resultados obtidos por MEV-EDS, com Py-GC/MS também foi identificado um composto clorado. Nas amostras N1, N5 e N6 foi detetado o composto cloreto de trimetiletilfenilamónio. Na amostra N4 não foram identificados compostos clorados apesar de ter sido detetado cloro nesta amostra por análise EDS.

O estudo microbiológico dos negativos fotográficos N1, N2 e N3 permitiu o isolamento de seis estirpes de bactérias. Foi avaliada também a capacidade destes isolados degradarem os negativos e de crescerem na presença de compostos potencialmente tóxicos neles presentes como a prata e os compostos utilizados na revelação, concluindo-se que todos os isolados conseguem crescer nestas condições revelando um potencial biodeteriogénico para este tipo de materiais.

Procedeu-se também à avaliação do potencial biodeteriogénico dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium brevicompactum* através da verificação da capacidade destas estirpes de degradar as películas fotográficas através da produção de enzimas celulolíticas. Para termos de comparação incluiu-se neste estudo uma estirpe de *Trichoderma* com atividade celulolítica conhecida que funcionou como controlo positivo. Nesta avaliação utilizou-se o meio Mandels com diferentes quantidades de carboximetilcelulose. Recorreu-se à validação estatística dos resultados enzimáticos e a partir da análise de variância (ANOVA) pode-se concluir que existem diferenças significativas entre os meios ($p < 0.05$). As estirpes fúngicas selecionadas têm capacidade para proliferar nas películas fotográficas e de degradar o acetato de celulose presente na camada de suporte, sendo que o *Aspergillus niger* é aquele que consegue utilizar melhor a matriz como substrato e, por conseguinte, aquele que demonstra maior potencial biodeteriogénico.

Perspetivas futuras

- Realização de mais estudos microbiológicos de forma a compreender melhor quais os mecanismos utilizados pelos fungos e bactérias para degradar os negativos.
- Sequenciação do DNA das seis estirpes bacterianas para identificação até à espécie de forma a perceber se os negativos foram colonizados por uma ou mais espécies diferentes.
- Na caracterização material dos negativos, realização de estudos de μ -FT-IR (*imaging*) para compreender melhor a distribuição da gelatina na superfície dos negativos e identificar o composto clorado presente nas amostras

Referências bibliográficas

- Abrusci, C.; Marquina, D.; Santos, A.; Del Amo, A.; Corrales, T.; Catalina, F. (2009). *Biodeterioration of cinematographic cellulose triacetate by Sphingomonas paucimobilis using indirect impedance and chemiluminescence techniques*. International Biodeterioration & Biodegradation **63**, 759–764.
- Abrusci, C.; Martín-González, A.; Del Amo, A.; Corrales, T.; Catalina, F. (2004). *Biodegradation of type-B gelatine by bacteria isolated from cinematographic films. A viscometric study*. Polymer Degradation and Stability **86**, 283 – 291.
- Albers, A.; Melchiades, F.; Machado, R.; Baldo, J.; Boschi, A. (2002). *Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X*. Cerâmica **48**, 305, 34-37.
- Almeida, P.; Lannes, S.; Calarge, F.; Farias, T.; Santana, J. 2012. *FTIR characterization of gelatin from chicken feet*. Journal of Chemistry and Chemical Engineering **6**, 1029 – 1032.
- Araújo, J. (2007). *Microscopia fotônica*. Departamento de Biologia, Universidade de Évora. Consultado a 1 de Setembro de 2014 em <<http://www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/mftecnicas.htm>>
- Barth, A. (2007). *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochimica et Biophysica Acta **1767**, 1073–1101.
- Bittencourt, S. (2008). *Microscópio de luz*. Laboratório de neurofisiologia. Universidade Federal de São Paulo. Consultado a 1 de Setembro de 2013 em <<http://www.neurofisiologia.unifesp.br/microscopiodeluz.htm>>
- Blanton, T. (2003). *Applications of X-ray diffraction in the imaging industry*. Advances in X-Ray Analysis **46**, 297-306.
- Borrego, S.; Guiamet, P.; Saravia, S.; Batistini, P.; Garcia, M.; Lavin, P.; Perdomo, I. (2010). *The quality of air at archives and the biodeterioration of photographs*. International Biodeterioration & Biodegradation **64**, 139-145.

BRUKER (2011). *Attenuated Total Reflection (ATR) – a versatile tool for FT-IR spectroscopy*. Consultado a 16 de Setembro de 2014 em http://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-IR/ALPHA/AN/AN79_ATR-Basics_EN.pdf

Carvalho, A. (2006). *História da Fotografia*. Consultado a 27 de Agosto de 2014 em <http://achfoto.com.sapo.pt/hf_6-2.html>

Castro, A.; Jr., N. (2010). *Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais*. *Química Nova* **33**, 1, 181-188.

Chiavari, G.; Fabbri, D.; Galletti, G.C.; Mazzeo, R. (1995). *Use of analytical pyrolysis to characterize egyptian painting layers*. *Chromatographia* **40**, 9/10, 594 – 600.

Chiavari, G.; Prati, S. (2003). *Analytical pyrolysis as diagnostic tool in the investigation of works of art*. *Chromatographia* **58**, 543–554.

Ciliberto, E.; Gemmellaro, P.; Iannuso, V.; La Delfa, S.; Urso, R.; Viscuso, U. (2013). *Characterization and weathering of motion picture films with support of cellulose nitrate, cellulose acetate and polyester*. *Procedia Chemistry* **8**, 175 – 184.

Cudell, A.; Veiga, R.; Van Oosten, T.; Laganá, A.; Van Keulen, H.; Venade, I. 2011. *Strategies for the conservation of cellulose acetate artworks – a case study of two plastic books*. In International council of museums - committee for conservation, 16^a Ed, 1-8. Lisboa, Portugal.

Dedavid, B; Gomes, C; Machado, G. (2007). *Microscopia electrónica de varredura - Aplicações e preparação de amostras*. Edipucrs, Porto Alegre.

Du, Z.; Hu, B.; Ma, X.; Cheng, Y.; Liu, Y.; Lin, X.; Wan, Y.; Lei, H.; Chen, P.; Ruan, R. (2013). *Catalytic pyrolysis of microalgae and their three major components: carbohydrates, proteins, and lipids*. *Bioresource Technology* **130**, 777 – 782.

Epp, D. 1995. *A World of Color: Investigating the Chemistry of Vat Dyes*. *Journal of Chemical Education* **72**, 726-727.

Ferreti, M. (2008). *Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais*. Revista CPC, n. 7, 74-98.

Ghose, T. (1987). *Measurement of cellulase activities*. Pure and Applied Chemistry **59**, 2, 257-268.

Gottschalk, L.; Oliveira, R.; Silva Bom, E. (2010). *Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by Trichoderma and Aspergillus act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse*. Biochemical Engineering Journal **51**, 72–78.

Hacaloglu, J.; Yalcin, T. (2012). *Mass Spectroscopy in Polymer Research*, in Mass Spectrometry Handbook (ed M. S. Lee), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.

Harrel, T. (2003). *Da pintura rupreste à fotografia*. Consultado a 27 de Agosto de 2014 em < <http://www.tharrell.prof.ufu.br/pdfs/A%20Fotografia%20Cap.%20I.pdf>>

Horvath, D. (1987). *The acetate negative survey - Final Report, environment survey of the photographic negative storage and sorting area*. University of Louisville, Ekstrom Library.

Image Permanence Institute (2001). *User's guide for AD-Strips film base deterioration monitors*. Rochester Institute of Technology, Rochester, NY, USA.

Jamison, J. (2004). *A survey of photographic negative collections from 1925-1950: some results and observations*. Topics in Photographic Preservation **10**, 1 – 16.

Kanemitsu, K.; Nishino, T.; Kunishima, H.; Okamura, N.; Takemura, H.; Yamamoto, H.; Kaku, M. (2001). *Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci*. Journal of Microbiological Methods **47**, 11–16.

Kebelmann, K.; Hornung, A.; Karsten, U.; Griffiths, G. (2013). *Intermediate pyrolysis and product identification by TGA and Py-GC/MS of green microalgae and their extracted protein and lipid components*. Biomass and Bioenergy **49**, 38 – 48.

Keheyán, Y. (2008). *Py/GC/MS analyses of historical papers*. *Bioresources* **3**(3), 829-837.

Langford, M. (1996). *Fotografia Básica*. 4ª Edição, Dinalivro, Lisboa, Portugal.

Leal, A.; Henriques, C.; Luna, A. (2007). *Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por espectrofotometria UV-VIS*. *Revista Analytica* **32**, 28-35.

Littlejohn, D., Pethrick, R., Quye, A., Ballany, J. 2013. *Investigation of the degradation of cellulose acetate museum artefacts*. *Polymer Degradation and Stability* **98**, 416 – 424.

Lourenço, M.; Sampaio, J. (2009). *Microbial deterioration of gelatin emulsion photographs: Differences of susceptibility between black and white and colour materials*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**, 496–502.

Lucena, M.; Alencar, A.; Mazzeto, S.; Soares, S. (2003). *The effect of additives on the thermal degradation of cellulose acetate*. *Polymer Degradation and Stability* **80**, 149–155.

Lynd, L.; Weimer, P.; Zyl, W.; Pretorius, I. (2002). *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. *Microbiology and Molecular Reviews* **66**, 3, 506–577.

Madigan, M.; Martinko, J.; Dunlap, P.; Clark, D. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12ª Edição, Artmed, Porto Alegre, Brasil.

Manso, M.; Carvalho, M. (2009). *Application of spectroscopic techniques for the study of paper documents: A survey*. *Spectrochimica Acta Part B* **64**, 482-490.

Matovic, M. (2013). *Biomass now - cultivation and utilization*. 1ª Edição, InTech, Croácia.

Na, N.; Ouyang, Q.; Ma, H.; Ouyang, J.; Li, Y. (2004). *Non-destructive and in situ identification of rice paper, seals and pigments by FT-IR and XRD spectroscopy*. *Talanta* **64**, 1000–1008.

Pavão, L. (2001). *Conservación de colecciones de fotografía*. 1ª Edição, Cuadernos Técnicos, Junta de Andalucía. Consejería de Cultura. Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico y Editorial Comares, Granada, Espanha.

Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; Rubia, T.; Martínez, J. (2002). *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview*. *International Microbiology* **5**, 53–63.

Pineda, A.; Cruz, L. (2008). *Espectroscopia de IV-ATR*. Consultado a 3 de Setembro de 2014, <http://www.cciqs.uaemex.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=113&Itemid=96 >

Pinzari, F.; Pasquariello, G.; De Mico, A. (2006). *Biodeterioration of paper: A SEM study of fungal spoilage reproduced under controlled conditions*. *Macromolecular Symposia* **238**, 57 – 66.

Poole, F. (1999). *Basic strategies for film preservation in libraries*. *Technical Services Quarterly* **16**,4, 1-10.

Reilly, J. (1993). *IPI storage guide for acetate film*. Image Permanence Institute, Nova Iorque, EUA.

Richardson, E.; Giachet, M.; Schilling, M.; Learner, T. (2014). *Assessing the physical stability of archival cellulose acetate films by monitoring plasticizer loss*. *Polymer Degradation and Stability* **107**, 231-236.

Rocha, F.; Teixeira, L. (2004). *Estratégias para o aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS*. *Química Nova* **27**, 5, 807-812.

Sá, C. (2002). *Caracterização morfológica, microestrutural e microanalítica de materiais por: microscopia electrónica de varrimento – SEM e microanálise por raios-X – EPMA: EDS/WDS*. CEMUP, Porto.

Shashoua, Y. (2006). *Inhibiting the inevitable; Current approaches to slowing the deterioration of plastics*. *Macromolecular Symposia* **238**, 67–77.

Schilling, M.; Bouchard, M.; Khanjian, H.; Learner, T.; Phenix, A.; Rivenc, R. (2010). *Application of chemical and thermal analysis methods for studying cellulose ester plastics*. *Accounts of Chemical Research* **43**, 6, 888-896.

Schwarzinger, C.; Tanczos, I.; Schmidt, H. (2002). *Levoglucozan, cellobiose and their acetates as model compounds for the thermally assisted hydrolysis and methylation of cellulose and cellulose acetate*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **63**, 179-196

Sigma-Aldrich. (2011). *Derivatization reagents for selective response and detection in complex matrices*. Consultado a 12 de Outubro de 2014 em <<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>>

Sobeih, K.; Baron, M.; Gonzalez-Rodriguez, J. (2008). *Recent trends and developments in pyrolysis–gas chromatography*. *Journal of Chromatography A* **1186**, 51–66.

Stuart, B. (2007). *Analytical techniques in materials conservation*. John Wiley & Sons, Ltd, Inglaterra.

Valverde, M. (2005). *Photographic negatives. Nature and evolution processes*. 2ª Edição, Advanced Residency Program in Photograph Conservation, Nova Iorque, EUA.

Veen, I.; Boer, J. (2012). *Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis*. *Chemosphere* **88**, 1119–1153.

Wypych, G. (2004). *Handbook of plasticizers*. ChemTec Laboratories, Inc., Toronto, Canada.

Wampler, T. (2007). *Applied pyrolysis handbook*. 2ª Edição. CRC Press, Taylor & Francis Group. Nova Iorque, EUA.

Zhang, Y.; Himmel, M.; Mielenz, J. (2006). *Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies*. *Biotechnology Advances* **24**, 452–481.

Anexos

Anexo I – AD-Strips e colorimetria no diagnóstico da coleção

As AD-Strips, ferramenta desenvolvida pelo IPI Image Permanence Institute, são tiras de papel revestidas com um indicador ácido-base em combinação com NaOH. Na presença de ácido acético a cor da tira pode mudar de azul (a sua cor original) para verde ou amarelo. Permitem detetar o *síndrome do vinagre* no seu estágio inicial e determinar o estado de conservação da película ou da coleção.

Para determinar o estado de conservação em que se encontra a coleção em estudo foi colocada uma tira solta livremente dentro da caixa. Avaliou-se também o estado de conservação de negativos, de envelopes contendo negativos no seu interior e dos envelopes para isso colocou-se a amostra em estudo dentro de uma embalagem plástica com uma tira no seu interior e seguiu-se os parâmetros indicados no manual de utilização do Image Permanence Institute. Efetuou-se o mesmo procedimento para a tira utilizada como controlo.

Analisando e comparando os resultados obtidos (Fig. I.1) com a tabela I.1 é possível verificar que a atmosfera que envolve a coleção se encontra a pH entre 4.8 e 5.0 correspondentes ao nível 1, ou seja, a coleção encontra-se num estágio inicial de deterioração embora próximo do ponto autocatalítico. Nesta fase, já ocorreu a quebra dos grupos acetato na cadeia principal de celulose formando-se ácido acético. A libertação do ácido acético ocorre dentro do suporte plástico, difundindo-se gradualmente para a emulsão sendo por isso o ambiente junto do negativo mais ácido.

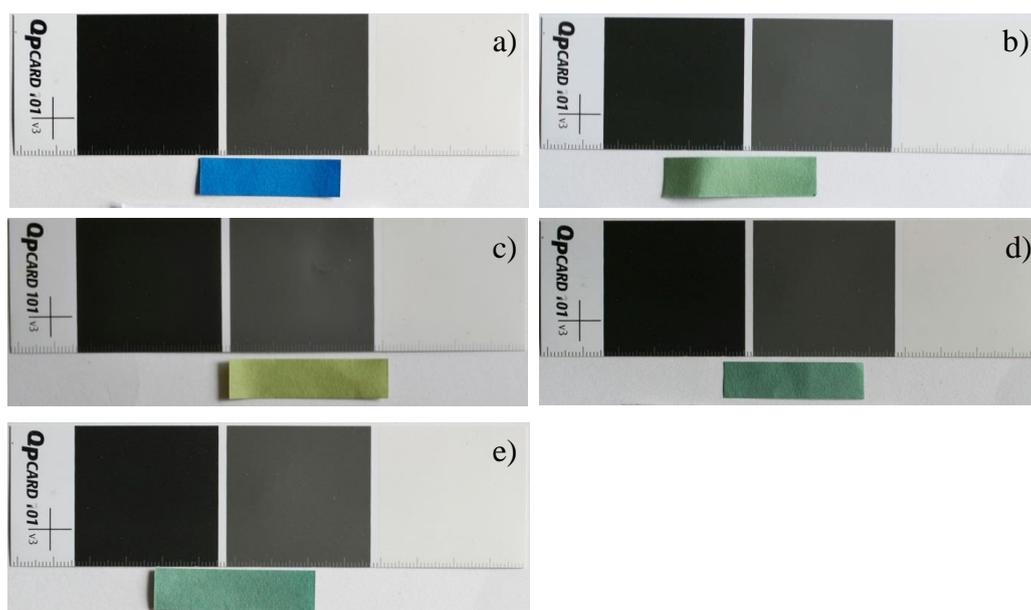


Figura I.1. a) AD-Strip antes de ser colocada no local a avaliar (controlo); b) AD-Strip, colocada na caixa,; c) AD-Strip após o contato com o negativo; d) AD-Strip após o contato com o negativo e o respetivo envelope; e) AD-Strip após o contato com o envelope.

pH 6,0	No Smell	Level 0	Fresh film
pH 5,5	No Smell	Level 0	Degradation beginning
pH 5,0	No Smell	Level 0	Degradation is increasing
pH 4,8	Weak Smell	Level 1	Degradation is more increasing
pH 4,6	Weak Smell	Level 2	Autocatalytic Point From now film should be watched
pH 4,4	Stronger Smell	Level 3	The film should be duplicated
< pH 4,0	Strong Smell	Level 3	The film has a very high priority for duplication

Tabela I.1. Tabela de avaliação e interpretação dos resultados, comercializada em conjunto com as AD-Strips.

Na figura II.2 apresenta-se os resultados da análise colorimétrica realizada às AD-strips, que permite, utilizando o sistema CIELAB, converter os dados obtidos por observação visual em valores numéricos utilizando um espaço tridimensional. Da análise dos gráficos é possível verificar que houve uma deslocação da cor do 3º quadrante, onde se encontram os controlos (zona dos azuis) para o 2º quadrante para as tonalidades de verde e amarelo, ou seja, há uma deslocação ao longo do eixo de b, de valores negativos para valores positivos.

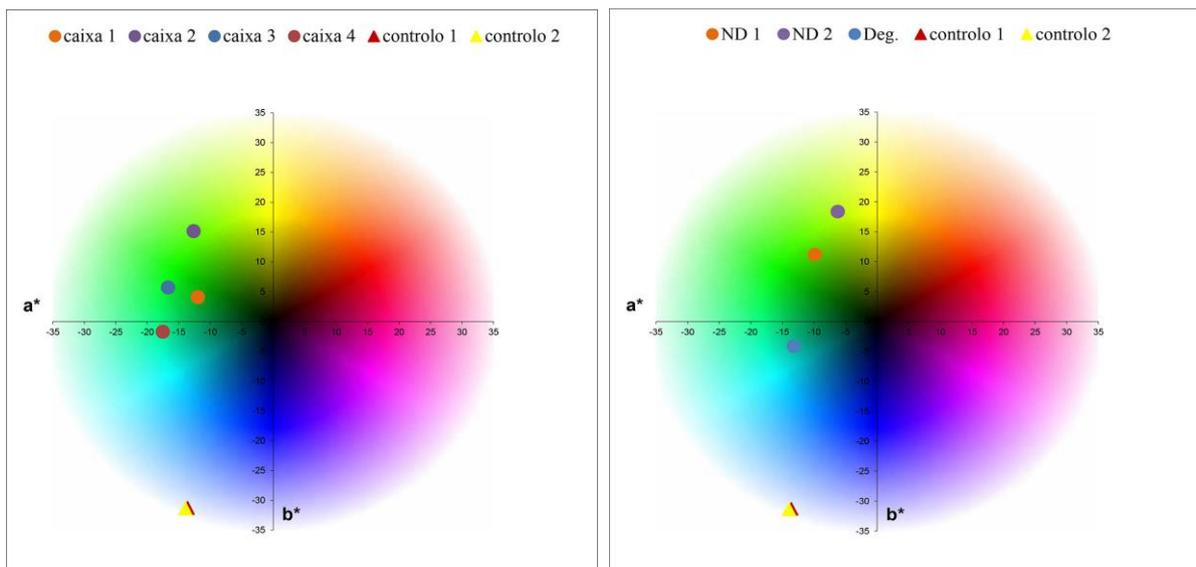


Figura I.2. Análise colorimétrica das AD-Strips após a avaliação do pH.

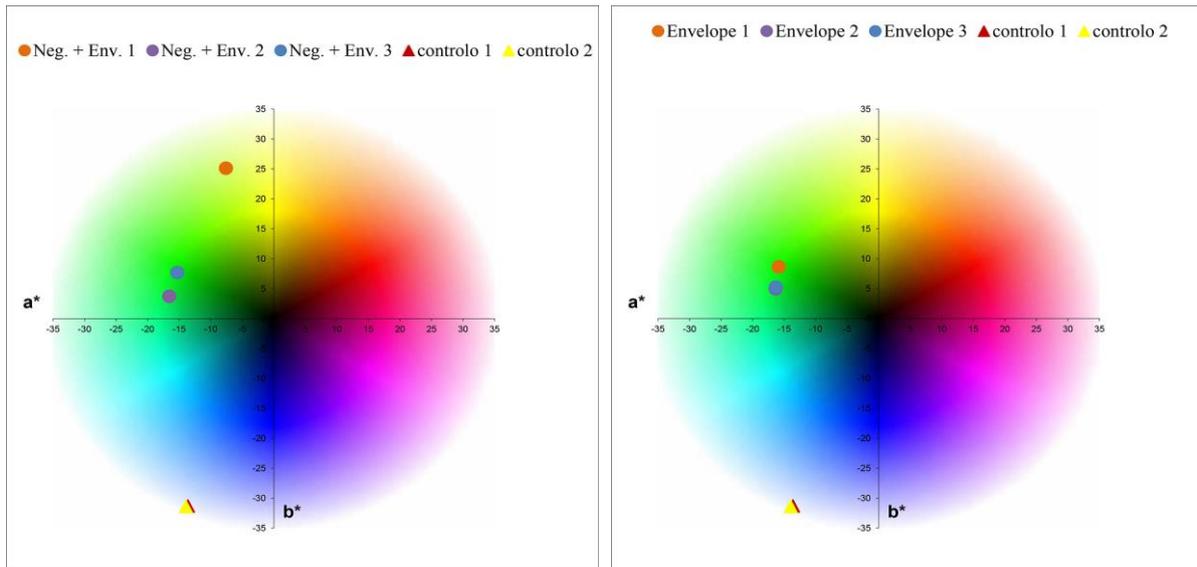


Figura I.2. continuação. Análise colorimétrica das AD-Strips após a avaliação do pH.

Anexo II – 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

Agar triptona de soja (TSA) utilizado para o crescimento de bactérias em rampas

- 15 g peptona de caseína
 - 5 g peptona de farinha de soja
 - 5 g cloreto de sódio
 - 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

Nutrient Broth

- 5 g peptona de carne
 - 3 g extrato de carne
- } Dissolver em 1000 mL de água destilada. Vai à autoclave a 121 °C, 20 min, 1 atm

Meio Mandels (para 500 mL)

- 5 g carboximetilcelulose
 - 0.15 g cloreto de cálcio
 - 1 mg cloreto de cobalto
 - 1 g dihidrogenofosfato de potássio
 - 0.5 g peptona
 - 0.7 g sulfato de amônio
 - 2.5 mg sulfato de ferro
 - 0.15 g sulfato de magnésio decahidratado
 - 0.8 mg sulfato de manganês hidratado
 - 0.7 mg sulfato de zinco
 - Tween 80 0.2% (p/v)
 - 0.15 g ureia
- } Colocar todos os nutrientes, à exceção da ureia, num recipiente com água destilada. Acertar o pH a 5.5-6.0 e aquecer com agitação. Vai à autoclave 121 °C, durante 15 min e após arrefecer adicionar a ureia filtrada

COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Tampão citrato 0.005 M, pH 4.8

Reagentes : ácido cítrico 0.1 M e citrato de sódio 0.1 M

Ácido cítrico 0.1 M

Dissolver 10.507 g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) num balão volumétrico de 500 mL. Perfazer o volume com água destilada.

Citrato de sódio 0.1 M

Dissolver 14.705 g de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) num balão volumétrico de 500 mL. Perfazer o volume de 500 mL com água destilada.

Preparação do tampão

Adicionar num balão de erlenmeyer 230 mL de ácido cítrico 0.1 M e 270 mL de citrato de sódio 0.1 M. Perfazer o volume de 1000 mL, num balão volumétrico, com água destilada.

Ácido dinitrosalicílico – DNS (para 1000 mL)

Dissolver 10 g de ácido 3.5-dinitrosalicílico em 200 mL de NaOH 2M (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 Comassie G 0.06 % p/v (100 mL)

- 0.06 g de azul de comassie G

- solução de HCl 0.6 N: medir 4.92 mL HCl/100mL

Dissolver 0.06 g de azul de comassie G em 4.92 mL de HCl. Perfazer o volume de 100 mL com água destilada. Colocar em agitação até dissolução completa.

Anexo III - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR-FT-IR)

Neste anexo são apresentados os espectros de infravermelho do trifetilfosfato e do acetato de celulose retirados da base de dados do software OMNICTM e o espectro de infravermelho gelatina, obtido em modo de reflexão atenuada de folhas de gelatina utilizadas em preparações culinárias que foram utilizados na análise dos espectros apresentados no capítulo 3.

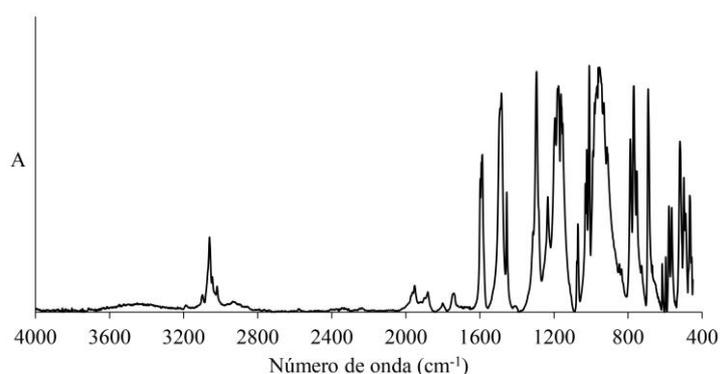


Figura III.1. Espectro de infravermelho do trifetilfosfato.

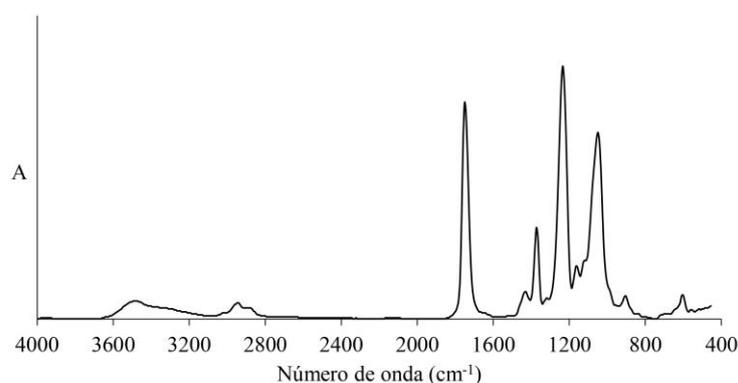


Figura III.2. Espectro de infravermelho do acetato de celulose.

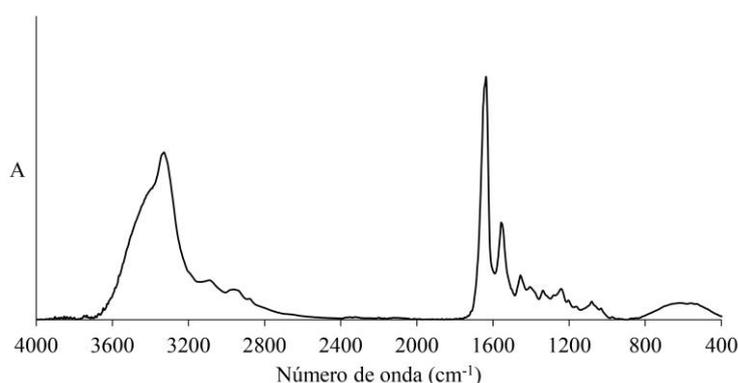


Figura III.3. Espectro de FT-IR em modo ATR da gelatina.

Na Tabela III.1 a III.6 estão indicadas as bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas das amostras, bem como as bandas de absorção identificadas para o trifenilfosfato, acetato de celulose e gelatina. Para a amostra N3 apenas se apresenta as bandas de absorção para uma área não degradada porque esta amostra não apresenta sinais visíveis a olho nu de degradação.

Tabela III.1. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N1. Legenda: ND – área não degradada; D- área degradada; TFF – trifenilfosfato; ? - banda não identificada.

Número de onda (cm ⁻¹)						Atribuição
ND	D	Interior	TFF	Gelatina	Acetato de celulose	
3306		3364		3330		estiramento da ligação OH
3068	3059	3065	3060			TFF
2929		2923		2963		estiramento da ligação CH ₃ (gelatina)
		2893		2880		estiramento da ligação CH ₂
	2359					?
		1733			1749	estiramento da ligação C=O (acetato de celulose)
	1652	1652				estiramento da ligação C=O
1633		1636		1636		Gelatina (amida I)
1542	1588	1589	1587			TFF
1487	1484	1487	1484			TFF
1452	1455	1455	1455	1455		TFF/gelatina
		1435			1431	deformação da ligação CH ₂ (acetato de celulose)
1336				1337		Gelatina
		1372			1372	deformação da ligação CH (acetato de celulose)
	1292	1293	1294			TFF
1229	1231	1237	1234	1242		TFF/estiramento assimétrico da ligação O-C-C do grupo éster (AC)/gelatina (amida III)
1202	1191	1182	1195			TFF
	1174		1176			TFF
	1160	1160	1162	1163		TFF/estiramento assimétrico da ligação C-O-C
1083	1070	1068	1071		1050	TFF/estiramento da ligação C-O (acetato de celulose)
1024	1022	1022	1023			TFF
	1008	1009	1009			TFF
	948	954	954			TFF
	930		931			TFF
	912	902			905	deformação da ligação CH (acetato de celulose)
896		824				?
	783		788			TFF
764	767	769	770			TFF
	751	753	753			TFF
688	688	688	691			TFF
658		658				?

Tabela III.2. continuação. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N1. Legenda: ND – área não degradada; D- área degradada; TFF – trifenílfosfato.

Número de onda (cm ⁻¹)						Atribuição
ND	D	Interior	TFF	Gelatina	Acetato de celulose	
615	615	615	616			TFF
	595		597			TFF
	577	578	579			TFF
	564	565	564			TFF
517	516	518	520			TFF
	496	499	499			TFF
	465		467			TFF

Tabela III.2. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N2. Legenda: ND – área não degradada; D- área degradada; TFF – trifenílfosfato.

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição
ND	D	TFF	Gelatina	
3305				Estiramento da ligação OH
3070	3060	3060		TFF
2932			2963	Estiramento da ligação CH3 (gelatina)
1633			1636	gelatina (amida I)
	1588	1587		TFF
1545			1556	Deformação da ligação NH (gelatina - amida II)
1489	1483	1484		TFF/ deformação da ligação NH (gelatina)
1453	1455	1455	1455	TFF/ deformação da ligação CH (gelatina)
1336	1293	1294		TFF
1234	1232	1234	1242	TFF/gelatina (amida III)
1193	1174	1176		TFF
	1160	1162		TFF
1085	1070		1081	Gelatina/estiramento da ligação CO
1027	1022	1023		TFF
	1008	1009		TFF
968	947	954		TFF
916		914		TFF
752	768	753		TFF
689	688	691		TFF
	564	564		TFF
519	517	520		TFF
	497	499		TFF
	465	467		TFF

Tabela III.3. Bandas de absorção identificadas para as áreas não degradadas da amostra N3.

Legenda: ND – área não degradada; D- área degradada; TFF – trifenilfosfato.

Número de onda (cm ⁻¹)			Atribuição
ND	TFF	Gelatina	
3307			Estiramento da ligação OH
3078	3060		TFF
2934		2963	Estiramento da ligação CH3 (gelatina)
1635		1636	Gelatina (amida I)/ estiramento da ligação C=O
1548		1556	Deformação da ligação NH (gelatina - amida II)
1453	1455	1455	TFF/ gelatina
1403		1406	gelatina
1336		1337	gelatina
1236	1234	1242	TFF/gelatina (amida III)
1200	1195		TFF
1081		1081	Gelatina/estiramento da ligação CO
1030	1031		TFF
1010	1009		TFF
971	954		TFF
563	564		TFF

Tabela III.4. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N4.

Legenda: ND – área não degradada; D- área degradada; TFF – trifenilfosfato; ? - banda não identificada.

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição
ND	D	TFF	Gelatina	
3306	3307			estiramento da ligação OH
3069	3067	3060		TFF
2927	2942		2963	estiramento da ligação CH3 (gelatina)
1631	1636		1636	estiramento da ligação C=O/gelatina (amida I)
	1590	1598		TFF
1543	1541		1556	deformação da ligação NH (gelatina - amida II)
1488	1488	1484		TFF
1454	1456		1455	TFF/ gelatina
1335			1337	gelatina
1230			1242	gelatina (amida III)
1202				?
	1193	1195		TFF
1086	1085	1071	1081	TFF/gelatina
1025	1025	1023		TFF
967	965	954		TFF
915	914	914		TFF
772	769	770		TFF
753		753		TFF

Tabela III.4. continuação. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N4. Legenda: ND – área não degradada; D- área degradada; TFF – trifetilfosfato; ? - banda não identificada.

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição
ND	D	TFF	Gelatina	
689	688	691		TFF
	616	616		TFF
	578	579		TFF
530				TFF
	519	520		TFF

Tabela III.5. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N5. Legenda: ND – área não degradada; D - área degradada; TFF – trifetilfosfato; ? - banda não identificada.

Número de onda (cm ⁻¹)					Atribuição
ND	D	TFF	Gelatina	Acetato de celulose	
3326	3307				estiramento da ligação OH
3083	3060	3060			TFF
2959	2936		2963		estiramento da ligação CH ₃ (gelatina)
1636	1629		1636		gelatina (amida I)/ estiramento da ligação C=O
	1589	1587			TFF
1553	1543		1556		deformação da ligação NH (gelatina - amida II)
	1485	1484			TFF
1454	1455	1455	1455		TFF/ gelatina
1404			1406		gelatina
1337	1337		1337		gelatina
	1313				?
	1293	1294			TFF
1238	1232	1234	1242		TFF/gelatina (amida III)
1204	1193	1195			TFF
	1174	1176			TFF
	1161	1162		1162	TFF/estiramento assimétrico da ligação C-O-C
1083	1071			1050	gelatina/estiramento da ligação CO (acetato de celulose)
1032	1022	1023			TFF
	1008	1009			TFF
973	966	954			TFF
	949				?
	931	931			TFF
917	914	914			TFF
901				905	deformação da ligação CH (acetato de celulose)
851		846			TFF
	784	788			TFF

Tabela III.5. continuação. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N5. Legenda: ND – área não degradada; D - área degradada; TFF – trifetilfosfato.

Número de onda (cm ⁻¹)					Atribuição
ND	D	TFF	Gelatina	Acetato de celulose	
	768	770			TFF
	752	753			TFF
690	689	691			TFF
	615	616			TFF
	595	597			TFF
	578	579			TFF
530	564	564			TFF
	517	520			TFF
	497	499			TFF
	465	467			TFF

Tabela III.6. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N6. Legenda: ND – área não degradada; D - área degradada; TFF – trifetilfosfato; ? - banda não identificada.

Número de onda (cm-1)					Atribuição
ND	D	TFF	Gelatina	Acetato de celulose	
3273	3274				estiramento da ligação OH
3067	3060	3060			TFF
2936	2929		2963		estiramento da ligação CH ₃ (gelatina)
	1749			1749	estiramento da ligação C=O (acetato de celulose)
	1716				?
	1698				?
	1653				?
1635	1636		1636		estiramento da ligação C=O/ gelatina (amida I)
	1624				?
	1588	1587			TFF
	1558		1556		deformação da ligação C-N-H /amida III (gelatina)
1542	1541				?
	1522				?
	1488	1484			TFF
1455	1456		1455		TFF/deformação da ligação CH (gelatina)
	1437			1431	deformação da ligação CH ₂ (acetato de celulose)
	1419				
1398	1388			1372	deformação da ligação CH (acetato de celulose)
1332	1339		1337		gelatina
1292	1293	1294			TFF
1231	1230	1234	1242	1234	TFF/gelatina (amida III)/estiramento da ligação CO (acetato de celulose)
1199	1174	1176			TFF

Tabela III.6. continuação. Bandas de absorção identificadas para as áreas degradadas e não degradadas da amostra N6. Legenda: ND – área não degradada; D - área degradada; TFF – trifetilfosfato; ? - banda não identificada.

Número de onda (cm-1)					Atribuição
ND	D	TFF	Gelatina	Acetato de celulose	
1160		1162		1162	TFF/estiramento assimétrico da ligação C-O-C
1079	1071	1071	1081	1050	TFF/gelatina/estiramento da ligação CO (acetato de celulose)
1031	1023	1023			TFF
1009		1009			TFF
971					?
952	950	954			TFF
	785	788			TFF
768	769	770			TFF
	753	753			TFF
689	690	691			TFF
645					?
610	615	616			TFF
	579	579			TFF
563	564	564			TFF
518	518	520			TFF
	499	499			TFF
	467	465			TFF

Anexo IV - Micro-difração de Raios-X (μ -DRX)

Na Tabela IV.1 são apresentadas as riscas de difração identificadas para as áreas não degradadas e degradadas das amostras bem como as riscas de difração para os compostos trifenilfosfato (TFF), prata e triacetato de celulose (TAC). Para a amostra N3 apresenta-se as riscas de difração de uma área não degradada porque esta amostra não apresenta sinais visíveis, a olho nu, de degradação.

Tabela IV.1 Riscas de difração das áreas não degradadas (ND) e degradadas (D) das seis amostras em estudo e dos compostos identificados.

Riscas de difração													
N1		N2		N3	N4		N5		N6		TFF	Prata	TAC
ND	D	ND	D	ND	ND	D	ND	D	ND	D			
Pos. [$^{\circ}$ 2Th.]													
				8.3119									8.414
10.7384	10.7771		10.6638		10.7491	10.7736	10.4131	10.7857		10.6699	10.715		
13.0782	13.1291		13.0562		13.0645	13.0928	13.1781	13.2707		13.211	13.067		
16.9001	16.9335		16.7062		16.9571	16.9169		16.9471			16.874		
17.2203	17.3258		17.1377	17.446	17.2261	16.9169					17.443		17.272
19.9949	19.9287		20.0498						19.2437	19.9949	20.064		
		20.164			20.1376	20.229	20.2985	20.279			20.184		
21.5684	21.5847		21.5972		21.416	21.5888	21.4292	21.6919		21.56	21.583		
26.3169	26.3719		26.3989		26.3542	26.3547					26.331		
26.5765	26.6316		26.6344		26.7619	26.6499		26.5616		26.4259	26.595		26.668
						27.9997		28.1473	28.187	28.3813	28.145		
32.6139	32.6158		32.4283		32.6049	32.6335	32.1939	32.6038		32.5338	32.558		
38.115	38.115	38.125		38.115	38.115	38.115	38.1142	38.115	38.0922	38.115		38.115	
42.6861	42.6758		42.7062		42.616			42.7283			42.675		
44.2647	44.2717	44.2883	44.3029	44.3259	44.3576	44.2995	44.3103	43.897	44.3024	44.2972		44.299	
						47.9479		47.9283			47.915		
64.4054	64.4916	64.4826	64.486	64.5515	64.5344	64.4479	64.5113	64.6216	64.4929	64.4633		64.443	
77.489	77.4707	77.4172	77.5062	77.5543	77.4225	77.3979	77.4167	77.5778	77.4355	77.4032		77.397	

Anexo V – Caracterização microbiológica de negativos de meados do século XX

Cultura dos isolados bacterianos na presença de matriz de película fotográfica contemporânea

Neste anexo, na Fig.V.1 são apresentados os espectros de FT-IR obtidos em modo ATR das películas contemporâneas que estiveram sob a ação dos isolados bacterianos N1-A, N1-B, N2, N3 e N3-A. O espectro da película fotográfica (Fig. V.1-a) antes do ensaio iniciar e nos restantes períodos assemelha-se ao espectro do acetato de celulose. À semelhança do que foi referido no capítulo 3 para o isolado N3-B, nos espectros das películas retiradas ao longo da cultura dos restantes isolados (Fig. V.1-b a V.1-e) surge uma banda aos 1636 cm^{-1} compatível com a amida I. Ao analisar os espectros obtidos verifica-se que parece haver uma diminuição da banda relativa ao acetato de celulose em função do tempo de cultura. A banda da amida I que surge nas primeiras 24 horas do ensaio dos isolados N2 e N3-A vai diminuindo de intensidade ao longo do tempo enquanto que nos espectros dos isolados N1-A, N1-B e N3 parece acontecer o contrário, esta banda aumenta de intensidade ao longo do tempo de cultura ao mesmo tempo que a banda do acetato de celulose a 1745 cm^{-1} diminui de intensidade.

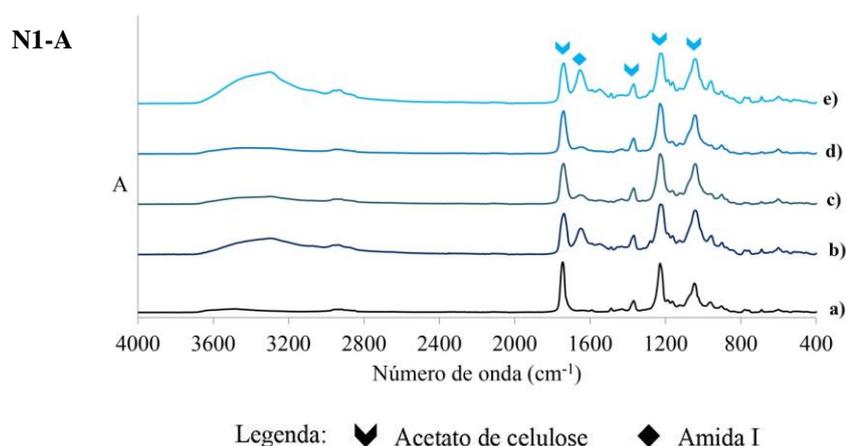


Fig.V.1. Espectros de FT-IR em modo ATR das películas fotográficas retiradas da cultura de N1-A. Legenda: a) Espectro da película antes do ensaio iniciar (0 horas); b) a e) espectros das películas retiradas das culturas ao fim de 24h, 48h, 72h e 240h respetivamente.

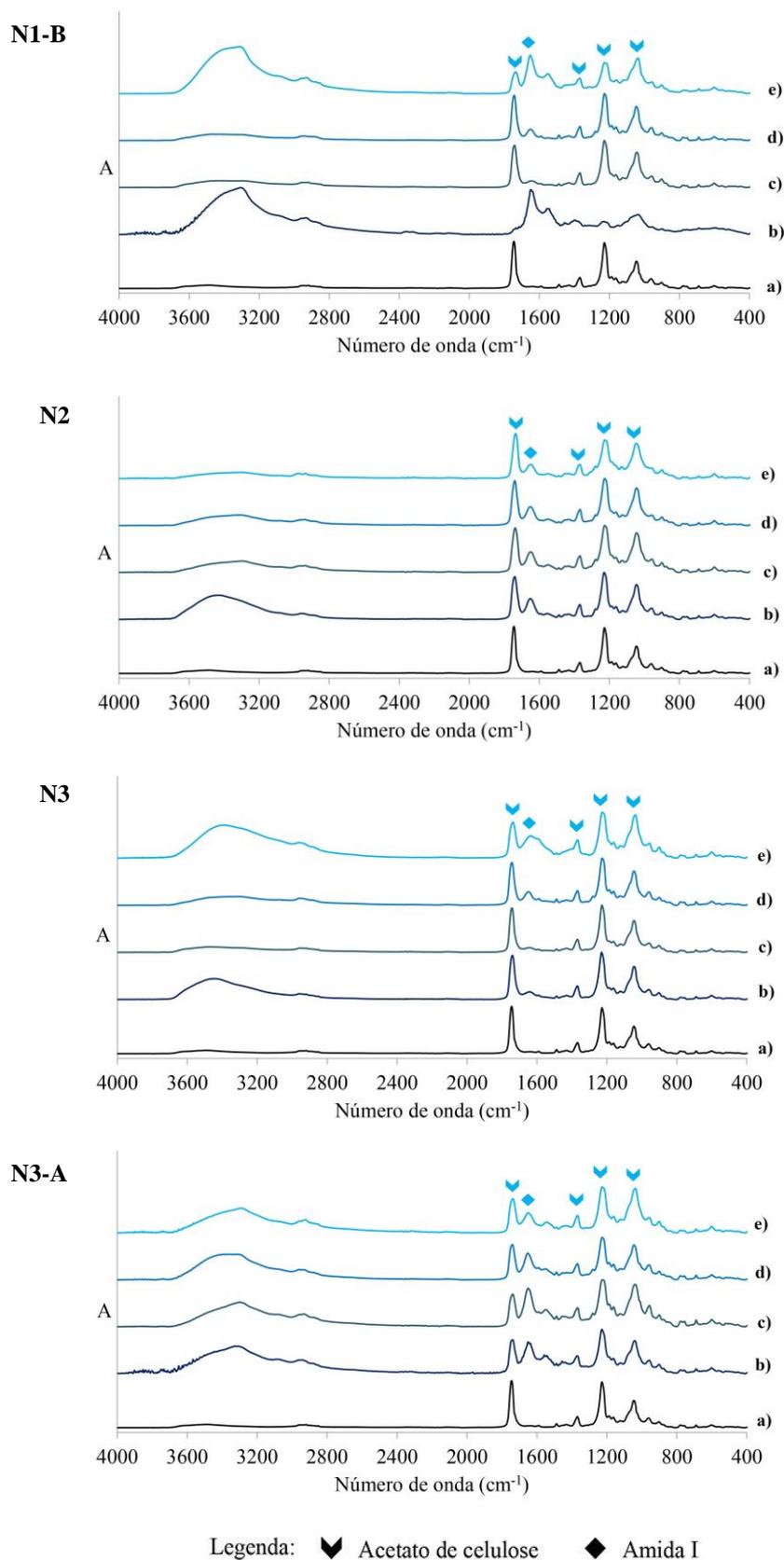


Fig.V.1.continuação Espectros de FT-IR em modo ATR das películas fotográficas retiradas das culturas de N1-B, N2, N3 e N3-A. Legenda: a) Espectro da película antes do ensaio iniciar (0 horas); b) a e) espectros das películas retiradas das culturas ao fim de 24h, 48h, 72h e 240h respetivamente.

Avaliação do potencial biodeteriorogénico de fungos filamentosos

Para a avaliação do potencial biodeteriorogénico dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium brevicompactum* elaborou-se a curva de calibração da D-Glucose e do BSA (albumina sérica bovina).

A Tabela V.1 e a Fig. V.3 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 V.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 (540 nm)			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

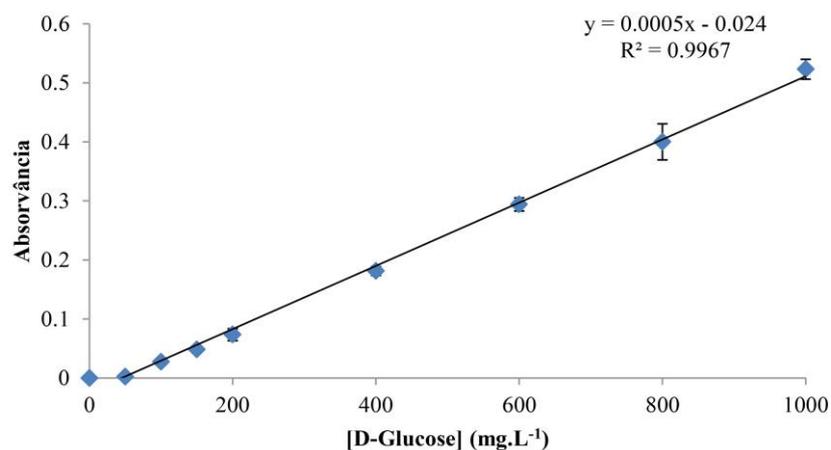


Figura V.3. Curva de calibração da D-glucose.

A Tabela V.2 e a Fig. V.4 correspondem aos valores e à curva de calibração do BSA, respetivamente, e foi utilizada como padrão na determinação da atividade específica da celulase.

Tabela V.2. Valores da solução padrão do BSA com concentrações entre 0 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e medição da absorvância a 590 nm.

Padrão	[BSA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Abs (590 nm)			Abs - branco			Média (Abs - branco)	Desvio Padrão
1	1	0.195	0.207	0.211	0.021	0.032	0.037	0.030	0.008
2	2	0.195	0.203	0.206	0.020	0.028	0.032	0.027	0.006
3	5	0.244	0.244	0.247	0.069	0.070	0.073	0.071	0.002
4	10	0.300	0.307	0.272	0.125	0.132	0.097	0.118	0.019
5	15	0.306	0.345	0.317	0.131	0.170	0.142	0.148	0.020
6	20	0.390	0.401	0.377	0.215	0.226	0.202	0.215	0.012
7	40	0.533	0.521	0.518	0.358	0.347	0.343	0.349	0.008

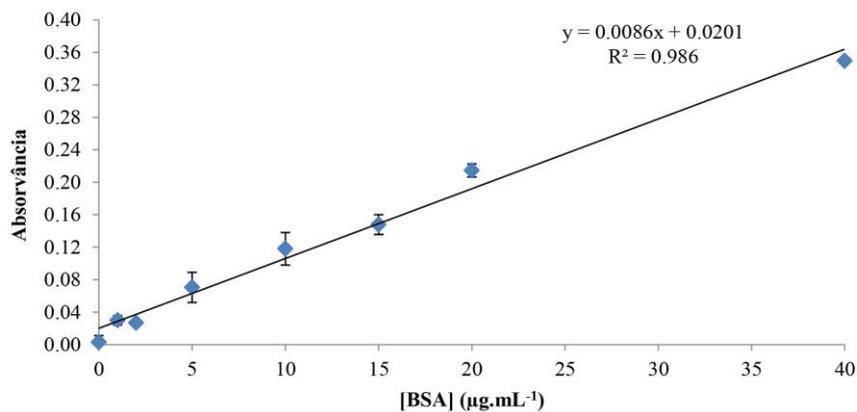


Figura V.4. Curva de calibração do BSA.

Na análise dos resultados obtidos utilizou-se testes estatísticos. Na Tabela V.3 é apresentado o teste de análise de variância (ANOVA).

Tabela V.3. Tabela ANOVA

		Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (95%)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Entre grupos	.003	11	.000	64.861	.000
	Dentro dos grupos	.000	24	.000		
	Total	.003	35			
<i>Aspergillus niger</i>	Entre grupos	.001	11	.000	14.503	.000
	Dentro dos grupos	.000	24	.000		
	Total	.001	35			
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Entre grupos	.002	11	.000	88.587	.000
	Dentro dos grupos	.000	24	.000		
	Total	.002	35			