Resumo

A conservação de pinturas murais em igrejas de granito no Norte de Portugal apresenta um desafio crítico devido a alterações cromáticas persistentes, nomeadamente manchas negras e castanhas. Estas alterações comprometem não apenas a integridade estética destes bens culturais, mas também a sua estabilidade estrutural. Esta tese explora os mecanismos de formação destas manchas e procura desenvolver soluções inovadoras baseadas em biotecnologia para a sua remoção e conservação preventiva.

O estudo integra uma metodologia interdisciplinar, que combina química analítica, microbiologia, monitorização ambiental e ciência da conservação.

Foram recolhidas 46 amostras durante a investigação (12 em Vila Marim, 16 em Folhadela e 18 em Mouçós) para a caracterização das pinturas murais nas três igrejas casos de estudo práticos – Santa Marinha (Vila Marim), São Tiago (Folhadela) e Nossa Senhora de Guadalupe (Mouçós) – utilizando micro-espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (μS-FTIR) e micro-Raman (μ-Raman) combinados com microscopia electrónica de varrimento (SEM) e análise estratigráfica. Caracterizam-se, desta forma, como frescos, com um único estrato de argamassa à base de cal aplicado directamente sobre o granito.

As manchas negras-azuladas no granito foram caracterizadas opticamente e quimicamente por microscopia óptica (MO), espectroscopia de absorção atómica (AAS), espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), espectroscopia de fotoelectrões de raios-X (XPS) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), sendo identificadas como compostas por óxidos de manganês e ferro. Por sua vez, para as manchas negras-acastanhadas recorreu-se à microscopia óptica, métodos clássicos de microbiologia e identificação de isolados por biologia molecular, CIE L*a*b* e SEM, que sugerem actividade microbiana. Foram recolhidas amostras nas três igrejas para o estudo e avaliação das manchas negras de origem microbiológica. Os resultados confirmaram, através de metodologia clássica, a presença de 95 isolados fúngicos e 159 isolados bacterianos na igreja de Vila Marim. Foram também recolhidas seis amostras na igreja de Vila Marim, cinco na igreja de Folhadela e quatro na igreja de Mouçós para análise por biologia molecular, tendo sido identificados géneros como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus* e

Trichoderma, bem como cianobactérias *Nostoc*, possivelmente envolvidos na produção de pigmentos e deterioração do substrato. A sequenciação de nova geração revelou 25917 espécies bacterianas presentes, 5134 espécies fúngicas e 5134 espécies de microalgas e cianobactérias, destacando uma significativa diversidade microbiana nas áreas estudadas.

Para enfrentar os desafios da conservação, foram testados tratamentos inovadores incluindo amido de kudzu, quitosano e óleos essenciais, pelo seu potencial antimicrobiano. Foram selecionados quatro fungos produtores de pigmentação negra para ensaios antimicrobianos com três óleos essenciais (OE) e determinação das concentrações mínimas inibitórias. Todos os OE testados inibiram as espécies fúngicas analisadas, demonstrando potencial para aplicação futura. O amido de kudzu revelou um possível efeito inibitório contra fungos. Os ensaios *in vitro* com quitosano em protótipos de pintura mural não puderam ser eficazmente avaliados nas condições experimentais seleccionadas. Além disso, uma formulação à base de gel de quitosano permitiu a remoção de manchas negras das superfícies de granito sem danificar o substrato. No entanto, a tentativa de desenvolver uma solução adequada para a remoção de manchas negras em pinturas murais permanece um objectivo não alcançado durante esta investigação.

A água é o principal agente de degradação das pinturas a fresco nos três casos estudados, devido à migração capilar para o interior do granito. Particularmente na capela-mor da igreja de Mouçós, parcialmente enterrada e escavada na rocha, verificam-se problemas estruturais, como infiltração de água pelo solo, pelas paredes e pelo telhado anteriormente danificado. Foram recolhidos valores de humidade relativa e temperatura no interior e exterior dos monumentos. A conjugação destes três factores é o mais provável responsável pela perda das superfícies cromáticas e pelo aparecimento das manchas negras inestéticas. A monitorização ambiental revelou flutuações acentuadas da humidade relativa, com valores médios elevados na ordem dos 80%. A integração do SIG (Sistema de Informação Geográfica) permitiu correlacionar os padrões de biodeterioração com problemas ambientais e estruturais.

Esta tese revela a complexa relação entre factores biológicos, ambientais e materiais na degradação das pinturas murais. Apesar dos avanços significativos alcançados, é necessário

continuar a investigação para refinar as metodologias de limpeza, avaliar a eficácia dos tratamentos a longo prazo e desenvolver estratégias sustentáveis de conservação preventiva. Estudos futuros deverão explorar novas abordagens de limpeza, expandir as avaliações de risco com SIG e integrar a participação da comunidade na conservação deste património.

Palavras-chave: Pinturas murais a fresco, manchas negras, manchas castanhas, fungos, conservação preventiva.

Abstract

The conservation of mural paintings in granite-built churches of Northern Portugal presents a critical challenge due to persistent chromatic alterations, primarily black and brown stains. These alterations compromise not only the aesthetic integrity of these heritage sites but also their structural stability. This thesis explores the formation mechanisms of these stains and attempts to develop innovative biotechnology-based solutions for their removal and preventive conservation.

The study integrates an interdisciplinary methodology, combining analytical chemistry, microbiology, environmental monitoring, and conservation science.

Forty-six samples were collected during the investigation for the characterisation of mural paintings in three case study churches – Santa Marinha (Vila Marim), São Tiago (Folhadela), and Nossa Senhora de Guadalupe (Mouçós) – by using μS-FTIR and Raman combined with SEM and stratigraphy, revealing their execution in the fresco technique with a single-layer lime-based mortar applied directly onto granite substrates.

The bluish-black stains on granite at Vila Marim (VM), Folhadela (F), and Mouçós (M) churches were characterised both optically and chemically using colour-related data, optical microscopy, atomic absorption spectroscopy (AAS), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and identified as composed of manganese and iron oxides, while the brown stains and calcium oxalate deposits suggested biodeteriorative activity.

Samples were collected across the three churches for the study and assessment of dark stains of microbiological origin. The results validated the presence of 95 fungal and 159 bacterial isolates by culture-dependent methodology in Vila Marim Church. Six samples were collected from Vila Marim Church, five from Folhadela Church and four from Mouçós Church for culture-independent analysis, and genera such as *Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Aspergillus*, and *Trichoderma*, alongside *Nostoc* cyanobacteria, which are the most likely contributors to pigment production and substrate deterioration, were identified. High-throughput sequencing identified 25,917 bacterial species, 5,134 fungal species, and

5,134 microalgae/cyanobacteria species, highlighting significant microbial diversity in degraded areas.

In addressing conservation challenges, the research tested innovative treatments, including kudzu starch, chitosan and essential oils, for their antimicrobial potential. Four fungi isolates capable of producing black pigmentation were selected for treatments with three essential oils (EO) and for determining minimum inhibitory concentrations. All three EOs inhibited the tested fungal species, forecasting future use. Kudzu starch demonstrated the potential for an inhibitory effect against fungi. *In vitro* chitosan anti-fungal assays in mural painting prototypes could not be effectively evaluated under the experimental conditions chosen. Additionally, a chitosan gel-based formulation successfully removed black stains from granite surfaces without damaging the substrate. However, attempts to develop a suitable cleaning solution for the removal of black stains from mural paintings remain an unfulfilled objective in this research.

Water is the leading deterioration agent of frescos in the three case studies, due to capillarity migration towards the granite interior. Particularly in Mouçós church's main chapel, partially buried and excavated into the rock, which has structural issues such as water infiltration through the ground, the walls and a previously leaky roof. Values of relative humidity and temperature were collected inside and outside the monuments. The combination of these three factors is most probably responsible for the loss of chromatic surfaces and unaesthetic dark stains. Environmental monitoring revealed severe fluctuations of relative humidity along with high humidity values averaging 80%. The integration of Geographic Information System (GIS) mapping further correlated biodeterioration patterns with environmental and structural problems.

This thesis underscores the complex relationship between biological, environmental, and material factors in mural painting degradation. Despite significant progress, further research is required to refine cleaning methodologies, assess long-term treatment efficacy, and develop sustainable preventive conservation strategies. Future studies should explore new cleaning approaches, expand GIS-based risk assessments, and integrate community engagement in heritage conservation efforts.

Keywords: Fresco mural paintings, black-blue stains, black-brown stains, fungi, preventive conservation.