



INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO  
Universidade Técnica de Lisboa

**Estudo do envelhecimento de  
aglutinantes em têmperas proteicas por  
cromatografia líquida de elevada eficiência**

**Helena Valente Vargas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química**

**Júri**

Presidente: Maria Matilde Soares Duarte Marques

Orientador: Maria Isabel Macedo Ribeiro

João Emídio Silva da Costa Pessoa

Vogais: Maria da Conceição Oliveira

**Novembro, 2008**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de manifestar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço em particular:

À Engenheira Isabel Ribeiro, Directora do Laboratório de Conservação e Restauro José de Figueiredo (LCR) do Instituto dos Museus e Conservação (IMC), e orientadora desta tese, pelo interesse, disponibilidade em qualquer altura, incentivo, apoio e dedicação concedidos ao longo deste ano de trabalho. O seu interesse e incentivo foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Pessoa, orientador desta tese, pelo apoio concedido, interesse, estímulo, e pelas sugestões e comentários e correcções que permitiram melhorar este trabalho

A toda a equipa que forma o actual LCR: Dr.<sup>a</sup> Maria José Oliveira, Dr.<sup>a</sup> Lília Esteves, Dr.<sup>a</sup> Ana Mesquita, Dr. José Carlos Frade, Dr. Pedro Alves, Dr.<sup>a</sup> Ana Margarida Cardoso e Dr.<sup>a</sup> Sara Valadas, pelo estímulo, incentivo, amizade e pronta disponibilidade em prestar qualquer auxílio sempre que necessário.

Aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio incondicional e por terem acreditado em mim e me ensinarem a querer sempre aprender mais e seguir mais adiante. Sem eles nada disto seria possível.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

A técnica para identificação de têmperas proteicas (gema de ovo, gelatina e caseína) baseada na metodologia Pico-Tag<sup>®</sup> e cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) foi implementada no Laboratório de Conservação e Restauro José de Figueiredo (LCR). Segundo este método, as amostras são hidrolizadas com ácido clorídrico, os aminoácidos derivatizados com fenilisotiocianato, a amostra totalmente seca e seguidamente solubilizada numa solução diluinte, e os aminoácidos separados, detectados e analisados por HPLC. Usando esta técnica, pretendeu-se também estudar a influência da luz, temperatura, humidade e pigmentos no processo de envelhecimento das proteínas, no que respeita à composição em aminoácidos e cromaticidade. Para tal, recorreu-se a ensaios de envelhecimento acelerado de tintas em câmaras de envelhecimento. Verificou-se que as têmperas proteicas são aglutinantes muito estáveis, especialmente as têmperas à base de gelatina e caseína, pois não se degradam significativamente ao longo do tempo sob a acção de qualquer um dos factores de envelhecimento. Nas têmperas à base de gema de ovo verificam-se alterações cromáticas com o envelhecimento, mas provavelmente estas alterações não se devem tanto às proteínas mas a outros componentes desta têmpera, como ácidos gordos. Os pigmentos não têm, em geral um efeito muito grande sobre o envelhecimento das têmperas, mas podem acelerar o processo de degradação das proteínas e dificultar a sua identificação. É sabido que os pigmentos à base de cobre dificultavam a identificação das têmperas. Assim, foi ainda estudada uma metodologia, usando o agente quelante EDTA, para tentar inibir o efeito de alguns pigmentos na caracterização das têmperas. Verificou-se que o método usado (adição de 0,2M EDTA em tampão de amónia) não foi eficaz, sendo necessário efectuar mais estudos.

## PALAVRAS-CHAVE

Têmperas proteicas, Gema de ovo, Gelatina, Caseína, Pico-Tag<sup>®</sup> + HPLC, Envelhecimento acelerado.

## **ABSTRACT**

The technique for identification of proteinaceous binding media (egg yolk, animal glue and casein) based on the analytical technique Pico-Tag® and high performance liquid chromatography (HPLC) was implemented at the Laboratório de Conservação e Restauro José de Figueiredo (LCR). According to this method, samples are hydrolyzed with hydrochloric acid; amino acids are derivatized with phenylisothiocyanate and separated, detected and analyzed by HPLC. Using this method, accelerated aging tests of paints were applied to study the influence of light, temperature, moisture and natural pigments in the aging process of proteins in tempers was determined. The results indicate that proteinaceous binding media are very stable, particularly the glue and casein media, not degrading considerably with time by the action of the aging factors. The egg yolk media shows chromatic changes along the aging, but probably these are not due to proteins but are related to other media components, such as lipids. Although pigments do not have, in general, a large effect on temper aging, they can slightly accelerate the process of degradation of proteins and perturb their identification. It is known that copper pigments interfere with the identification of tempers. So a methodology was studied, using EDTA, to inhibit the effect of some pigments in the characterization of tempers. It was concluded that the method used (addition of 0,2 M Na<sub>2</sub>EDTA in a buffer ammonia/ammonium chloride) was not adequate, so more studies need to be done.

## **KEY-WORDS**

Proteinaceous media, Egg yolk, Animal glue, Casein, Pico-Tag®+HPLC, Accelerated aging.

## GLOSSÁRIO

°C – Graus Célsius

a\* – Eixo verde-vermelho

Ala – Alanina

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido Aspártico

b\* – Eixo azul-amarelo

CEN – Correspondência envelhecimento natural

CIE – Commission Internationale de l'Eclairage (Comissão Internacional de Iluminação)

Cys – Cisteína

DPMS – Espectrometria de massa com pirólise directa (do inglês, *direct pyrolysis mass spectrometry*)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

EN – Envelhecimento natural

GC – Cromatografia gasosa (do inglês, *gas chromatography*)

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry*)

Gln – Glutamina

Glu – Ácido Glutâmico

Gly – Glicina

h - Hora

His – Histidina

HPLC – Cromatografia líquida de elevada eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

HPLC-ESI-TOF – Cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada a espectrometria de massa de ionização por *electrospray* e TOF (do inglês, *high performance liquid chromatography with electron spray ionisation-time of flight mass spectrometry*)

HPLC-MS – Cromatografia líquida de elevada eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography-mass spectrometry*)

HPLC-UV – Cromatografia líquida de elevada eficiência com detecor Ultra-Violeta (do inglês, *high performance liquid chromatography with ultra violet detector*)

HR – Humidade relativa

Ile – Isoleucina

Kd – Coeficiente de distribuição

L\* – Luminosidade

LCR – Laboratório de Conservação e Restauro José de Figueiredo

Leu – Leucina

Lys – Lisina

µg – Micrograma

µl – Microlitro

MALDI – Espectrometria de massa por ionização MALDI (do inglês, *matrix assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry*)

Met – Metionina

min – Minutos

nm – Nanómetro

Nor - Norleucina

OH-Pro – Hidroxiprolina

Phe – Fenilalanina

Pro – Prolina

R – Resolução

RP-HPLC – Cromatografia líquida de elevada eficiência em fase reversa (do inglês, *reverse phase high performance liquid chromatography*)

séc. – Século

Ser – Serina

T – Temperatura

t<sub>R</sub> – Tempo de retenção

Thr – Treonina

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-visível

UV-Visível – Ultravioleta-visível

Val – Valina

W/m<sup>2</sup> – Watt por metro quadrado

W – Largura na base dos picos

# ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	lii
Abstract.....	iv
Glossário.....	V
Índice Geral.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	xi
1. Introdução.....	1
2. A pintura a têmpera.....	3
2.1 Aglutinantes proteicos.....	3
2.1.1 As proteínas.....	3
2.1.2 Gelatina e cola animal.....	4
2.1.3 Gema de ovo.....	5
2.1.4 Caseína.....	6
2.2 Pigmentos.....	6
2.3 Envelhecimento acelerado vs. Natural.....	8
2.3.1 Mecanismos gerais de degradação das proteínas em têmperas.....	9
3. Caracterização de aglutinantes proteicos em obras de arte.....	13
3.1. Cromaticidade.....	14
3.2 Cromatografia Líquida de elevada eficiência, HPLC.....	15
3.2.1 Análise de aminoácidos pelo método Pico-Tag®.....	16
4. Parte experimental.....	21
4.1 Preparação de filmes de têmperas proteicas.....	22
4.2 Implementação da técnica Pico-Tag®+HPLC para identificação de têmperas proteicas.....	23
4.3 Envelhecimento acelerado de filmes de têmperas proteicas.....	26
4.4 Utilização do EDTA para inibir o efeito dos pigmentos sob as têmperas proteicas.....	28

5. Apresentação e discussão de resultados.....	29
5.1 Utilização da técnica Pico-Tag <sup>®</sup> + HPLC para identificação de têmperas .....	29
5.2 Estudo do envelhecimento de aglutinantes de têmperas proteicas.....	31
5.3 Utilização do EDTA para inibir o efeito dos pigmentos sob as têmperas proteicas.....	47
5. Conclusões.....	49
6. Perspectivas futuras.....	51
Bibliografia.....	52
Anexos.....	56
1. Composição, em aminoácidos, de aglutinantes proteicos.....	56
2. Resultados de Colorimetria.....	57
3. Resultados de HPLC.....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Formação dum polipéptido pela ligação peptídica de aminoácidos.....	4
Figura 2 – Factores responsáveis pela degradação das obras de arte.....	8
Figura 3 – Espaço de cor CIELAB <sup>Adaptado de [27]</sup> .....	14
Figura 4 – Esquema de um sistema básico de HPLC.....	16
Figura 5 – A análise de aminoácidos é a hidrólise de uma proteína ou péptido nos seus componentes individuais como aminoácidos livres <sup>[20]</sup> .....	17
Figura 6 – Mecanismo da derivatização dos aminoácidos com PITC.....	18
Figura 7 – Cromatograma obtido por HPLC de 40 µl de padrão de aminoácidos.....	19
Figura 8 – Esquema básico de identificação de aglutinantes proteicos.....	20
Figura 9 - Cromatógrafo 600E da Waters (módulos Controlador 600E, Bombas 600E, desgaseificador <i>In-Line Degasser</i> da Waters e Injetor de amostras 717 <i>plus Autosampler</i> ).....	24
Figura 10 – Cromatógrafo Alliance 2795 da Waters e forno de coluna da Waters.....	24
Figura 11 – a) Câmara radiação UV Solarbox <sup>®</sup> 3000E; b) Envelhecimento das amostras na câmara radiação UV-Visível.....	26
Figura 12 – a) Câmara de Ensaio Climáticos Fitoclima 150 EDTU; b) e c) Envelhecimento das amostras na câmara climática.....	27
Figura 13 – Cromatograma das amostras: a) “Tinta de azurite + têmpera de gema”; b) “Tinta de malaquite + têmpera de gema”.....	28
Figura 14 – Cromatograma das amostras: a) “Têmpera de gema de ovo”; b) “Têmpera de Gelatina”; e c) “Têmpera de caseína”.....	29
Figura 15 – Espectrofotómetro Mercury <sup>®</sup> da DataColor Internacional.....	31
Figura 16 - Variação de L*, para o filme “Gema de ovo”, ao longo do envelhecimento na câmara de UV-Visível.....	32
Figura 17 - Variação de L*, para o filme “Gema de ovo”, ao longo do envelhecimento na câmara climática... ..	32
Figura 18 – Variação ao longo do tempo, para o filme “Gema de ovo”, para o envelhecimento nas câmaras de UV-Visível e climática de a) a* e b*; b) L*.....	32
Figura 19 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Gema de ovo”, durante os envelhecimento acelerados, e os valores padrão publicados e do LCR.....	35
Figura 20 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Gema de ovo” durante o envelhecimento: a) na câmara de UV-Visível; b) na câmara climática; e c) nas câmaras UV-Visível e climática.....	37
Figura 21 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de gema de ovo”, durante os envelhecimento acelerados, e os valores padrão publicados e do LCR.....	38
Figura 22 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento: a) na câmara de UV-Visível; b) na câmara climática; e c) nas câmaras UV-Visível e climática.....	39
Figura 23 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de gelatina”, durante o envelhecimento acelerado na câmara climática, e os valores padrão publicados e do LCR.....	40
Figura 24 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Têmpera de gelatina” durante o envelhecimento na câmara climática.....	40
Figura 25 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de caseína”, durante o envelhecimento acelerado na câmara climática, e os valores padrão publicados e do LCR.....	41
Figura 26 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Têmpera de caseína” durante o envelhecimento na câmara climática.....	41
Figura 27 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Preparação cola + gesso”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.....	42
Figura 28 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Preparação cola + gesso” durante o envelhecimento na câmara UV-Visível.....	42

Figura 29 – Cromatograma das amostras: a) Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo; b) Tinta de branco de chumbo + têmpera de gelatina; c) Tinta de bindheimite + têmpera de gema de ovo; d) Tinta de bindheimite + têmpera de gelatina; e) Tinta de hematite + têmpera de gema de ovo; f) Tinta de ouropigmento + têmpera de gelatina; g) Tinta de goetite + têmpera de gema de ovo; h) Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo; i) Tinta de realgar + têmpera de gelatina; j) Tinta de vermelhão + têmpera de gema de ovo; k) Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo; l) Tinta de azurite + têmpera de gelatina; m) Tinta de azurite + têmpera de caseína; n) Tinta de malaquite + têmpera de gema de ovo; o) Tinta de malaquite + têmpera de gelatina; p) Tinta de malaquite + têmpera de caseína; q) Tinta de terra verde + têmpera de gelatina.....	45
Figura 30 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.....	45
Figura 31 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento na câmara UV-Visível.....	46
Figuras 32 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.....	46
Figura 33 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento na câmara UV-Visível.....	47
Figura 34 – Cromatograma das amostras “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” sem adição de EDTA e com adição de 20 µl de 0,2 M EDTA em tampão cloreto de amónia .....	48
Figura 35 – Cromatograma das amostras “20 µl padrão de aminoácido + 1 mg Branco de chumbo” sem adição de EDTA e com adição de 20 µl de 0,2 M EDTA em tampão cloreto de amónia.....	48
Figura 36 – Cromatograma das amostras “Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo” sem adição de EDTA e com adição de 20 µl de 0,2 M EDTA em tampão cloreto de amónia.....	48
Figura 37 – Cromatograma das amostras “20 µl padrão de aminoácido + 1 mg de Azurite” sem adição de EDTA (a vermelho) e com adição de 20 µl de 0,2 M EDTA em tampão cloreto de amónia.....	48
Figura 38 – Cromatogramas dos filmes de 1976.....	72
Figura 39 – Cromatogramas dos filmes “Gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível.....	74
Figura 40 – Cromatogramas dos filmes “Gema de ovo” envelhecidos na câmara climática.....	75
Figura 41 – Cromatogramas dos filmes “Gema de ovo” envelhecidos nas câmaras UV-Visível e climática....	76
Figura 42 – Cromatogramas dos filmes “Têmpera de gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível..	77
Figura 43 – Cromatogramas dos filmes “Têmpera de gema de ovo” envelhecidos na câmara climática.....	78
Figura 44 – Cromatogramas dos filmes “Têmpera de gema de ovo” envelhecidos nas câmaras UV-Visível e climática.....	79
Figura 45 – Cromatogramas dos filmes “Têmpera de gelatina” envelhecidos na câmara climática.....	80
Figura 46 – Cromatogramas dos filmes “Têmpera de caseína” envelhecidos na câmara climática.....	81
Figura 47 – Cromatogramas dos filmes “Preparação de cola + gesso” envelhecidos na câmara de UV-Visível.....	82
Figura 48 – Cromatogramas dos filmes “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível.....	84
Figura 49 – Cromatograma dos filmes “Tinta de realgar + tempera de gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível.....	85

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – O Código dos Aminoácidos.....	4
Tabela 2 – Pigmentos naturais utilizados <sup>[10,13, 14]</sup> .....	7
Tabela 3 – Efeitos da hidrólise ácida em vários aminoácidos <sup>[4, 20]</sup> .....	18
Tabela 4 – Diferenças na quantidade relativa dos aminoácidos para as proteínas dos diversos aglutinantes proteicos.....	19
Tabela 5 – Correlação entre padrões de aglutinantes: valores publicados vs. Padrões do LCR.....	29
Tabela 6 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para os filmes “1976” e os valores padrão publicados e do LCR.....	30
Tabela 7 – Cor obtida no Photoshop correspondente aos parâmetros L*, a*, b* obtidos no DataColor para todos os filmes durante o envelhecimento natural e artificial nas várias câmaras.....	33
Tabela 8 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Gema de ovo”, durante o envelhecimento acelerados, e os valores padrão publicados e do LCR.....	35
Tabela 9 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de gema de ovo”, durante os envelhecimento acelerados, e os valores padrão publicados e do LCR.....	38
Tabela 10 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de gelatina”, durante o envelhecimento acelerado na câmara climática, e os valores padrão publicados e do LCR.....	40
Tabela 11 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de caseína”, durante o envelhecimento acelerado na câmara climática, e os valores padrão publicados e do LCR.....	41
Tabela 12 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Preparação cola + gesso”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.....	42
Tabela 13 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.....	45
Tabela 14 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.....	46
Tabela 15 – Composição em aminoácidos de padrões de referência: publicados <sup>[5]</sup> e do LCR.....	56
Tabela 16 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	57
Tabela 17 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	57
Tabela 18 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para os filmes “Preparação de gelatina + Gesso” e “Preparação de gelatina + cré” durante o envelhecimento natural.....	58
Tabela 19 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Preparação de cola + gesso” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	58

Tabela 20 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Preparação de cola + gesso” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	59
Tabela 21 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	59
Tabela 22 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	60
Tabela 23 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de bindheimite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	60
Tabela 24 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de bindheimite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	60
Tabela 25 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de hematite+ têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	61
Tabela 26 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	61
Tabela 27 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de ouropigmento + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	62
Tabela 28 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de ouropigmento + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	62
Tabela 29 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de goetite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	63
Tabela 30 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de goetite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado. ....	63
Tabela 31 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado. ....	64
Tabela 32 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de goetite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado. ....	64
Tabela 33 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de vermelhão+ têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado. ....	65
Tabela 34 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de vermelhão + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural. ....	65
Tabela 35 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado. ....	66

Tabela 36 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de azurite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	66
Tabela 37 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de azurite + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado. ....	66
Tabela 38 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de ultramarino + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado. ....	67
Tabela 39 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de ultramarino + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	67
Tabela 40 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de ultramarino + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	67
Tabela 41 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de malaquite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	68
Tabela 42 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de malaquite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	68
Tabela 43 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de malaquite + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	68
Tabela 44 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de terra verde + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	69
Tabela 45 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de terra verde + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	69
Tabela 46 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de terra verde + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	69
Tabela 47 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de crisocola + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	70
Tabela 48 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de crisocola + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.....	70
Tabela 49 – Parâmetros L*, a*, b*, c* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no Photoshop para o filme “Tinta de crisocola + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.....	70
Tabela 50 – Composição em aminoácidos dos filmes “1976” .....	73
Tabela 51 – Composição em aminoácidos dos filmes “Gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.....	74
Tabela 52 – Composição em aminoácidos dos filmes “Gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.....	76
Tabela 53 – Composição em aminoácidos dos filmes “Gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado nas câmaras UV-Visível e climática.....	76

Tabela 54 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.....	77
Tabela 55 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.....	79
Tabela 56 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado nas câmaras UV-Visível e climática.....	79
Tabela 57 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gelatina” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.....	80
Tabela 58 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de caseína” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.....	81
Tabela 59 – Composição em aminoácidos dos filmes “Preparação cola + Gesso” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.....	83
Tabela 60 – Composição em aminoácidos dos filmes “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.....	84
Tabela 61 – Composição em aminoácidos dos filmes “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.....	85

# 1. INTRODUÇÃO

A conservação e protecção da nossa herança cultural é fundamental para assegurar que as próximas gerações tenham a oportunidade apreciar as grandes obras de arte. A ciência, por seu lado, pode ajudar a compreender a natureza dos materiais que os artistas usam, auxiliando na escolha dos procedimentos de conservação.

Relativamente à pintura, a caracterização química dos seus materiais constituintes permite aos conservadores/restauradores e aos historiadores de arte i) dar indicações sobre a proveniência dos objectos<sup>1</sup>, (ii) auxiliar o estudo da técnica do artista<sup>2</sup>, (iii) melhorar a conservação/restauração.<sup>[1]</sup>

Uma pintura é constituída, geralmente, de várias camadas: suporte (madeira, tela, papel, etc.), camada de preparação (gesso ou cré), uma ou mais camadas de tinta e, eventualmente, uma camada final de verniz. Na preparação das tintas são usados muitas vezes aglutinantes proteicos, numa técnica conhecida por *têmpera*. A identificação dos aglutinantes proteicos como a têmpera de ovo, cola ou gelatina e caseína, aplicadas em camadas ou como misturas, pode, por um lado, revelar a intenção original do artista, facultando a compreensão da sua técnica, e por outro, propiciar a explicação do facto das superfícies das pinturas serem afectadas diferentemente ao longo do tempo. Assim, torna-se necessária a correcta identificação do tipo de aglutinantes proteicos utilizados numa obra de arte. A possibilidade de identificação pode ser dificultada por outros materiais existentes nas obras de arte, como os pigmentos, e pelo envelhecimento, ao longo do tempo, sob influência de factores atmosféricos como a radiação, temperatura e humidade.

Para a identificação do tipo de aglutinantes usados são frequentemente usadas técnicas de coloração e métodos espectroscópicos, que permitem a detecção de proteínas mas não são específicas para cada tipo de proteína. Para se conseguir esta especificidade é possível usar outras técnicas como técnicas imunológicas, DPMS, electroforese, HPLC-MS, HPLC-ESI-TOF e MALDI.<sup>[2]</sup> No entanto, algumas destas técnicas ainda não estão optimizadas para utilização em obras de arte ou são muito dispendiosas. Assim, as técnicas adequadas para identificação de têmperas proteicas são as técnicas cromatográficas, como cromatografia gasosa (GC)<sup>[4, 5]</sup> ou líquida de elevada eficiência (HPLC)<sup>[2, 3]</sup>.

Devido ao equipamento disponível no LCR, decidiu-se implementar um método para a identificação de aglutinantes proteicos que recorre à metodologia HPLC. Usando esta tecnologia existem vários tipos de métodos como (i) HPLC-UV<sup>3</sup> <sup>[3,5]</sup>; (ii) HPLC-fluorescência<sup>4</sup> <sup>[2]</sup>; (iii) troca iónica<sup>[7]</sup>. Como o detector disponível no LCR é do tipo UV, escolheu-se pela primeira opção.

---

<sup>1</sup> Ao longo do tempo, os artistas têm experimentado diversos aglutinantes; uma tabela de tempo dos diversos aglutinantes usados ao longo do tempo pode auxiliar a confirmar a que período pertence determinado artefacto

<sup>2</sup> Os artistas têm usado várias receitas de aglutinantes que dependem de como pretendem modificar o manuseamento e/ou propriedades ópticas da pintura.

<sup>3</sup> Agente de derivatização – fenilisotiocianato.

<sup>4</sup> Agente de derivatização – 9-fluorenyl de metilo ou *o*-ftaldialdeído.

Assim, este estudo consistiu na implementação da técnica de análise Pico-Tag<sup>®</sup> para identificação de aglutinantes proteicos (com utilização de cromatografia líquida de elevada eficiência, HPLC), no estudo da influência dos pigmentos na degradação das proteínas por vários tipos de envelhecimento e no estudo da possibilidade de utilização do EDTA como agente capaz de inibir a influência dos pigmentos na identificação das têmperas.

Esta dissertação está organizada em sete capítulos. No primeiro capítulo, faz-se uma introdução contextualizando o trabalho desenvolvido, expondo os objectivos e a motivação para a sua realização. Descreve-se também o modo como se encontra estruturada a dissertação.

No segundo capítulo, encontra-se uma descrição dos constituintes das têmperas proteicas: aglutinantes e pigmentos. Assim, são descritos aspectos gerais sobre os diferentes aglutinantes proteicos, nomeadamente os seus constituintes, modo de fabrico e propriedades. Neste capítulo é também abordado o envelhecimento acelerado e a sua correlação com o envelhecimento natural. São ainda descritas as reacções gerais de degradação de proteínas, que podem ocorrer ao longo do envelhecimento de uma obra de arte.

No terceiro, capítulo expõe-se resumidamente os conceitos teóricos das técnicas analíticas utilizadas neste estudo: cromaticidade, cromatografia líquida de elevada eficiência em fase reversa e análise de aminoácidos pela técnica Pico-Tag<sup>®</sup>.

No quarto capítulo, referente à parte experimental, são indicadas as metodologias implementadas durante o estágio, os materiais e reagentes utilizados em todos os estudos efectuados e no quinto capítulo são apresentados os resultados obtidos efectuando-se uma análise crítica destes.

No sexto capítulo são apresentadas as conclusões e no sétimo e último capítulo efectua-se sugestões para a continuação do trabalho.

No fim da dissertação, encontra-se a bibliografia consultada, seguindo-se ainda anexos onde constam os resultados obtidos.



## 2. A PINTURA A TÊMPERA

O termo *têmpera* é usado para definir um meio de pintura, que consiste numa mistura de pigmento e aglutinante, onde este mantém as partículas de pigmento em suspensão numa tinta. No final do séc. XV, este termo incluía provavelmente todos os meios de pintura, mas, com a prevalência gradual do óleo, passou a limitar-se a meios preparados a partir do ovo. No entanto, uma definição mais abrangente inclui outros materiais proteicos, como a albumina, o colagénio e a caseína, definindo-se “têmpera de ovo”, “têmpera de caseína” e “têmpera de cola”, entre outras. Se usadas apropriadamente, a sua estabilidade a várias condições atmosféricas é excepcional, quando comparada com o amarelecimento e enfraquecimento de resinas e óleos envelhecidos.<sup>[8,9]</sup>

### 2.1 Aglutinantes proteicos

Os aglutinantes são substâncias capazes de (i) cobrir cada partícula de pigmento e mantê-la em suspensão, (ii) aderir a camada de tinta ao substrato, (iii) conceder propriedades ópticas que intensifiquem a cor natural, e (iv) proteger as partículas de pigmentos de eventuais danos ambientais.

As proteínas são constituintes importantes de três tipos de aglutinantes já referidos: cola, ovo (clara e gema) e caseína. Em seguida, apresenta-se um resumo da química das proteínas e dos três tipos de proteínas mais comuns nestes aglutinantes.

#### 2.1.1 As proteínas

As proteínas são componentes muito importantes dos seres vivos, pois garantem a manutenção da sua estrutura (ex.: colagénio) e funcionalidade (ex.: enzimas). Nas obras de arte, algumas proteínas são excelentes adesivos, ao ponto do termo *cola*<sup>5</sup> se ter generalizado e ser sinónimo de *colante*.<sup>[10]</sup>

As proteínas são polímeros de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Os aminoácidos são formados por cadeias carbonadas com uma função ácido carboxílico e uma função amina, unidas como esquematizado na Figura 1.

---

<sup>5</sup> Provém de *cola animal*.

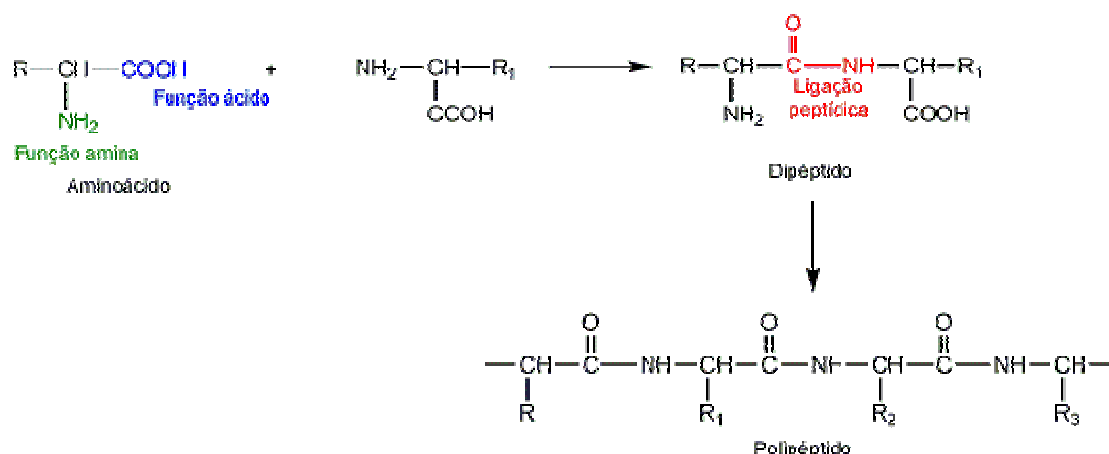


Figura 1 – Formação dum polipéptido pela ligação de aminoácidos.

Os polipéptidos são o produto da condensação dos aminoácidos por ligações peptídicas (dipéptidos, tripéptidos, etc.), compostos por um número limitado de aminoácidos. As proteínas são polipéptidos de elevado peso molecular. Nas proteínas naturais, podem encontrar-se cerca de 20 aminoácidos diferentes, identificados na Tabela 1. As que dão lugar a substâncias filmogéneas encontram-se descritas nos tópicos seguintes.

Tabela 1 – O Código dos Aminoácidos

A	Ala	Alanina	G	Gly	Glicina	P	Pro	Prolina
R	Arg	Arginina	H	His	Histidina	S	Ser	Serina
N	Asn	Asparagina	I	Ile	Isoleucina	T	Thr	Treonina
D	Asp	Ácido Aspártico	L	Leu	Leucina	W	Trp	Triptofano
C	Cys	Cisteína	K	Lys	Lisina	Y	Tyr	Tirosina
Q	Gln	Glutamina	M	Met	Metionina	V	Val	Valina
E	Glu	Ácido Glutâmico	F	Phe	Fenilalanina			

### 2.1.2 Gelatina e cola animal

A cola animal, provavelmente o aglutinante mais utilizado historicamente<sup>6</sup>, tem sido usada como aglutinante da pintura a têmpera e como adesivo e consolidante, sozinha ou misturada com amidos. Foi também muito usada nas camadas de preparação de pintura (gesso ou cré) e também se aplica na formação de estuques, para preencher lacunas das preparações em pinturas e policromias<sup>7</sup>. Foram também utilizadas, muito possivelmente, misturas de cola animal com outros aglutinantes, como emulsões de óleo-cola animal, meio com propriedades ótimas para pinturas detalhadas<sup>[10, 11]</sup>

As colas animais são baseadas na proteína colagénio, a proteína mais comum nos animais. O colagénio é uma *proteína fibrilar* que existe na forma de uma hélice tripla de três cadeias de aminoácidos. Cada cadeia, que contém mais de mil unidades de aminoácidos, tem um peso molecular de cerca de 100.000 daltons. As cadeias mantêm-se unidas através de ligações de hidrogénio e algumas ligações covalentes, sendo que estas últimas aumentam com a idade do colagénio. O

<sup>6</sup> É possível encontrar pinturas cujas tintas são à base de cola, na China, na Índia e antigo Egipto; a cola era também usada nas iluminuras medievais e em pinturas em tela na Europa.

<sup>7</sup> As colas de peixe e sobretudo de esturção são as mais puras para a fixação de camadas pictóricas.

colagénio também contém, quimicamente ligado, um componente minoritário de hidratos de carbono. Na transformação em gelatina (que ocorre no processo de fabrico das colas), as pontes de hidrogénio que ligam a hélice tripla desaparecem, formando uma cadeia linear. Na sua forma nativa, o colagénio é praticamente insolúvel em água, formando dispersões coloidais aquosas.<sup>[10, 11]</sup>

O colagénio extrai-se do tecido conectivo branco da pele, ossos, tendões e cartilagens de diversos animais. Foram identificadas cinco variantes diferentes de colagénio em vertebrados, embora a sua composição em aminoácidos seja muito semelhante. O colagénio também ocorre na pele dos peixes e é, essencialmente, o único componente da bexiga-natatória do esturjão.<sup>[10, 11]</sup>

Uma das propriedades relevantes do colagénio, que o torna útil como aglutinante, é poder ser solubilizado em água quente. As preparações de colagénio usadas hoje em dia envolvem normalmente o tratamento com ácidos ou bases, que degradam o colagénio em vez de simplesmente o solubilizarem. Assim, o peso molecular das cadeias numa cola é muitas vezes muito menor que o das cadeias no estado nativo; de facto, a maioria das colas comerciais contém moléculas com uma grande variedade de pesos moleculares.<sup>[12]</sup>

A gelatina é muito semelhante à cola, mas é um material mais puro, pois o seu fabrico sofre condições de processamento e controlo mais rigoroso que as colas. Um filme seco de gelatina consiste em cadeias de colagénio ordenada. Este filme absorve rapidamente água e perde resistência no processo.

Nas tintas à base de cola, a quantidade de aglutinante é baixa relativamente à de pigmento, pelo que a tinta tende a ser porosa e mate. A capacidade que as três cadeias de moléculas de colagénio têm de esticar dá às tintas de cola uma flexibilidade que as tintas de ovo (que contêm proteínas globulares) não têm.<sup>[12]</sup>

### 2.1.3 Gema de ovo

O termo *têmpera* é um termo geral para tintas à base de água, mas normalmente refere-se a tintas cujo aglutinante é a gema de ovo (*têmpera de ovo*).<sup>[12]</sup>

Os sólidos da gema de ovo, que constituem mais de metade da gema de ovo em peso, consistem em um terço de proteínas e dois terços de lípidos. Pequenas quantidades de corantes naturais produzem a sua característica cor amarela. Tal como a clara de ovo, a gema de ovo contém numerosas proteínas, algumas das quais ligadas quimicamente a fosfatos ou a hidratos de carbono. As proteínas do ovo pertencem às *proteínas globulares* (globulinas), que têm forma arredondada. A clara do ovo tem ovalbumina, de elevado conteúdo em leucina e ácidos aspártico e glutâmico, enquanto a gema, para além de globulinas semelhantes à clara, contém lípidos e um fosfolípido (lecitina), que actua como emulsionante.<sup>[10]</sup>

Para ser usada como aglutinante, a gema de ovo é simplesmente diluída em água e misturada com pigmentos. Os componentes lipídicos contribuem para a flexibilidade do filme, pelo que não se verificam os padrões típicos de *stress* que ocorrem noutros aglutinantes à base de proteínas.<sup>[10, 11]</sup>

O uso principal da gema de ovo como meio de pintura é em Pintura Medieval Italiana e no início da Renascença, embora tenha sido usada pontualmente noutras ocasiões<sup>[12]</sup>

#### 2.1.4 Caseína

Por definição, caseína refere-se a um grupo de várias proteínas que se encontram no leite, 80% das quais são realmente caseína. A caseína é considerada uma proteína conjugada ou heteroproteína, pois encontra-se unida a um grupo prostético de natureza não proteica.

A tinta de caseína pode ser muito variada em termos de composição e propriedades, dependendo da maneira como é preparada. Qualquer que seja a formulação, os filmes de tinta de caseína são quebradiços, porosos e mate. A tinta de caseína mais simples envolve simplesmente a mistura de leite com os pigmentos. Uma tinta de caseína pura pode ser produzida começando com coalho, precipitado do soro do leite e rico em caseína (as proteínas tornam-se instáveis sob condições ácidas). O coalho lavado, seco e precipitado é altamente insolúvel em água mas pode ser solubilizado por adição de uma base.<sup>[12]</sup>

Enquanto os outros aglutinantes proteicos evidenciam variações de composição mínimas de uma amostra para outra, os de caseína podem evidenciar variação considerável dependendo do método de preparação. Por esta razão, as reacções de degradação podem variar consideravelmente de uma caseína para outra. Por exemplo, reacções entre açúcares e componentes proteicos, assim como entre lípidos e componentes proteicos, podem ser potencialmente mais importantes em caseínas menos puras.

O caseinato de cálcio é insolúvel, e usa-se como consolidante na pintura a fresco, para além de também ter sido utilizado nas preparações de pinturas do séc. XIX.<sup>[10, 11]</sup>

## 2.2 Pigmentos

Os pigmentos usados em obras de arte são substâncias orgânicas ou inorgânicas, de origem natural ou artificial, insolúveis no aglutinante, com o qual formam a tinta. O número de pigmentos utilizado ao longo do tempo tem crescido, principalmente nos últimos dois séculos, como consequência do desenvolvimento da química, mas muitos dos pigmentos foram usados preferencialmente numa determinada época, tendo sido abandonados quando aparecia outro mais vantajoso: tom, transparência ou outras propriedades ópticas, reactividade química, toxicidade ou motivos económicos.

O principal objectivo deste estudo era analisar a influência dos pigmentos nos aglutinantes proteicos. Assim, de todos os pigmentos disponíveis no LCR, escolheram-se 12 pigmentos naturais (Tabela 2).

Tabela 2 – Pigmentos naturais utilizados<sup>[10, 13, 14.]</sup>

Nome do Pigmento	Aparência	Características
Branco de chumbo (Hidrocerussite) $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$		É o pigmento branco mais antigo (descoberto na Antiguidade) e ainda é usado actualmente. Foi o único branco usado na pintura europeia até ao séc. XIX, altura em que foi substituído pelo branco de zinco e, quase totalmente substituído pelo branco de titânio no séc. XX.
Bindheimite Bleinierite $\text{Pb}_2\text{Sb}_2\text{O}_6 (\text{O}, \text{OH})$		Data do séc. XVI mas é usado raramente como pigmento, sendo preterido pelo amarelo de Nápoles.
Hematite Ocre vermelho $\text{Fe}_2\text{O}_3$		É um dos pigmentos mais antigos conhecidos pela humanidade e foi utilizado por todas as grandes civilizações.
Ouropigmento $\text{As}_2\text{S}_3$		Pigmento muito antigo (séc. XXXI A.C), podendo ser encontrado em objectos Egípcios, Gregos, Romanos e da idade Média. Durante a Renascença, foi importado de Veneza para a Ásia menor, tendo sido usado no Médio Oriente e Ásia até ao final do séc. XIX.
Goetite Ocre castanho $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$		Usado como pigmento desde tempo pré-históricos.
Realgar $\text{As}_4\text{S}_4$		Pigmento usado desde o antigo Egipto e antiga Mesopotâmia até ao séc. XIX.
Vermelhão Cinábrio $\text{HgS}$		Usado desde a Antiguidade (antes do séc. VI A.C) até a meio do séc. XX, quando foi praticamente abandonado devido à sua toxicidade.
Azurite $\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$		Foi usado ocasionalmente no antigo Egipto, mas raramente até à Idade Média. Durante a idade Média e a Renascença, foi o pigmento mais importante na pintura europeia. Foi substituído pelo azul da Prússia no séc. XVIII.
Ultramarino $\text{Na}_8\text{-}_{10}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$		É conhecido por ter sido o pigmento mais dispendioso. Era mais caro que o ouro na renascença. Começou por ser usado no séc. VI no Afeganistão, sendo utilizado nos séc. XIV e XV principalmente em mantos do Cristo e da Virgem. No séc. XIX desenvolveu-se a forma artificial deste pigmento que continua a ser usada hoje em dia.
Malaquite $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$		Ocorre desde o antigo Egipto e parece ter tido uma grande importância, na pintura europeia dos séc. XV e XVI.
Terra Verde (Celadonite, Glauconite) $\text{K}[(\text{Al}, \text{Fe}^{\text{III}}), (\text{Fe}^{\text{II}}, \text{Mg})] (\text{AlSi}_3, \text{Si}_4)\text{O}_{10}(\text{OH})_2$		Usado frequentemente em pintura medieval como pintura subjacente de carnações. A sua utilização diminui depois da Renascença.
Crisocola $\text{CuSiO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$		Utilizado desde a Antiguidade.

## 2.3 Envelhecimento acelerado vs. natural

O objectivo principal nas acções de conservação e restauro é preservar as características originais da obra de arte e, para tal, é necessário um conhecimento detalhado e minucioso da degradação física e química dos materiais. Por essa razão é importante o estudo do envelhecimento dos materiais.

A degradação dos materiais pode ser accionada por agentes intrínsecos, extrínsecos, impostos e antropológicos, como esquematizado na Figura 2. De salientar que, na maioria das vezes, o envelhecimento dos materiais é provocado pela combinação destes agentes.

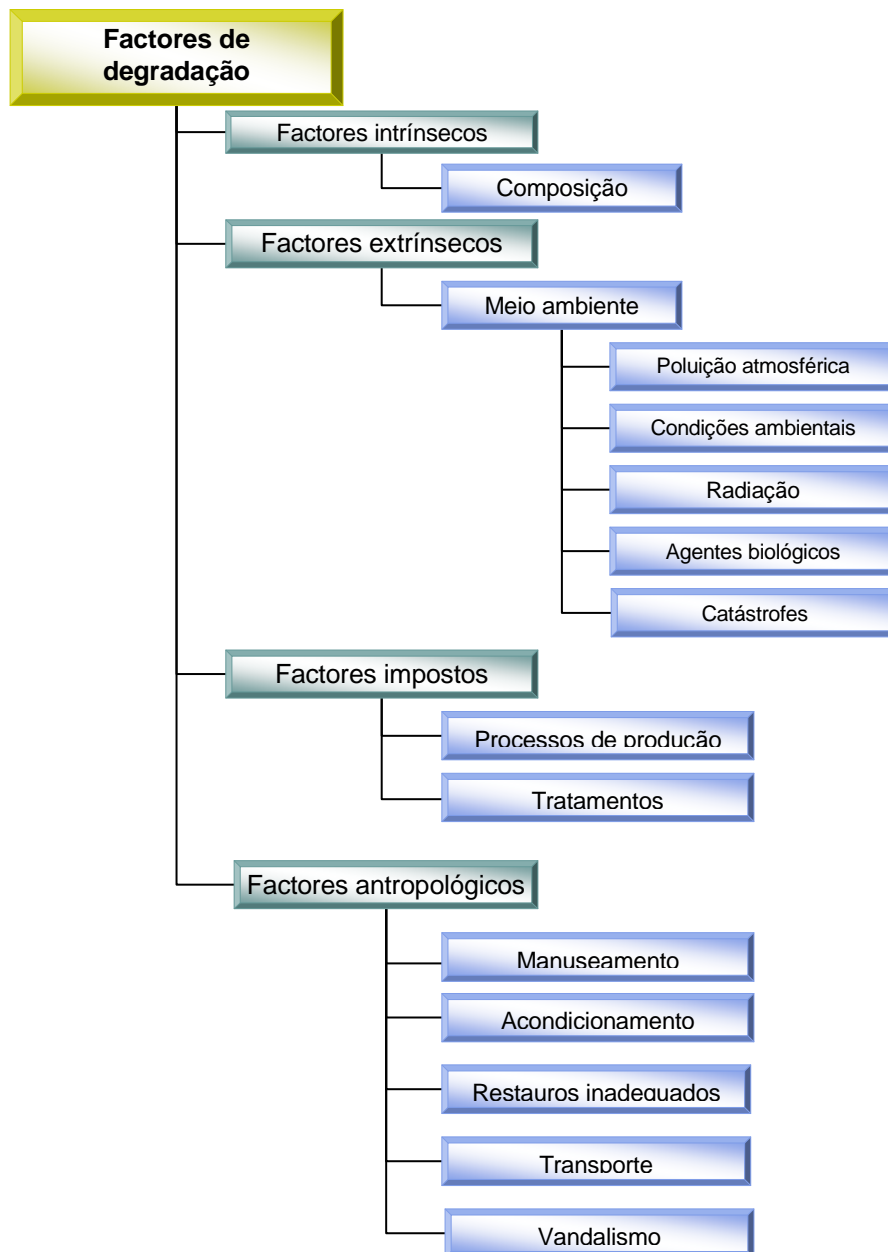


Figura 2 – Factores responsáveis pela degradação das obras de arte.

O envelhecimento natural é um processo muito lento que, no caso das obras de arte, pode levar centenas de anos, sendo impossível de estudar num tempo de vida útil. Assim, utilizam-se técnicas de envelhecimento acelerado ou artificial que aceleram as reacções de degradação, simulando o envelhecimento natural mas num curto período de tempo. Assim, o envelhecimento artificial consiste, normalmente, numa exposição a factores potencialmente danificadores controlados (como temperatura, radiações, e humidade), de modo a estudar as reacções que ocorrem. No entanto, a correlação entre o envelhecimento acelerado e o natural não é fácil, pois, para além de ocorrerem em simultâneo várias reacções químicas, algumas delas pouco conhecidas, é normalmente baseada em tratamentos matemáticos complexos.<sup>[15]</sup> Apesar disso, é possível estabelecer uma correlação entre envelhecimento acelerado e natural em ensaios de exposição à luz em que se utiliza uma lâmpada de Xénon como fonte, pois o seu espectro é idêntico ao da luz solar ou da luz do dia que passa através de janelas de vidro, utilizando filtros.<sup>[16]</sup> Neste tipo de ensaios, a aceleração da degradação de um material pode ser obtida admitindo a lei da reciprocidade: a acção de luz é cumulativa, isto é, a exposição total (produto da iluminância pelo tempo) determina o efeito deteriorativo.

### 2.3.1 Mecanismos gerais de degradação das proteínas em tēperas

O envelhecimento físico é um factor que influencia significativamente a identificação das proteínas. As proteínas são susceptíveis aos efeitos do envelhecimento e certos aminoácidos, como a cisteína e a metionina, são mais susceptíveis a alterações químicas e decomposição que outros.<sup>[9]</sup> No entanto, o impacto do envelhecimento físico na identificação cromatográfica de proteínas ainda tem de ser compreendido.

As reacções químicas que ocorrem nas proteínas dos aglutinantes proteicos começam na sua aplicação nas obras de arte e continuam ao longo dos séculos, criando material proteico por vezes dificilmente comparável às proteínas no seu estado nativo. Estas alterações nas proteínas produzem-se desde logo no processo de secagem dos aglutinantes e continuam, sob influência da humidade, radiação e calor. Para além disso, ocorrem ainda reacções com outros componentes da mistura (como lípidos oxidantes, hidratos de carbono, bases, ácidos<sup>8</sup>, solventes e pigmentos<sup>9</sup>) ou de agentes externos (como poluição e microrganismos<sup>10</sup>). Alguns dos efeitos do envelhecimento são evidentemente deteriorativos, mas outros podem ser desejados, tendo em vista o aumento da durabilidade adquirido com o tempo (ex: dureza e insolubilidade).<sup>[9]</sup>

Dependendo do conteúdo em cada aminoácido, de variações estruturais iniciais e da acessibilidade dos grupos laterais quimicamente activos, vão ser predominantes diferentes as vias de reacção nas várias proteínas. Alterações nos grupos laterais dos aminoácidos, ligações cruzadas ou cisão da cadeia peptídica, verificam-se na ruptura da estrutura da proteína<sup>[9]</sup>

---

<sup>8</sup> As proteínas são rapidamente hidrolisadas na presença de soluções ácidas. Uma pequena quantidade de hidrólise reduz rapidamente o peso molecular de uma proteína, enfraquecendo a sua capacidade de aglutinante.<sup>[12]</sup>

<sup>9</sup> Os pigmentos ácidos na presença de água podem exemplo, podem provocar a hidrólise parcial das proteínas do aglutinante e formar sais inorgânicos, com a libertação de aminoácidos ou fragmentos de proteínas.

<sup>10</sup> Os microorganismos, ou mesmo enzimas encontradas naturalmente em alguns aglutinantes, podem hidrolisar rapidamente as proteínas.

Não é de esperar que proteínas diferentemente envelhecidas evidenciem características físico-químicas semelhantes. Proteínas que contenham enxofre (ovo, caseína) são mais lábeis e é mais provável que ocorram ligações cruzadas e oxidação. É de esperar que a cola animal (que não tem aminoácidos com enxofre) seja relativamente mais estável, o que não é surpreendente, considerando a reversibilidade preservada em tratamentos com água de preparações de gesso. Este efeito pode ser provocado pela protecção do gesso contra a luz através de várias camadas de tinta, ou pode ser devido ao “gel”, estrutura organizada da gelatina, em comparação com uma distribuição aleatória de moléculas proteicas isoladas numa camada seca de proteínas de ovo ou caseína.<sup>[9]</sup>

Os factores que podem influenciar a ocorrência de alterações na estrutura das proteínas são: processo de secagem, oxidação induzida pela radiação, reacções entre as proteínas e os outros componentes da mistura de têmpera, efeitos deteriorantes dos agentes químicos.<sup>[9]</sup>

#### **Processo de secagem**

Durante o processo de secagem, a proteína perde água continuamente até atingir um equilíbrio de humidade com o ar circundante, rearranjando a sua estrutura, podendo desnaturar total ou parcialmente. Depois de alcançar a estrutura final, esta proteína “seca” vai ter propriedades físicas novas (ex: diminuição da solubilidade em água). Este grau de desnaturação das proteínas secas é dificilmente previsível e depende da velocidade de evaporação da água, humidade relativa, temperatura e do tipo de proteína desidratada. A estrutura final da gelatina e o seu conteúdo em água não pode ser comparada à caseína ou à gema ou à clara de ovo. Para além disso, as flutuações de humidade e temperatura dia/noite e sazonais levam a arranjos subsequentes na estrutura das proteínas. Alguns modos de preparação de têmperas proteicas podem resultar na desnaturação mesmo antes da desidratação. O bater a clara de ovo e a acção de agentes desnaturantes como fluidos não aquosos em emulsões de têmperas, assim como alcalis na caseína, são alguns dos exemplos mais notáveis.<sup>[9]</sup>

#### **Oxidação induzida pela radiação**

Os aglutinantes aplicados numa obra de arte estão sujeitos à oxidação induzida pela luz visível e ultravioleta e este mecanismo de oxidação envolve a formação de radicais livres. Os compostos insaturados, como as tintas poli-insaturadas, seguem uma cadeia de reacções auto-catalisadas: “auto-oxidação”. A oxidação de proteínas irradiadas, no entanto, ocorre provavelmente somente na presença de fotossensibilizadores. Neste caso, a irradiação leva à excitação de moléculas no sensibilizador que, por sua vez, inicia a produção de hidroperóxidos e radicais livres.<sup>[9]</sup>

Os resíduos na cadeia peptídica que são mais susceptíveis de foto-oxidação são: histidina, triptofano, tirosina, metionina, cistina e cisteína. Assim, a gelatina e a cola animal permanecem relativamente estáveis à foto-oxidação, devido ao seu baixo conteúdo de histidina e tirosina e pela ausência de aminoácidos com enxofre e triptofano.<sup>[9]</sup>

Alguns dos pigmentos orgânicos ou artificiais podem actuar como sensibilizadores do processo de foto-oxidação das proteínas.<sup>[9]</sup>



### **Reacções entre as proteínas e os outros componentes da mistura de têmpera**

As proteínas, numa têmpera, podem reagir com outros componentes da mistura como lípidos ou hidratos de carbono.

Os sistemas lípido–proteínas podem ser encontrados na gema de ovo e outras emulsões de tinta como ovo + óleo, cola animal + óleo, caseína + óleo, etc. Algumas interacções deste tipo podem ser esperadas em têmperas proteicas cobertas e humidificadas com uma camada de óleo. Durante o processo de oxidação lipídica, são produzidos radicais livres peróxi, alcóxi e lipídicos. Os radicais detectados em sistemas lípido–proteínas desidratados são considerados agentes que provocam a degradação das proteínas. A exposição das proteínas a lípidos peroxidantes resulta em reacções semelhantes às observadas em proteínas expostas a radiações ionizantes. O acastanhamento das emulsões de têmpera é provavelmente provocado por estas reacções.<sup>[9]</sup>

Os sistemas proteína–hidratos de carbono podem ser encontrados em glicoproteínas da clara de ovo, caseína de queijo cru com impurezas de açúcares, misturas de proteínas com gemas e algumas adições de mel, açúcar e sumos naturais e alguns tipos de colas. A condensação de aminoácidos ou proteínas com hidratos de carbono com grupos carbonilo é conhecida como a reacção de Maillard. São produzidos polímeros insolúveis de cor castanha, com grupos livres carboxilo e fenólico e são bloqueados os grupos amino da lisina. Para além do açúcar, os óleos sofrem auto-oxidação e podem contribuir com grupos carbonilo para a reacção de Maillard.<sup>[9]</sup>

### **Efeitos deteriorantes dos agentes químicos**

Agentes químicos como solventes, ácidos e bases podem também acelerar a degradação das proteínas<sup>[9]</sup>

O uso de bases fortes em conservação foi abandonado há muito tempo. Recentemente, têm sido usadas bases fracas como a amónia e alguns detergentes alcalinos. O melhor exemplo de tratamento severo com alcalis em proteínas é a têmpera de caseína, que requer quantidades consideráveis de base para se tornar possível de aplicar, e algumas técnicas de pintura mural.<sup>[9]</sup>

Os ácidos fracos e diluídos são por vezes usados para limpar ou remover têmperas de pinturas. Como as proteínas são sensíveis a alterações de pH, os tratamentos ácidos deste tipo levam à desnaturação (pela quebra das pontes de hidrogénio e interacções iónicas), que, por sua vez, provoca um enfraquecimento estrutural e a sua “remoção” rápida.

Efeitos semelhantes são possíveis de encontrar em tintas exposta ao ataque de poluentes atmosféricos (ex: SO<sub>2</sub>).

Sabe-se que mesmo os solventes orgânicos não-polares desnaturam as proteínas. O efeito mais profundo em têmperas proteicas é provavelmente o de álcoois de baixo peso molecular que tendem a remover a água ligada estruturalmente às proteínas. Como o conteúdo de água é essencial para manter a estrutura da proteína e a acessibilidade a grupos laterais da cadeia, a acção dos álcoois pode alterar totalmente as propriedades químicas e físicas das proteínas e torná-las vulneráveis a vários agentes químicos e atmosféricos. É de esperar que pinturas proteicas com estruturas relativamente estáveis criadas durante o envelhecimento enfraqueçam, ou que ocorram alterações imprevisíveis durante alguns tratamentos de transferência ou limpeza.<sup>[9]</sup>

Alguns solventes orgânicos podem ser quimicamente reactivos. O tricloroetileno, por exemplo, reage com a cisteína para produzir diclorovinil-cisteína.

Alguns agentes esterilizantes, insecticidas ou branqueadores, podem participar em reacções químicas de proteínas (o dióxido de etileno é capaz de formar ésteres com grupos carboxilo livres). A sua reactividade deve ser tomada em consideração.

Em algumas condições de humidade, as proteínas são vulneráveis ao ataque pelos microrganismos, que utilizam os aminoácidos ou outros constituintes da tinta. Os metabolitos destas substâncias podem provocar reacções deteriorantes posteriores, mesmo quando o crescimento dos organismos é inibido.

### 3. CARACTERIZAÇÃO DE AGLUTINANTES PROTEICOS EM OBRAS DE ARTE

A identificação de constituintes orgânicos em pintura, particularmente aglutinantes proteicos, continua a ser um desafio para os químicos pelos seguintes motivos: (i) são normalmente materiais complexos, (ii) com o envelhecimento, as proteínas desnaturam e podem tornar-se insolúveis em água ou solventes orgânicos; (iii) várias substâncias orgânicas naturais ou sintéticas podem estar simultaneamente presentes na obra de arte; (iv) podem estar presentes também compostos de degradação, formados durante o envelhecimento, tratamentos de restauro ou poluição; (v) nas amostras heterogêneas de pinturas, é encontrado um baixo conteúdo proteico (no máximo 0,1 mg).

Para a identificação e quantificação dos constituintes proteicos utilizam-se normalmente técnicas cromatográficas.

Há, no entanto, vários factores que limitam a sua aplicabilidade como: (i) a pequena quantidade das amostras (que varia entre 1 µg a 0,1 mg), (ii) a possibilidade de ocorrer misturas de têmperas, (iii) o envelhecimento; (iv) interferência de pigmentos, e (v) dificuldade extrema em re-solubilizar alguns dos aglutinantes (como têmpera de ovo).<sup>[16]</sup> Para além disto, os resultados na análise qualitativa de aminoácidos, usada na identificação dos meios proteicos, não estão isentos de erros.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foi otimizada a técnica de análise de aminoácidos Pico-Tag<sup>®</sup><sup>[3, 5]</sup>. Este foi o método escolhido principalmente devido à sua versatilidade e fácil aplicação em obras de arte<sup>[3]</sup>, e devido ao equipamento estar disponível no LCR.

Como também foi feito um estudo de envelhecimento, foi também efectuada uma análise colorimétrica das amostras, para analisar as alterações da cor ao longo dos diversos tipos de envelhecimento.

De seguida são descritas estas duas técnicas: Cromaticidade e Pico-Tag<sup>®</sup>, que recorre à tecnologia HPLC.

### 3.1 Cromaticidade

O termo “cor” tem diferentes significados, consoante a área onde é usado: pode referir as propriedades das fontes de luz ou da superfície de objectos. De qualquer das formas, a cor deve ser medida fisicoquimicamente de modo a poder-se gravar e reproduzir a mesma cor. A percepção da cor é um fenómeno físico-químico, e a medição da cor deve ser definida de tal forma que os resultados se correlacionem com a sensação visual da cor para o ser humano observador. A *colorimetria* é a ciência e a tecnologia usada para quantificar e descrever fisicamente a percepção humana da cor.<sup>[17]</sup>

A cor de uma superfície é o resultado da reflexão selectiva da luz por partículas de pigmentos na superfície, sendo a cromaticidade uma medida da qualidade colorimétrica. Assim, o método mais completo de medir a cor é medir a reflexão da superfície como função do comprimento de onda. Isto é efectuado com o auxílio de um espectrofotómetro.

O espectrofotómetro usado para determinar a cor de um objecto é um instrumento constituído por três partes principais: fonte de luz, sistema monocromador, e detector e medidor. A fonte de luz para comprimentos de onda da região do visível é, normalmente, uma lâmpada de tungsténio ou halogénio-tungsténio, ou uma lâmpada *flash-tube* de xénon. O monocromador pode ser uma rede ou um prisma, equipado com um mecanismo de fendas para isolar uma banda estreita ou um comprimento de onda. O detector é um dispositivo sensível à região visível do espectro, como um fotodíodo de silício ou um tubo fotomultiplicador. As outras partes essenciais de um espectrofotómetro são arranjos de montar e iluminar a amostra, um padrão de referência, um arranjo geométrico para seleccionar e recolher a luz que sai no detector. A medição efectuada por um espectrofotómetro de absorção é a razão entre a luz reflectida, ou transmitida, pela amostra e a reflectida, ou transmitida, por um padrão de referência. Esta razão pode ser descrita por  $I/I_0$ , onde  $I$  é a intensidade de luz da amostra e  $I_0$  a intensidade do material de referência.<sup>[18]</sup>

O espectrofotómetro utilizado no LCR utiliza os sistema CIELAB<sup>11</sup> de coordenadas espaciais ( $L^*, a^*, b^*$ ): cada cor é um ponto neste espaço tridimensional (ver Figura 3). No eixo vertical ( $L^*$ ), varia a luminosidade (desde preto para  $L^*=0$  e branco para  $L^*=100$ ). Os outros eixos,  $a^*$  e  $b^*$ , representam o eixo verde-vermelho [ $-a^*$ ;  $+a^*$ ] e azul-amarelo [ $-b^*$ ;  $+b^*$ ]. Assim, um aumento de  $L^*$  significa um aumento da luminosidade da cor; um aumento de  $b^*$  desvia a cor para o amarelo enquanto o seu decréscimo significa um desvio para o azul; um aumento de  $a^*$  desvia a cor para o vermelho e o seu decréscimo desvia a cor para o verde.

Então, se duas espécies têm o mesmo valor de cromaticidade, elas são da mesma cor; pelo contrário, se os valores de cromaticidade foram diferentes, a diferença global é uma medida da diferença de cor entre elas.

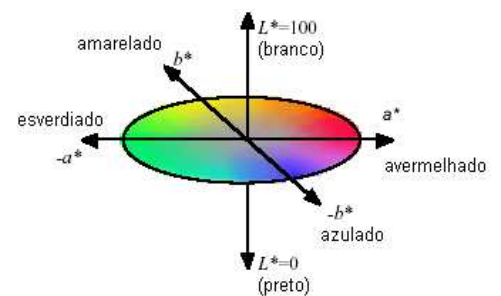


Figura 3 – Espaço de cor CIELAB. Adaptado de [17]

<sup>11</sup> O sistema de cor C.I.E. foi desenvolvido e adoptado pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE – Commission Internationale de l’Eclairage) em 1931 e desde então tornou-se um padrão internacional para a medição, definição e comparação de cores.<sup>[17]</sup>

### 3.2 Cromatografia líquida de elevada eficiência, HPLC

A cromatografia engloba um conjunto de métodos cujo objectivo é separar componentes de uma mistura, distribuindo-os em duas fases (estacionária e móvel). O coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) descreve a forma como cada composto se distribui entre as duas fases imiscíveis (A e B) e é constante a uma dada temperatura:

$$K_d = \frac{\text{concentração na fase A}}{\text{concentração na fase B}} \quad (1)$$

A separação é conseguida se os componentes de uma amostra apresentarem diferentes coeficientes de distribuição, o que se traduz em diferenças na velocidade de arrastamento ao longo da fase estacionária.

A cromatografia em coluna é a configuração cromatográfica de maior divulgação, sendo utilizada para fins analíticos ou preparativos. Nesta técnica, a fase móvel (líquida ou gasosa) passa através de uma coluna (de metal, vidro, etc., revestida com a fase estacionária). Em muitas aplicações, é colocado um detector à saída da coluna que permite um registo contínuo da composição do efluente. Durante o processo de separação, a interacção de cada componente da amostra com as fases móvel e estacionária origina a formação de bandas, cada uma delas correspondendo à zona de concentração máxima dos componentes. Se se efectua a monitorização do efluente, a eluição das bandas é detectada e a representação obtida no seu conjunto constituindo o cromatograma da amostra.

A cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) apresenta uma resolução elevada relativamente à cromatografia tradicional pelo facto de utilizarem partículas de dimensão reduzida. Como este tipo de fase estacionária oferece grande resistência à passagem da fase móvel, é necessário aplicar pressão elevada para que o eluente passe na coluna com um caudal razoável. Quando a coluna utilizada é menos polar que os eluentes denomina-se HPLC por fase reversa (RP-HPLC).

O cromatograma permite a análise qualitativa e quantitativa dos solutos, sendo que na primeira se determinam os tempos de retenção ( $t_R$ ), e na segunda as áreas dos picos. A comparação dos tempos de retenção dos componentes com os obtidos nas mesmas condições experimentais para compostos padrão permite determinar a natureza dos compostos da amostra. Por outro lado, o valor das áreas dos picos constitui uma medida das concentrações relativas dos componentes da amostra.

O esquema do cromatógrafo para HPLC utilizado no LCR está esquematizado na Figura 4: é constituído por um sistema de bombas ligado a um reservatório de fase móvel, um injector de amostra, uma coluna e, finalmente, um detector e um registador.

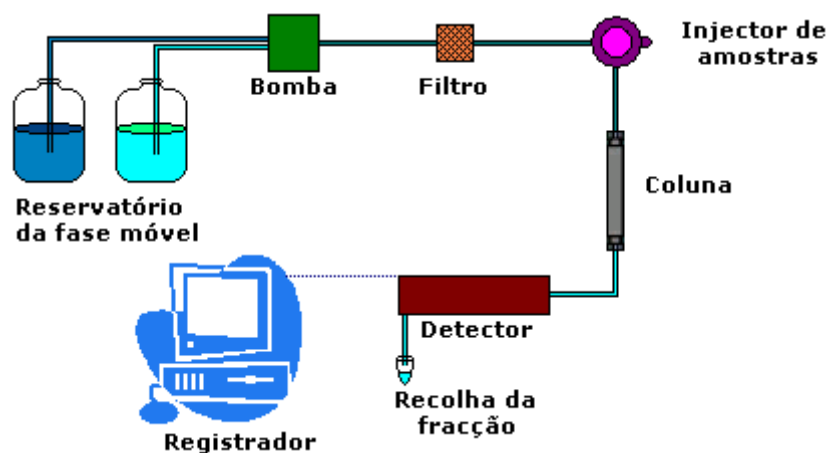


Figura 4 – Esquema de um sistema básico de HPLC.

Uma resolução inadequada entre bandas dos componentes pode comprometer a análise qualitativa e quantitativa, pelo que é fundamental a optimização do processo até à separação completa dos picos no cromatograma. A resolução,  $R$ , é definida pela equação 2, onde  $A$  e  $B$  são picos consecutivos no cromatograma,  $t_R$  o tempo de retenção, e  $W$  a largura na base dos picos.

$$R = \frac{2(t_{R_A} - t_{R_B})}{W_A + W_B} \quad (2)$$

Imaginando que as colunas são constituídas por um número de zonas adjacentes denominadas de pratos, cada uma das quais com espaço suficiente para que se estabeleça o equilíbrio completo do soluto nas duas fases, a resolução é tanto maior quanto maior é o número de pratos ( $N$ ) por unidade de comprimento. Como o número de pratos se relaciona com a área superficial da fase estacionária e com o comprimento da coluna, segue-se que a resolução aumenta com a diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária e com o aumento do comprimento da coluna. O aumento do comprimento da coluna tem, no entanto, o efeito adverso de aumentar a difusão das bandas e o tempo da experiência. A resolução pode também ser ajustada por modificação da natureza e volumes das fases móvel e estacionária e com a variação da temperatura de separação.

### 3.2.1 Análise de aminoácidos pelo método Pico-Tag®

A análise de aminoácidos refere-se à metodologia usada para determinar a composição em aminoácidos ou o conteúdo de proteínas ou péptidos, e pode ser usada para (i) quantificar proteínas e péptidos; (ii) identificar proteínas ou péptidos com base na sua composição em aminoácidos; (iii) suportar a análise estrutural de proteínas e péptidos; (iv) avaliar estratégias de fragmentação para o *mapping* dos péptidos; (v) detectar aminoácidos atípicos que possam estar presentes numa proteína ou péptido.<sup>[19]</sup>

A análise de aminoácidos, na sua forma mais simples, consiste na hidrólise de proteínas ou péptidos nos seus aminoácidos constituintes pela exposição a ácido clorídrico durante 24 h a 110 °C. O método é, portanto, independente da forma, carga ou função da proteína, pois esta é completamente degradada.<sup>[20]</sup> Os aminoácidos são depois derivatizados antes de analisados.

Durante a hidrólise (Figura 5), os aminoácidos livres não se comportam do mesmo modo que os aminoácidos ligados em proteínas, pois as velocidades de libertação ou destruição são variáveis.

Assim, é recomendado o uso de um padrão interno para corrigir perdas durante a hidrólise, pois este monitoriza se há perdas químicas ou físicas e variações durante a análise de aminoácidos<sup>12</sup> [19, 21]

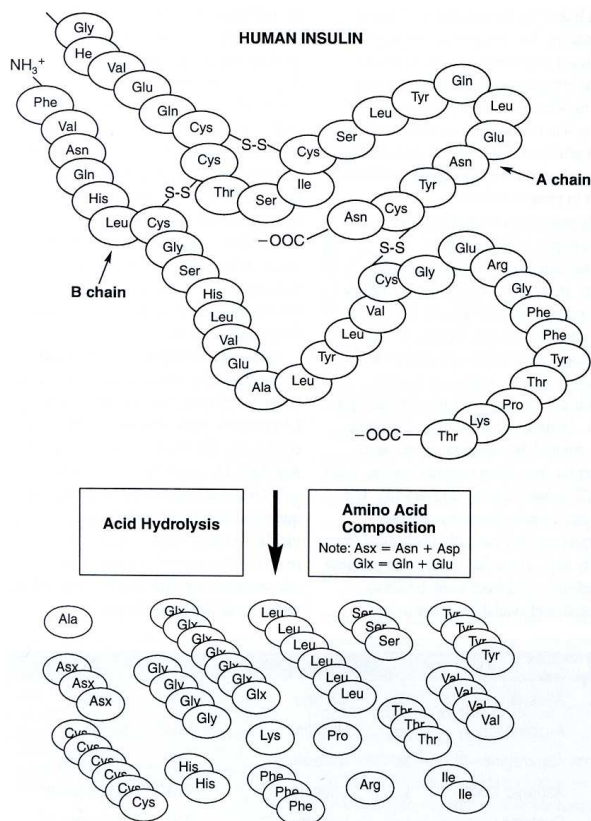


Figura 5 – A análise de aminoácidos envolve a hidrólise de uma proteína ou péptido nos seus componentes individuais como aminoácidos livres.<sup>[20]</sup>

Idealmente, um padrão interno não deve ocorrer naturalmente em proteínas, deve ser comercialmente disponível e de baixo custo. Deve também ser estável durante a hidrólise, o seu factor de resposta deve ser linear com a concentração e deve eluir com um único tempo de retenção não sobreposto a outros aminoácidos. A norleucina foi o padrão interno escolhido porque não ocorre normalmente nas proteínas, é estável à hidrólise ácida e pode ser cromatograficamente separada dos outros aminoácidos proteicos. Para além disto, é normalmente utilizado neste tipo de análise.<sup>[19, 21]</sup>

Entre os 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente na natureza, há uma grande variação na estabilidade e labilidade quando expostos a condições químicas severas. Na Tabela 3 encontra-se esquematizada a influência da hidrólise ácida na quantidade de resíduos de aminoácidos recuperados e, conseqüentemente, na variação deste tipo de análise.<sup>[19, 20, 21]</sup>

<sup>12</sup> A recuperação do padrão interno indica a recuperação dos outros aminoácidos da solução proteica.

O padrão interno pode também ser adicionado à mistura de aminoácidos depois da hidrólise para corrigir diferenças na aplicação das amostras e alterações na estabilidade dos reagentes ou velocidades de fluxo.

Tabela 3 – Efeitos da hidrólise ácida em vários aminoácidos [4, 20]

Aminoácidos	Efeitos da hidrólise ácida
Asp, Glu, Ala, Leu, Lys, Gly	Recuperados totalmente
Asp, Glu	Desaminados e convertidos em Asn e Gln, que são totalmente recuperados
Trp	Praticamente todo destruído
Cys	É tipicamente recuperada como cistina (mas a recuperação da cistina é pobre por causa da destruição parcial ou redução da cisteína) Pode ter alguns produtos de degradação que co-eluem com a prolina, histidina e metionina
Ser, Tyr, Thr	Significativamente destruídas (>30%)
Val, Leu, Iso-Leu, Phe	São resíduos hidrofóbicos que têm ligações peptídicas que são difíceis de hidrolisar quando as moléculas estão adjacentes a outros resíduos hidrofóbicos
Metionina	Parcialmente oxidada

De notar que a perda do triptofano, asparagina e glutamina durante a hidrólise ácida limita a quantificação a 17 aminoácidos. [19, 21]

A hidrólise é seguida de separação cromatográfica dos aminoácidos livres. Como o detector utilizado (UV) não consegue detectar os aminoácidos livres, é necessário derivatizá-los. No procedimento usado, *Pico-Tag*® da Waters, os aminoácidos reagem com fenilisotiocianato (PITC) de modo a criar feniltiocarbamil (PTC) de aminoácidos. Os PTC-aminoácidos são depois separados por HPLC e identificados e quantificados com elevada sensibilidade a 254 nm. A reação de derivatização pode ser visualizada na Figura 6. [19, 20, 22]

Na Figura 7 encontra-se representado um cromatograma de um padrão de aminoácidos, no qual se observa uma boa resolução dos vários aminoácidos.

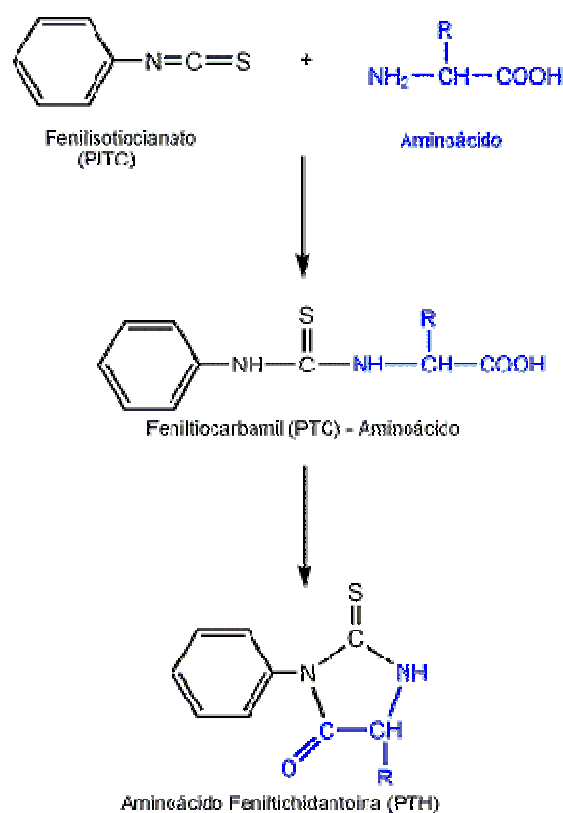


Figura 6 – Mecanismo da derivatização dos aminoácidos com PITC.



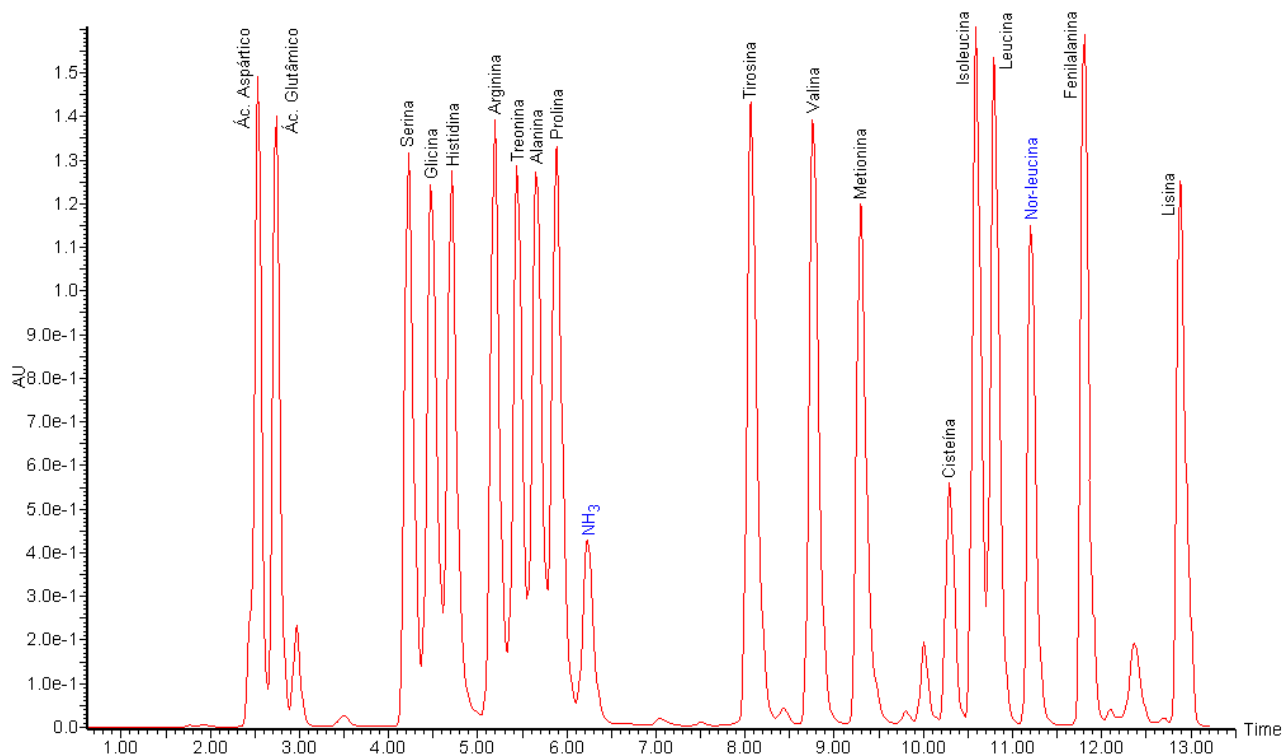


Figura 7 – Cromatograma obtido por HPLC de 40 µl de padrão de aminoácidos (2,4 µmol/ml de cada aminoácido) antes da hidrólise.

A composição de amostras desconhecidas é posteriormente comparada com amostras conhecidas (ver por exemplo Tabela 15). Algum reagente PICT permanece na amostra e elui por volta dos 12,4 min. Um padrão interno, norleucina, adicionado antes da hidrólise para quantificar a perda e/ou variações da amostra, elui aos 11,2 min.

Com este método é possível analisar a quantidade relativa de cada aminoácido e obter os vários tipos de aglutinantes proteicos. Os resultados obtidos com este método, para os vários tipos de tâmporas (gelatina ou cola animal, caseína e gema de ovo), e publicados em revistas científicas podem ser visualizados no anexo 1. Analisando estas quantidades relativas de cada aminoácido, para os vários aglutinantes, é possível construir a Tabela 4 e o esquema de identificação da Figura 8.

Tabela 4 – Diferenças na quantidade relativa dos aminoácidos para as proteínas dos diversos aglutinantes proteicos (Quantidades relativas de aminoácidos obtidas pelo método Pico-Tag®+HPLC)

Aglutinantes	Ovo	Gelatina e Cola	Caseína
Proteína	Albumina	Colagénio	Caseína
Quantidade relativa dos aminoácidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 2:1 serina: glicina</li> <li>– 2:1 alanina:prolina</li> <li>– 1:1 ác.glutâmico:ác. aspártico</li> <li>– grandes quantidades de ác. glutâmico e ác. aspártico, valina, leucina, isoleucina e fenilalanina</li> <li>– baixa quantidade de glicina e prolina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Presença de hidroxiprolina</li> <li>– &gt; 30% de glicina</li> <li>– &gt;10% de prolina</li> <li>– 3:1 glicina:hidroxiprolina</li> <li>– 1:8 serina:glicina</li> <li>– 1:1 alanina:prolina</li> <li>– baixa quantidade de valina, fenilalanina e leucina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 3:1 ác. glutâmico:ác. aspártico</li> <li>– grandes quantidades de ácido glutâmico, prolina, leucina e lisina</li> </ul>

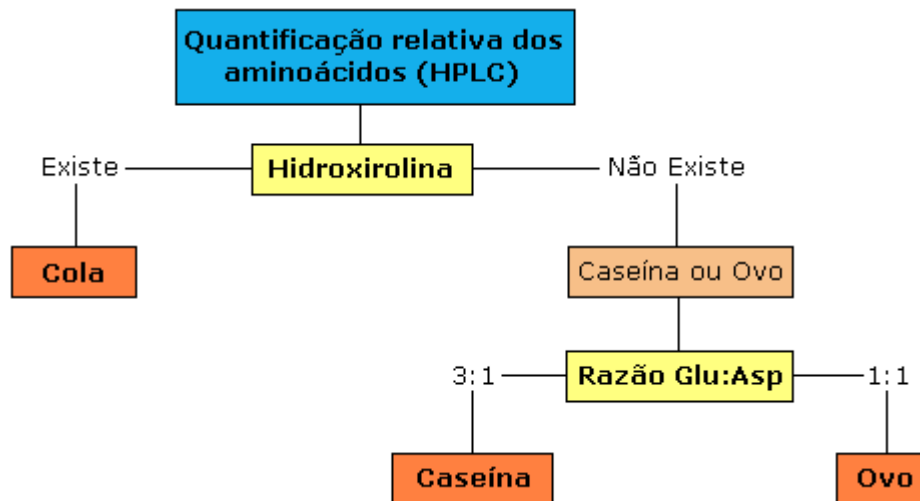


Figura 8 – Esquema básico de identificação de aglutinantes proteicos

Este método não é, no entanto, sempre fácil de aplicar, principalmente na distinção entre caseína e ovo. Por isso, preferiu-se implementar outro esquema para identificação de proteínas. Este novo esquema incorpora tabelas de concentração (composição, em aminoácidos, de cada proteína) publicadas e matrizes de correlação. O coeficiente de correlação é uma ferramenta estatística muito útil para estimar o grau de associação entre resultados, pelo que pode ser usada para comparar dados experimentais com padrões de referência. O coeficiente de correlação,  $r$ , entre duas amostras encontra-se descrito na equação 3, onde  $X$  e  $Y$  são as concentrações de cada aminoácido e  $n$  é o número de aminoácidos analisados.

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right) \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)}} \quad (3)$$

Assim, quando  $r=1,0$  considera-se que há uma correlação perfeita, ou seja, é possível relacionar a têmpera desconhecida com a têmpera padrão, e quando  $r=0,0$  não existe nenhuma correlação, pelo que não há coincidência entre a têmpera desconhecida e a têmpera padrão.

Com esta ferramenta é possível correlacionar valores padrão e experimentais de têmperas proteicas e avaliar o seu grau de correlação: quanto mais próximo de 1 é a correlação entre os valores experimentais e os valores padrão para uma determinada proteína, maior a probabilidade de ambas serem o mesmo tipo de proteína.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho desenvolvido envolveu quatro partes que se vão considerar aqui como distintas. Na primeira parte, foram preparados filmes de têmperas, com os diferentes aglutinantes para, após devidamente secos, poderem ser analisados. Na segunda parte, foi implementada a técnica Pico-Tag<sup>®</sup> no laboratório do LCR. Na terceira parte, foi estudada a degradação das proteínas testando vários tipos de envelhecimento e, na quarta parte, foi estudada a possibilidade de utilização do EDTA como agente capaz de inibir a influência dos pigmentos nas têmperas.

Relativamente à primeira parte, foi efectuada uma pesquisa de receitas tradicionais dos vários aglutinantes proteicos e seleccionou-se uma receita de cada tipo para a preparação de têmperas proteicas. Posteriormente foram elaboradas as têmperas proteicas, para além de preparações de cré e gesso e tintas com diversos pigmentos naturais. Finalmente foram efectuados filmes com estas têmperas, preparações e filmes.

Na segunda parte, foi implementada e optimizada a técnica Pico-Tag<sup>®</sup> + HPLC nos equipamentos HPLC disponíveis no LCR. Para tal foi estudado o funcionamento do HPLC e dos respectivos *softwares*. Depois foi seleccionada bibliografia sobre a aplicação da técnica Pico-Tag<sup>®</sup> + HPLC no estudo de obras de arte e esta foi implementada e optimizada no LCR. Foi ainda implementado um modelo matemático usando matrizes de correlação, usando o programa *Excell*, que facilitasse a identificação dos aglutinantes proteicos mais usados em obras de arte.

Na terceira parte, para análise da degradação das proteínas pela acção de vários tipos de envelhecimento, foi efectuado o envelhecimento dos filmes em câmaras e foi efectuada a sua análise por cromaticidade e HPLC. Os estudos foram divididos em três grupos: i) envelhecimento das têmperas puras; ii) envelhecimento das preparações de cré e gesso; iii) envelhecimento das tintas, para estudar a influência de alguns dos pigmentos, nomeadamente o branco de chumbo e o realgar, no envelhecimento das têmperas à base de gema de ovo. Durante a análise dos filmes de tintas verificou-se que os pigmentos à base de cobre influenciavam a identificação dos aglutinantes.

Na quarta e última parte, foi efectuada uma pesquisa bibliográfica sobre que tipo de agentes se poderiam usar para inibir o efeito dos pigmentos em têmperas, tendo-se concluído que o EDTA poderia cumprir estes requisitos. Foram, então, efectuados alguns ensaios para confirmar a sua utilidade.

## 4.1 Preparação de filmes de têmperas proteicas

### 4.1.1 Elaboração dos aglutinantes

A elaboração das têmperas, tintas e preparações teve por base receitas tradicionais:

- **Gema de ovo:** Separou-se a gema da clara. Utilizou-se somente a gema.
- **Têmpera de gema de ovo**<sup>[7]</sup>: Separou-se a gema da clara. Diluiu-se a gema em água numa emulsão 1:1.
- **Têmpera de gelatina**<sup>[5]</sup>: Fez-se uma solução de 15,00 g de gelatina<sup>13</sup> em 150 ml de água quente.
- **Têmpera de cola:** a 7,5 ml de água adicionou-se 0,511 g de cola animal (grude em pérolas).
- **Têmpera de caseína**<sup>[13]</sup>: Aqueceu-se 25 ml de água. Retirou-se cerca de 1 ml desta água quente e adicionou-se 1,020 g de carbonato de amónia, para emulsionar. Por outro lado, juntou-se 4,004 g de caseína à restante água quente. No final, misturaram-se as soluções de carbonato de amónia e caseína. Dissolveu-se este aglutinante em mais 10 ml de água quente.

### 4.1.2 Elaboração de filmes

De todos os pigmentos disponíveis no LCR, escolheram-se os 12 pigmentos naturais descritos na Tabela 2, para além de cré e gesso que são usados nas camadas preparatórias de pinturas. Os filmes de preparações e tintas foram efectuadas da seguinte forma:

**Tintas:** A 1 ml de aglutinante adicionou-se pigmento natural em pó até se obter uma consistência adequada de tinta.

**Preparações:** A 1 ml de aglutinante de gelatina ou cola adicionou-se gesso ou cré até se obter uma consistência adequada.

As tintas foram depositadas em placas de acrílico com um pincel, de modo a formar filmes homogéneos, num total de 35 tipos de filmes:

- 4 aglutinantes: gema de ovo (pura), têmpera de gema de ovo, têmpera de gelatina e têmpera de caseína;
- 2 preparações: têmpera de cola com gesso e cré
- 12 tintas de têmpera de gema de ovo: Têmpera de gema de ovo com os pigmentos branco de chumbo, bindheimite, hematite, ouropigmento, goetite, realgar, vermelhão, azurite, ultramarino, malaquite, terra verde e crisocola;
- 12 tintas de têmpera de gelatina: Têmpera de gelatina com os pigmentos branco de chumbo, bindheimite, hematite, ouropigmento, goetite, realgar, vermelhão, azurite, ultramarino, malaquite, terra verde e crisocola;

---

<sup>13</sup> Gelatina em pó da Merck.

– 5 filmes de tintas de têmpera de caseína: Têmpera de caseína com os pigmentos azurite, ultramarino, malaquite, terra verde e crisocola. Na têmpera de caseína só se usaram os pigmentos azuis e verdes porque são os mais usados neste tipo de aglutinante, em pintura mural.

Foram feitos 4 filmes de cada tinta ou preparação, para os vários tipos de envelhecimento. Deixou-se estes filmes secarem durante 22 dias no escuro antes de serem sujeitos aos diversos tipos de envelhecimento.

## 4.2 Implementação da técnica Pico-Tag<sup>®</sup>+HPLC para identificação de têmperas proteicas

A técnica implementada no LCR segue o métodos Pico-Tag<sup>®</sup>[3]: as amostras são hidrolisadas em ácido e derivatizadas com fenilisotiocianato (PITC) (ver secção 3.2.1). A hidrólise dos aminoácidos leva a que os grupos amino fiquem no estado protonado e menos reactivos ao PITC. Assim, antes da derivatização, é necessário secar as amostras após adição da solução de secagem, seguido de vácuo para remover o líquido. Daqui resultam aminas desprotonadas que reagem rapidamente com o PITC da solução de derivatização.

Foi implementada no laboratório do LCR a técnica seguinte, para identificação de têmperas proteicas.

### 4.2.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: Ácido clorídrico 20-24 % (p/p) da BDH; Fenol p.a.,  $M(C_6H_5OH)=94,11$ , da Merck; Etanol *HPLC grade*,  $M(C_2H_6O)=46,07$  da Riedel-deHaën; Metanol (UV-IR-HPLC-HPLC isocrático) PAI-ACS,  $M(CH_2OH)=32,04$  da Panreac Química SA; Acetonitrilo para HPLC,  $M(CH_3CN)=41,05$  da Carlo Erba; Trietilamina, 99.5%,  $M[(C_2H_5)_3N]=101,19$  da Aldrich; Fenilisotiocianato<sup>14</sup> da Pierce; Eluente A<sup>15</sup> Pico-Tag<sup>®</sup> da Waters; Tampão diluente de amostras Pico-Tag<sup>®</sup><sup>16</sup> da Waters.

Foram ainda usados os seguintes padrões: Solução de padrões de aminoácidos H da Pierce<sup>17</sup>, Colecção de 24 Padrões de aminoácidos para cromatografia de papel e camada fina da BDH e aminoácidos para fins comparativos cromatográficos da Merck.

---

<sup>14</sup> O PITC degrada-se rapidamente a não ser que esteja armazenado congelado. Pode ser armazenado deste modo durante 3 semanas depois de aberto. Para trabalhos sensíveis recomenda-se a abertura de uma ampola nova. Para armazenar PITC aberto, cobrir o contentor do reagente com azoto durante 15-20 segundos e tapar rapidamente com *Parafilm*<sup>®</sup>. Armazenar no congelador. Não utilizar ampolas mais de 3 semanas depois de abertas. Antes de abrir ou reabrir uma ampola de PITC, deixar a solução ficar à temperatura ambiente para evitar condensação.

Para evitar contaminação, depois de abrir uma ampola de PITC (que contem 1 ml de PITC) distribuir o seu conteúdo em 10 *vials*, cobrir com azoto líquido e armazenar no congelador até serem necessários.

<sup>15</sup> 0,23M acetato de sódio em água, pH=6,40, com 0,5 ml de trietilamina e 60 ml de acetonitrilo por litro.

<sup>16</sup> 5mM hidrogeno fosfato disódico, pH=7,40, com 5% acetonitrilo.

<sup>17</sup> Contém 2,5  $\mu\text{mol/ml}$  de cada aminoácido (excepto L-Cistina cujo valor é 1,25  $\mu\text{mol/ml}$ ) em solução 0,1 N HCl. Amónia, L-Alanina, L-Arginina, L-Ácido Aspártico, L-Cisteína, L-Ácido Glutâmico, Glicina, L-Histidina, L-Isoleucina, L-Leucina, L-Lisina, L-Metionina, L-Fenillanina, L-Prolina, L-Serina, L-Treonina, L-Tirosina, L-Valina.

#### 4.2.2 Aparelhagem

Foram utilizados dois equipamentos, o cromatógrafo 600E da Waters, associado ao *software Millennium*<sup>32</sup> e o cromatógrafo Alliance 2795 da Waters, associado com *software MassLynx 4.0*. O cromatógrafo 600E é constituído pelos seguintes módulos da Waters: Controlador 600E, Bombas 600E, desgaseificador *In-Line Degasser* da Waters e Injetor de amostras *717 plus Autosampler*. Ambos os cromatógrafos partilham o forno de coluna e o detector PDA 996, ambos da Waters.



Figura 9 - Cromatógrafo 600E da Waters (módulos Controlador 600E, Bombas 600E, desgaseificador *In-Line Degasser* da Waters e Injetor de amostras *717 plus Autosampler*).



Figura 10 – Cromatógrafo Alliance 2795 da Waters e forno de coluna da Waters.

#### 4.2.3 Procedimento experimental

##### Soluções

- Ácido clorídrico 6N: Ácido clorídrico 6N ao qual se adicionou 1% (p/v) de fenol para evitar a halogenação da tirosina.
- Solução de secagem: 100 µl água, 100 µl etanol e 50 µl trietilamina.
- Solução de derivatização: 70 µl etanol, 10 µl água, 10 µl trietilamina e 10 µl PITC. Estas quantidades são suficientes para 4 amostras. Esta solução deve ser usada até 2 h depois de preparada.
- Solução tampão diluente Pico-Tag<sup>®</sup>
- Padrão interno de norleucina: 0,01 mg/ml em HCl 0,1 M

##### Hidrólise<sup>18</sup>

1. Ligar a estufa a 110°C. Ligar o exaustor da estufa.
2. Pesar a amostra e colocar directamente no tubo de hidrólise<sup>19</sup>.
3. Preparar o padrão de aminoácidos colocando 10 µl de padrão de aminoácidos num tubo de hidrólise. Este padrão será seco e derivatizado juntamente com as amostras.
4. Usar um tubo vazio como “branco-hidrólise”.
5. Adicionar 10 µl de norleucina (padrão interno) a todas as amostras, ao padrão de aminoácidos e ao “branco-hidrólise”.

<sup>18</sup> É necessário ter muito cuidado para evitar contaminações. Até as impressões digitais podem contaminar a amostra. Usar luvas mas cuidado com o pó das luvas, que também pode contaminar as amostras. Estas contaminações podem ser eliminadas se os tubos de hidrólise estiverem bem limpos.

<sup>19</sup> Identificar as amostras com papel autocolante e não directamente com tinta de acetato no tubo de hidrólise pois o HCl usado posteriormente dissolve a tinta.

6. Em cada tubo, depositar a 400 µl de solução de ácido clorídrico 6N e um grânulo *anti-bumping*<sup>20</sup>. Tapar o tubo e agitar no vórtex.
8. Colocar os tubos na estufa (110 °C) durante 24 horas.
9. Retirar os tubos da estufa e deixar arrefecer
10. Congelar os tubos com azoto líquido e colocar os tubos destapados no liofilizador durante cerca de 2h, até secar. Colocar no congelador até se efectuar a secagem.

#### Secagem<sup>21</sup>

11. Adicionar 10 µl da solução de secagem a cada tubo de amostra e misturar no vórtex.
12. Congelar os tubos com azoto líquido e colocar os tubos destapados no liofilizador durante cerca de 2h, até secar.

#### Derivatização

13. Adicionar 20 µl da solução de derivatização a cada tubo e misturar vigorosamente durante pelo menos 5 segundos.
14. Efectuar um “branco de derivatização” (só com os 20 µl da solução de derivatização).
15. Deixar os tubos repousar à temperatura ambiente durante pelo menos 20 minutos.
16. Congelar os tubos com azoto líquido e voltar a colocar os tubos no liofilizador, durante aproximadamente 1 hora, fazendo com que o tempo total de secagem seja 2 ou 3 horas.<sup>22</sup>
17. Colocar as amostras no congelador até serem necessárias (podem ficar armazenadas até 6 meses).

#### Análise por HPLC

18. Dissolver as amostras e os padrões de aminoácidos em 150 µl de Solução tampão diluente Pico-Tag<sup>23</sup>.
17. Injectar as amostras no HPLC e efectuar a análise, usando as seguintes condições e eluentes.

*Reservatório A:* Eluente A Pico-Tag<sup>®</sup>

*Reservatório B:* 60% Acetonitrilo e 40% Água

*Condições de separação:* T = 38°C

$V_{\text{injectado}}=20 \mu\text{l}$

Coluna Pico-Tag<sup>®</sup> da Waters para análise de aminoácidos hidrolisados.

<i>Gradiente linear dos eluentes</i>	0 % B – 0 min a 46% B – 12,5 min
<i>Fluxo:</i> 0,8 ml/min	46% B – 12,5 min a 100%B – 16 min

---

<sup>20</sup> Grânulo *anti-bumping* da Laboratory reagent BDH.

<sup>21</sup> Após hidrólise ácida, os aminoácidos encontram-se protonados e são dificilmente derivatizados. A solução de secagem neutraliza o pH, tornando os grupos amina livres para derivatização.

<sup>22</sup> A remoção do reagente de derivatização é muito importante. Se esta remoção não for eficaz leva a complicações cromatográficas e à degradação da coluna de HPLC.

<sup>23</sup> À temperatura ambiente, os padrões de aminoácidos dissolvidos nesta solução fornecem resultados fiáveis durante mais de 10 h. Padrões de aminoácidos refrigerados mantêm-se estáveis durante mais de 60 h. Se se quiser armazenar durante muito tempo, não adicionar a solução diluente aos padrões de aminoácidos; se estiverem secos podem manter-se no congelador durante várias semanas.

### **Apresentação de resultados**

19. Integrar o cromatograma obtido ao comprimento de onda de 254 nm. Tratar o cromatograma usando o *software* específico (*MassLynx 4.0* e *Millennium<sup>32</sup>*)
20. Calcular a composição relativa de cada aminoácido na proteína (área relativa dos picos do cromatograma).
21. Calcular o coeficiente de correlação, para a composição relativa de cada aminoácido, entre as amostras e o “padrão de referência de aglutinantes”. Este padrão de referência de aglutinantes é a composição em aminoácidos encontrado em publicações<sup>[5]</sup>. Posteriormente, optou-se também por efectuar “padrões de aglutinantes no LCR” e obtiveram-se resultados mais esclarecedores desta forma. Estes “padrões de aglutinantes do LCR” são amostras de aglutinantes cuja composição foi determinada no LCR.

## **4.3 Envelhecimento acelerado de filmes de têmperas proteicas**

### **4.3.1 Envelhecimento acelerado**

As têmperas proteicas em estudo foram sujeitas a vários tipos de envelhecimento para analisar a influência da luz, temperatura e humidade sobre os aglutinantes proteicos. As amostras foram divididas em 4 grupos, consoante o tipo de envelhecimento a que iriam ser sujeitas:

#### **A – Envelhecimento à temperatura ambiente**

As amostras foram colocadas em frente a uma janela, estando expostas às condições de luz, temperatura e humidade ambientes.

#### **B – Envelhecimento na câmara UV-Visível**

Para este envelhecimento utilizou-se a câmara de radiação UV Solarbox® 3000E (Figura 11) que está equipada com uma lâmpada de Xénon e um filtro que elimina toda a radiação abaixo dos 280 nm, que simula a exposição à luz solar mais crítica. A câmara foi colocada a funcionar com uma irradiação de 400 W/m<sup>2</sup> e a uma temperatura de corpo negro de 55°C.

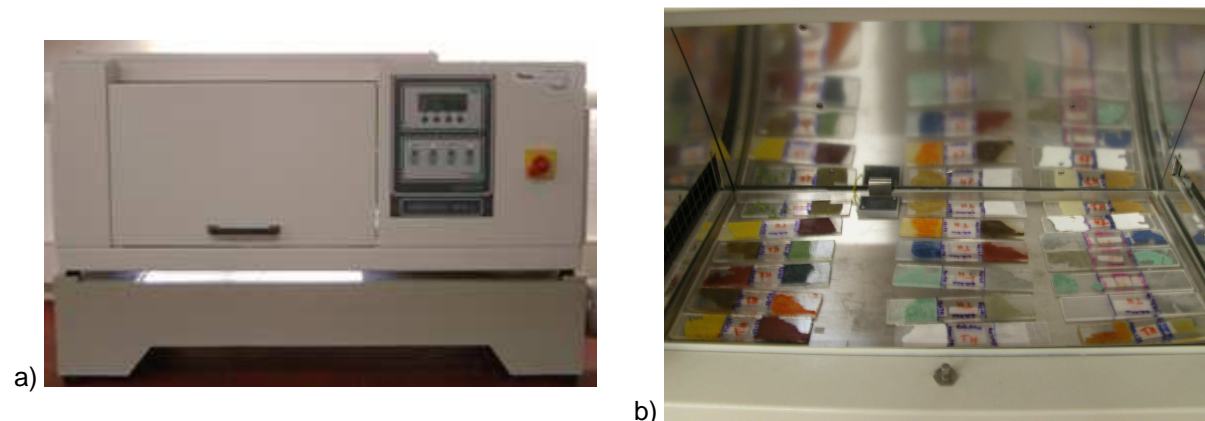


Figura 11 – a) Câmara radiação UV Solarbox® 3000E; b) Envelhecimento das amostras na câmara radiação UV-Visível.

Pretendia-se que as amostras fossem submetidas a um envelhecimento artificial que equivallesse a 100 anos de exposição natural. Assim, sabendo que o nível de exposição num museu durante um ano é



$36,5 \times 106 \text{ h.lux}^{24}$  e que  $1\text{W/m}^2=97,037 \text{ lux}^{[26]}$ , para irradiação  $400 \text{ W/m}^2$  calculou-se um envelhecimento de 940 h (1,3 meses) na câmara de UV-Visível.

Para seguir este envelhecimento ao longo do tempo, foram retiradas amostras aos tempos 0, 68, 160, 348, 514, 705, 824 e 940 h, o que equivale, em anos, a 0, 7, 17, 37, 55, 75, 88 e 100.

Como as dimensões da câmara não eram suficientes para se fazer o ensaio de envelhecimento com todos os filmes ao mesmo tempo, estes foram divididos em dois lotes, I e II. No entanto, no ensaio com o lote II a lâmpada de xénon deixou de ser capaz de estabilizar na irradiância pretendida, acabando mesmo por se fundir. Assim, como era impossível saber ao certo qual o envelhecimento a que o lote II tinha sido submetido, optou-se por excluir estas amostras do estudo. As amostras excluídas são, portanto: preparações com gelatina, tinta de têmpera de gelatina com os pigmentos branco de chumbo, bindheimite, hematite, ourpigmento, vermelhão, azurite, ultramarino, malaquite, terra verde e crisocola, e tinta de caseína com todos os pigmentos.

### **C – Envelhecimento na câmara climática**

Neste envelhecimento utilizou-se a câmara de Ensaio Climáticos Fitoclima 150 EDTU (Figura 12). Também neste caso se pretendia que as amostras fossem submetidas a um envelhecimento natural de 100 anos. Atendendo a que  $\theta=60 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\varphi=55 \%$  e  $t=90$  dias corresponde a 64 anos de envelhecimento natural<sup>[27]</sup> e com base no princípio que a cada  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  superiores à temperatura ambiente ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) duplica a velocidade da reacção<sup>[27]</sup>, foi usada uma temperatura de  $\theta=70 \text{ }^\circ\text{C}$   $\varphi= 55 \%$  e  $t = 36$  dias (864 horas). Para seguir este envelhecimento ao longo do tempo, foram retiradas amostras aos tempos 0, 67, 161, 329, 665 e 864 h, o que equivale, em anos, a 0, 8, 19, 38, 77 e 100.

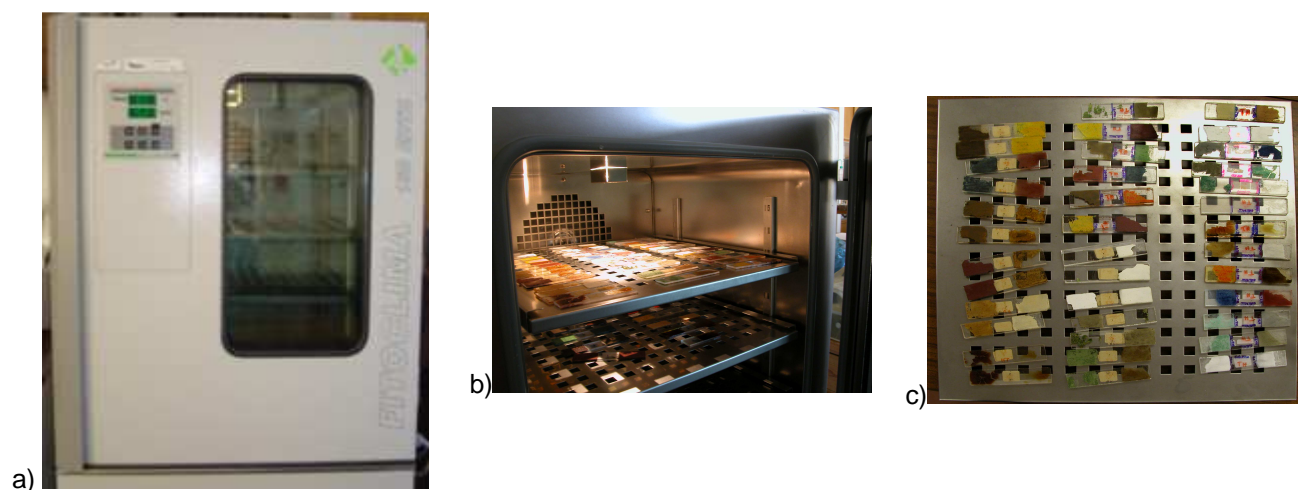


Figura 12 – a) Câmara de Ensaio Climáticos Fitoclima 150 EDTU; b) e c) Envelhecimento das amostras na câmara climática.

<sup>24</sup> Considera-se que, independentemente da localização do museu, o Nível de exposição num museu/ano= $100 \text{ lux} \times 10 \text{ h/dia} \times 365 \text{ dias} = 36,5 \times 10^6 \text{ h.lux}^{[26]}$ .

#### D – Envelhecimento nas câmaras UV-Visível e temperatura humidade

As amostras, depois de submetidas ao envelhecimento de 940h na câmara UV-Visível (condições da alínea B), foram sujeitas ao envelhecimento na câmara climática (condições da alínea C).

### 4.4 Utilização do EDTA para inibir o efeito dos pigmentos sob as têmperas proteicas

A caracterização de têmperas proteicas utilizando a técnica descrita anteriormente pode ser influenciada pelos pigmentos existentes na amostra, que reagem com os aminoácidos resultantes da hidrólise das proteínas, em particular os pigmentos com chumbo, cobre, cálcio, ferro e manganês.<sup>[24]</sup>

De facto, numa primeira abordagem, verificou-se que nas amostras contendo os pigmentos azurite, malaquite e crisocola (à base de cobre) tinham um perfil cromatográfico completamente diferente e aleatório. Na Figura 13 é possível analisar os cromatogramas de amostras onde o cobre altera o perfil cromatográfico, impossibilitando a identificação das têmperas proteicas.

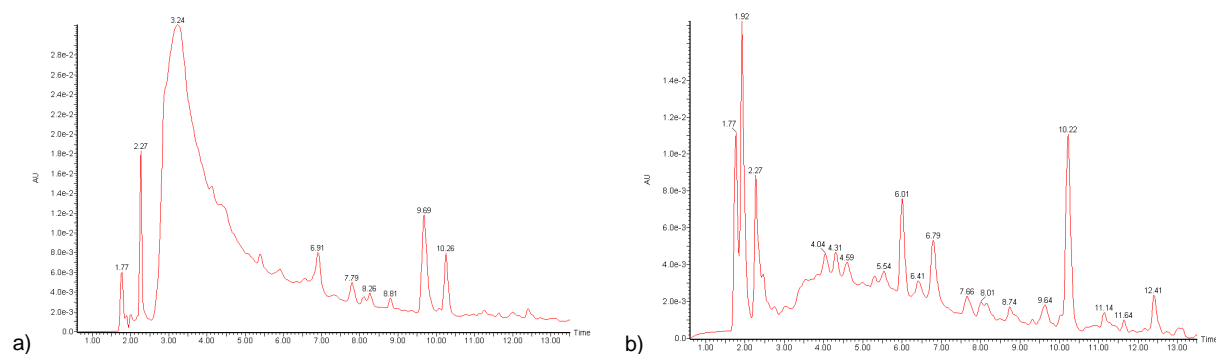


Figura 13 – Cromatograma das amostras: a) “Tinta de azurite + têmpera de gema”; b) “Tinta de malaquite + têmpera de gema”.

Assim, recorreu-se ao EDTA<sup>[24]</sup> que, como agente quelante, iria formar complexos ião metálico-EDTA antes do passo de derivatização, evitando a formação de complexos ião metálico-aminoácidos.

Foi, então, adicionada uma solução de 0,2M EDTA<sup>25</sup> em tampão amónia/cloreto de amónia<sup>[24]</sup> antes do passo da secagem da amostra. Fizeram-se vários ensaios, usando a solução padrão de aminoácidos misturada com cerca de 1 mg de pigmento (branco de chumbo, como controlo, e azurite). A solução de EDTA foi adicionada depois da hidrólise de aminoácidos e antes do passo de secagem.

<sup>25</sup> Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) PA-ACS da Panreac.

## 5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 5.1 Utilização da técnica Pico-Tag<sup>®</sup> + HPLC para identificação de têmperas

Inicialmente, começou por se efectuar a análise de têmperas proteicas puras, não envelhecidas artificialmente, usando a técnica Pico-Tag<sup>®</sup> + HPLC, onde se obtiveram os seguintes resultados:

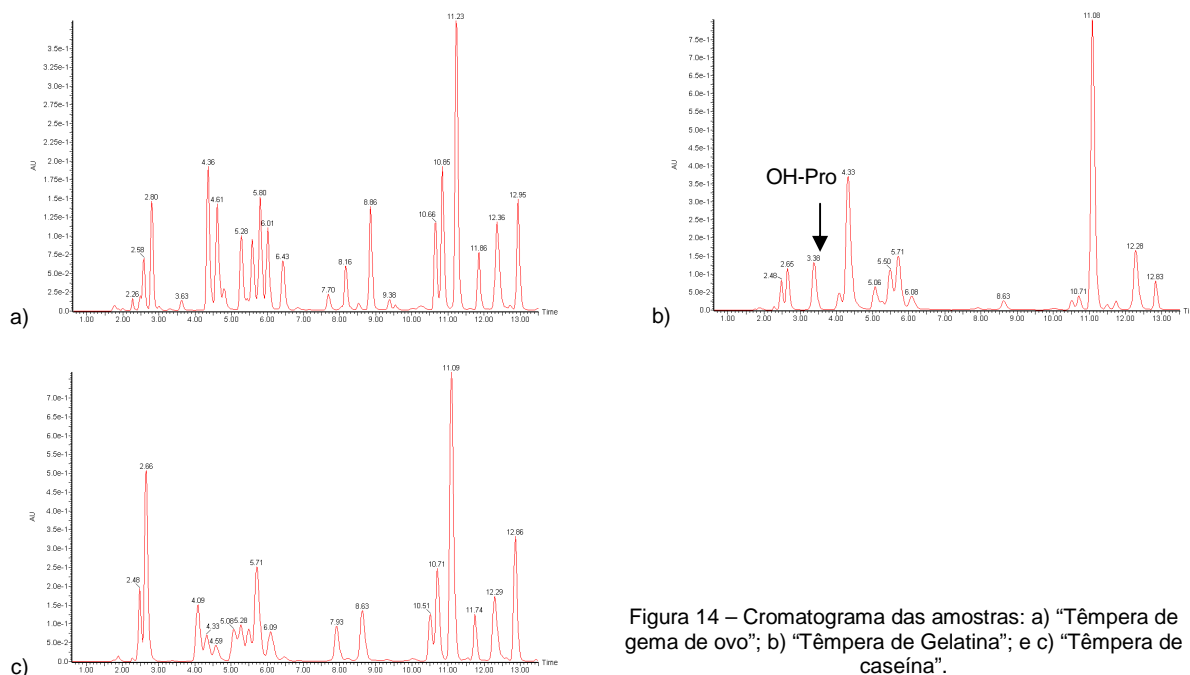


Figura 14 – Cromatograma das amostras: a) “Têmpera de gema de ovo”; b) “Têmpera de Gelatina”; e c) “Têmpera de caseína”.

É possível verificar que o aminoácido hidroxiprolina só aparece na têmpera de gelatina, tornando fácil e rápida a identificação de tintas à base de gelatina ou preparações à base de cola (assinalado na Figura 14 b)). A distinção entre têmperas à base de ovo ou caseína não é tão rápida, mas é possível com ferramentas como o coeficiente de correlação, descritas anteriormente. Assim, começou por se efectuar a correlação entre estas amostras (cuja composição foi determinada no LCR) e amostras cuja composição se encontra publicada (Anexo 1), obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Correlação entre padrões de aglutinantes: valores publicados vs. Padrões do LCR.

Padrões de aglutinantes do LCR	Padrões de aglutinantes Publicados					
	Gelatina		Gema de Ovo		Caseína	
	G1	G2	O1	O2	C1	C2
Ovo	0.00	0.00	0.68	0.68	0.39	0.18
Têmpera de ovo	0.00	0.00	0.80	0.73	0.41	0.17
Têmpera de gelatina	0.98	0.98	0.00	0.06	0.00	0.01
Preparação com cola	0.97	0.97	0.00	0.11	0.00	0.04
Têmpera de caseína	0.00	0.00	0.25	0.40	0.77	0.60

G1 – Análise do colagénio da Sigma, ficheiro 1030A32A da NGA; G2 – Composição do colagénio da pele de rato de Sorber, H.A., *Handbook of Biochemistry: Selected Data for Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> ed.* (Cleveland, 1973), C-282; O1 – Gema de ovo envelhecida naturalmente durante dois anos, ficheiro 1030D35A da NGA; O2 – Composição da gema de ovo de *Composition of Foods, Dairy and Egg Products*, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Handbook 8-1 (Washington, 1976), item 01-033; C1 – Caseína da Sigma, ficheiro 1030B323A da NGA; C2 – Composição do queijo parmesão, de *Composition of Foods, Dairy and Egg Products*, item 01-125.<sup>[5]</sup>

Como seria de esperar, a correlação de dados é maior quando se verifica o mesmo tipo de têmpera (áreas a sombreado na tabela anterior). A correlação para as têmperas à base de cola é excelente, ( $r > 0,97$ ); no entanto a correlação para as têmperas à base de gema de ovo e caseína, apesar de ser razoável, não é tão boa. Isto deve-se, provavelmente, ao facto da resolução de alguns picos, nomeadamente Arg, Thr, Ala e Pro não ser muito boa, o que perturba a determinação da quantidade relativa dos aminoácidos e, conseqüentemente, os valores do coeficiente de correlação.

De seguida, o ideal seria utilizar este método em amostras reais, extraídas de pinturas. No entanto, a maioria das amostras que são extraídas de pinturas provêm de tons verde e azul, contendo pigmentos azurite e malaquite que contêm cobre. Este metal (assim como outros) influencia a identificação dos aglutinantes proteicos pelo método implementado (ver secção 4.4), pelo que se verificou não ser possível testar este método em amostras reais. No entanto, no LCR existe um conjunto de filmes, preparados em 1976, pela Eng. Isabel Ribeiro cuja composição é conhecida, e onde não existem pigmentos à base de cobre. Assim, decidiu-se testar o método Pico-tag®+HPLC implementado neste conjunto de amostras. Os cromatogramas obtidos e a composição em aminoácidos podem ser consultados no Anexo 3. A correlação destes valores com os padrões pode ser analisada na Tabela 6.

Tabela 6 – Correlação entre os valores experimentais obtidos para “Filmes 1976” e os valores padrão publicados e do LCR.

Padrões		Filmes de 1976														
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.01	0.00	0.02	0.07	0.00	0.00	0.01	0.95	0.95	0.45	0.35	0.40	0.83	0.35
		O2	0.00	0.02	0.00	0.14	0.01	0.03	0.00	0.77	0.76	0.26	0.13	0.35	0.64	0.13
	Gelatina	G1	0.97	0.91	0.99	0.40	0.83	0.91	0.98	0.03	0.05	0.08	0.26	0.10	0.16	0.22
		G2	0.96	0.90	0.98	0.38	0.82	0.90	0.98	0.03	0.05	0.07	0.23	0.09	0.15	0.19
	Caseína	C1	0.05	0.00	0.04	0.00	0.01	0.00	0.03	0.50	0.52	0.16	0.15	0.21	0.42	0.14
		C2	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.22	0.24	0.03	0.02	0.09	0.18	0.01
LCR	Gema de ovo	0.05	0.02	0.06	0.03	0.04	0.02	0.06	0.86	0.81	0.53	0.43	0.66	0.71	0.39	
	Cola	0.53	0.94	0.99	0.44	0.85	0.93	0.99	0.03	0.04	0.08	0.24	0.10	0.14	0.19	
	Caseína	0.05	0.02	0.04	0.02	0.03	0.01	0.04	0.38	0.35	0.19	0.17	0.30	0.25	0.11	

Verde – filmes à base de cola: A – “1976 - Cola + Gesso”; B – “1976 - Cola + Cré”; C – “1976 - Óleo de linho + cola”; D – “1976 - 1 ml óleo de linho + 3 ml sol cola + Branco de chumbo”; E – “1976 - Branco de chumbo + óleo linho + gotas de sol. cola 25 %”; F – “1976 - 1 ml óleo de linho + 1 ml sol. cola 25 % + branco de chumbo”; G – “1976 - Cola + amido (não emul.)”;

Azul – filmes à base de gema de ovo: H – “1976 - Gema de ovo”; I – “1976 - Gema de ovo + Branco de chumbo (não emul.)”; J – “1976 - Ovo (albumina + gema); J – “1976 - Ovo + óleo + Branco de chumbo”; K – “1976 - 1 ml óleo + ovo + Branco de chumbo”; L – “1976 - Branco ovo (albumina)”; M – “1976 - Albumina + óleo”; N – “1976 - Albumina + Branco de chumbo”.

Como é possível verificar pela análise dos dados anteriores, em todos os casos há uma correspondência entre a têmpera usada no filme e a identificada pelo método Pico-Tag®+HPLC, independentemente dos padrões de têmperas escolhidos (Publicados ou LCR). No entanto, em geral, a correlação é melhor com os padrões do LCR. De notar ainda que este método não permite a distinção entre têmperas de gema de ovo e têmperas de clara de ovo, visto a proteína detectada (albumina) ser a mesma em ambos os casos. Caso se pretenda diferenciar estes dois tipos de têmperas será necessário recorrer a outros métodos, nomeadamente identificação de ácidos gordos: na gema de ovo verifica-se a presença de palmitato e estearato e a ausência de azelato<sup>[3]</sup> enquanto que na clara de ovo não há ácidos gordos.

## 5.2 Estudo do envelhecimento de aglutinantes de têmperas proteicas

No decorrer dos diferentes tipos de envelhecimento, foi estudada a variação da cor e da composição em aminoácidos para os vários filmes: i) envelhecimento das têmperas puras; ii) envelhecimento das preparações de cré e gesso; iii) envelhecimento das tintas;

### Colorimetria

Para além da técnica Pico-Tag<sup>®</sup>+HPLC para análise da quantidade relativa dos diferentes aminoácidos, foi analisada a cor por cromaticidade.

Para tal foi utilizado um espectrofotómetro Mercury<sup>®</sup> da DataColor Internacional (Figura 15). Neste equipamento, a fonte de luz é uma lâmpada de xénon e o detector é um fotodíodo sensível à região do espectro 360-750 nm.

Uma das limitações desta técnica é que é necessário uma área mínima de amostra com um raio de cerca 2 mm para efectuar esta análise. Como nem sempre foi possível recolher amostras desta dimensão, porque estas se fragmentavam em pedaços mais pequenos, não foi possível obter a cor de todas as amostras.

Foram, portanto, medidos os parâmetros  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (eixo verde-vermelho),  $b^*$  (eixo azul-amarelo),  $c^*$  (tom) e  $h$  (saturação). Estes resultados podem ser visualizados no Anexo 2. Como a análise destes parâmetros não é muito intuitiva, inseriram-se as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  de cada filme no programa *Adobe Photoshop CS2<sup>®</sup>* obtendo-se a cor correspondente. Na Tabela 7 são apresentadas as cores obtidas para cada filme.

Com o auxílio do programa *Excel*, foram também efectuados gráficos para análise da evolução das coordenadas ( $a^*$ ,  $b^*$ ) e  $L^*$  ao longo do tempo de modo a analisar se as amostras escureciam ou aclaravam (análise do parâmetro  $L^*$ ) ou se havia algum desvio para alguma cor específica ( $a^*$ ,  $b^*$ ). Estes resultados não são mostrados e apenas são apresentados alguns gráficos como exemplo.

Analisando os dados colorimétricos da Tabela 7 foi possível verificar que:

- a cor mantém-se praticamente inalterada ao longo do envelhecimento natural, como já seria de esperar, pois decorreu pouco tempo;
- nos filmes à base de gelatina e caseína, não se verificam grandes alterações na cor, independentemente do tipo de envelhecimento utilizado. No entanto, apesar de esperados, estes dados não são representativos pois efectuaram-se poucas análises devido quer ao facto da área disponível ser insuficiente para análise, quer ao facto de não ser ter efectuado o envelhecimento na câmara de UV-Vis para vários filmes de gelatina e caseína.
- nos filmes à base de gema de ovo, verifica-se uma alteração de cor, principalmente na ausência de pigmento. Na câmara de UV-Visível verifica-se uma atenuação da cor: o parâmetro  $L^*$  vai aumentando ao longo do tempo, principalmente no início do envelhecimento, como é possível ver na Figura 16. Pelo contrário, na câmara climática verifica-se um escurecimento da cor, com o parâmetro  $L^*$  a diminuir



Figura 15 – Espectrofotómetro Mercury<sup>®</sup> da DataColor Internacional

acentuadamente no início do envelhecimento (Figura 17). No envelhecimento acelerado usando as duas câmaras consecutivamente verifica-se um escurecimento mais acentuado, como se as duas câmaras actuassem sinergisticamente (na Figura 18 é possível analisar o efeito deste envelhecimento nos parâmetros  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ : um desvio para o castanho escuro e um acentuamento no escurecimento da cor). Estas alterações cromáticas deixam de ser tão pronunciadas no caso da têmpera de gema de ovo estar misturada com pigmentos, como se o pigmento protegesse de alguma forma a têmpera da degradação.

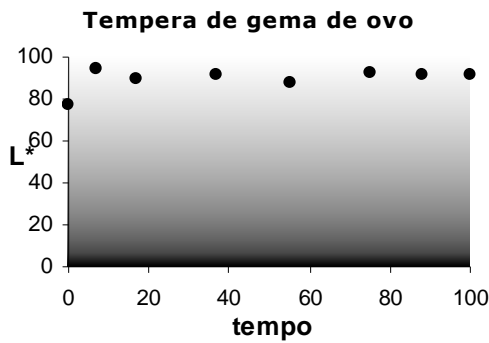


Figura 16 - Variação de  $L^*$ , para o filme "Têmpera de gema de ovo", ao longo do envelhecimento na câmara de UV-Visível.

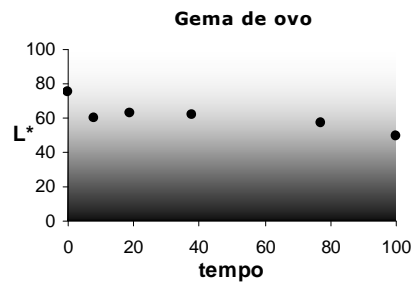
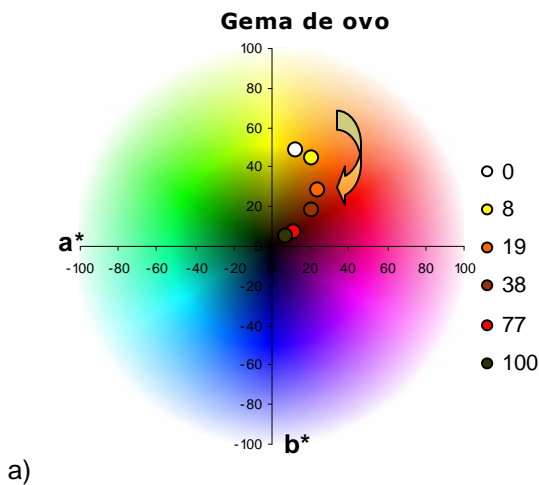
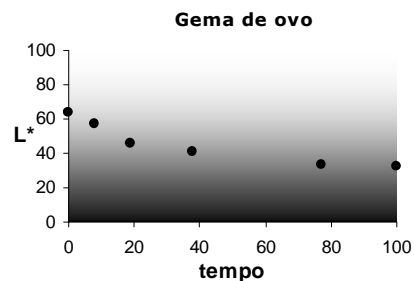


Figura 17 - Variação de  $L^*$ , para o filme "Gema de ovo", ao longo do envelhecimento na câmara climática.



a)



b)

Figura 18 – Variação ao longo do tempo, para o filme "Gema de ovo", para o envelhecimento nas câmaras de UV-Visível e climática de a)  $a^*$  e  $b^*$ ; b)  $L^*$ .

Tabela 7 – Cor obtida no *Photoshop* correspondente aos parâmetros L\*, a\*, b\* obtidos no DataColor para todos os filmes durante o envelhecimento natural e artificial nas várias câmaras.

Filmes	Envelhecimento natural (dias)							Câmara UV-Vis (correspondência em anos)								Câmara climática (correspondência em anos)						Câmara UV-Vis + THR (correspondência em anos)						
	0	195	537	1005	1539	2139	4323	0	7	17	37	55	75	88	100	0	7	17	37	75	100	0	7	17	37	75	100	
Gema de ovo																												
Tp. gema de ovo																												
Cola + Gesso																						-	-	-	-	-	-	
Cola + Cré																						-	-	-	-	-	-	
Branco Pb + TO					-	-	-									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Branco Pb + TG					-	-	-									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bindheimite + TO					-	-	-									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bindheimite + TG						-		*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
Hematite + TO					-	-	-															-	-	-	-	-	-	-
Hematite + TG						-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
Ouropigmento + TO					-	-										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ouropigmento + TG						-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
Goetite + TO					-	-													-		-	-	-	-	-	-	-	
Goetite + TG						-										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Realgar + TO					-	-	-									-	-	-	-	-	-	-						-
Realgar + TG						-	-									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Vermelhão + TO					-																	-	-	-	-	-	-	
Vermelhão + TG						-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*

Tabela 7 (cont.) – Cor obtida no *Photoshop* correspondente aos parâmetros L\*, a\*, b\* obtidos no DataColor para todos os filmes durante o envelhecimento natural e artificial nas várias câmaras.

Filmes	Envelhecimento natural (dias)							Câmara UV-Vis (correspondência em anos)								Câmara climática (correspondência em anos)						Câmara UV-Vis + THR (correspondência em anos)					
	0	195	537	1005	1539	2139	4323	0	7	17	37	55	75	88	100	0	7	17	37	75	100	0	7	17	37	75	100
Azurre + TO					-	-										-	-	-	-	-	-					-	-
Azurre + TG					-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
Azurre + TC								*	*	*	*	*	*	*	*							*	*	*	*	*	*
Ultramarino + TO					-	-	-									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ultramarino + TG						-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ultramarino + TC								*	*	*	*	*	*	*	*							*	*	*	*	*	*
Malaquite + TO					-	-	-									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malaquite + TG					-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malaquite + TC								*	*	*	*	*	*	*	*							*	*	*	*	*	*
Terra verde + TO							-											-							-		
Terra verde + TG					-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Terra verde + TC								*	*	*	*	*	*	*	*							*	*	*	*	*	*
Crisocola + TO																											
Crisocola + TG					-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crisocola + TC								*	*	*	*	*	*	*	*							*	*	*	*	*	*

TO – Têmpera de gema de ovo; TG – Têmpera de gelatina; TC – Têmpera de caseína; "-" – área insuficiente para análise; \* - Não efectuou envelhecimento na câmara de UV-Vis.

Nota - A têmpera de gema de ovo é transparente, pelo que adquire um tom branco acinzentado influenciado pelo local onde é colocada a amostra (uma folha de papel branca) aquando da análise com o DataColor.



### Pico-Tag®+HPLC

Os cromatogramas obtidos na análise de aminoácidos pelo método Pico-Tag®+HPLC podem ser visualizados no Anexo 3. A partir destes foi efectuada a correlação entre estes valores e os valores padrão (Anexo 1) de modo a analisar a eficácia do método Pico-Tag®+HPLC.

Para o estudo da degradação das proteínas seria ideal determinar a quantidade absoluta de cada aminoácido, pesando as amostras e usando o padrão interno (Nor). No entanto, devido à indisponibilidade de utilização de uma micro-balança isto não foi possível. Assim, apenas se determinou a quantidade relativa de cada aminoácido (calculada com base na área total de todos os aminoácidos).

Os resultados das correlações entre valores experimentais e padrão e das áreas relativas de cada aminoácido encontram-se resumidos nas tabelas e gráficos seguintes.

### Gema de ovo

Tabela 8 e Figura 19 (a-d) – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Gema de ovo”, durante os envelhecimento acelerados, e os valores padrão publicados e do LCR.

Valores padrão			Envelhecimento na câmara UV-Visível, CEN (anos)							
			0	7	17	37	55	75	88	100
Publicados	Gema de ovo	O1	0.62	0.41	0.62	0.44	0.63	0.93	0.82	0.55
		O2	0.65	0.27	0.35	0.20	0.40	0.67	0.56	0.25
	Gelatina	G1	0.00	0.03	0.06	0.08	0.12	0.04	0.07	0.12
		G2	0.00	0.03	0.05	0.07	0.11	0.03	0.06	0.10
	Caseína	C1	0.39	0.13	0.29	0.11	0.36	0.48	0.49	0.30
		C2	0.19	0.01	0.04	0.01	0.10	0.16	0.17	0.03
LCR	Tp. Gema		0.99	0.64	0.55	0.57	0.73	0.78	0.79	0.42
	Tp. Gelatina		0.02	0.06	0.09	0.11	0.15	0.05	0.09	0.14
	Tp. Caseína		0.57	0.33	0.32	0.26	0.45	0.37	0.49	0.30

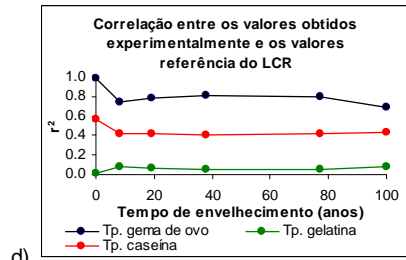
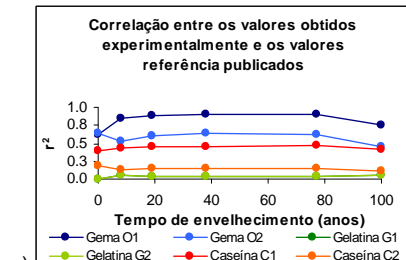
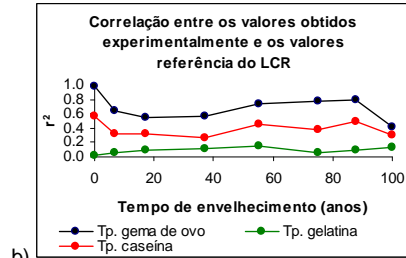
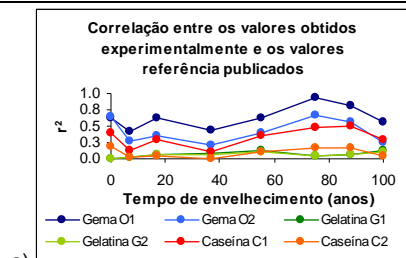
Valores padrão			Envelhecimento na câmara climática, CEN (anos)						
			0	8	19	38	77	100	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.62	0.84	0.88	0.91	0.90	0.76	
		O2	0.65	0.53	0.60	0.63	0.62	0.45	
	Gelatina	G1	0.00	0.06	0.04	0.04	0.04	0.06	
		G2	0.00	0.05	0.04	0.03	0.03	0.05	
	Caseína	C1	0.39	0.43	0.45	0.45	0.46	0.41	
		C2	0.19	0.13	0.15	0.15	0.16	0.12	
LCR	Tp. Gema		0.99	0.75	0.79	0.81	0.79	0.69	
	Tp. Gelatina		0.02	0.08	0.06	0.05	0.06	0.08	
	Tp. Caseína		0.57	0.42	0.41	0.41	0.42	0.44	

Valores padrão			Envelhecimento na câmara UV-Visível, CEN (anos)							
			0	7	17	37	55	75	88	100
Publicados	Gema de ovo	O1	0.62	0.41	0.62	0.44	0.63	0.93	0.82	0.55
		O2	0.65	0.27	0.35	0.20	0.40	0.67	0.56	0.25
	Gelatina	G1	0.00	0.03	0.06	0.08	0.12	0.04	0.07	0.12
		G2	0.00	0.03	0.05	0.07	0.11	0.03	0.06	0.10
	Caseína	C1	0.39	0.13	0.29	0.11	0.36	0.48	0.49	0.30
		C2	0.19	0.01	0.04	0.01	0.10	0.16	0.17	0.03
LCR	Tp. Gema		0.99	0.64	0.55	0.57	0.73	0.78	0.79	0.42
	Tp. Gelatina		0.02	0.06	0.09	0.11	0.15	0.05	0.09	0.14
	Tp. Caseína		0.57	0.33	0.32	0.26	0.45	0.37	0.49	0.30

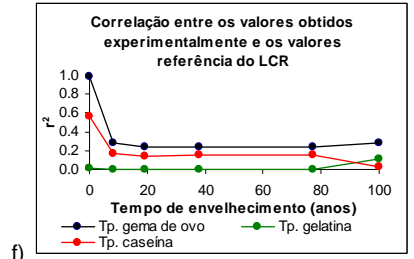
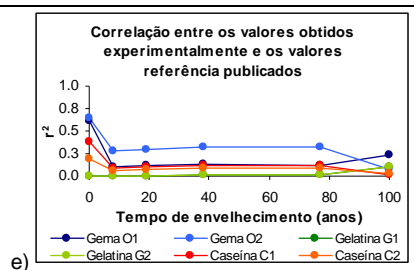
Valores padrão			Envelhecimento na câmara climática, CEN (anos)						
			0	8	19	38	77	100	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.62	0.84	0.88	0.91	0.90	0.76	
		O2	0.65	0.53	0.60	0.63	0.62	0.45	
	Gelatina	G1	0.00	0.06	0.04	0.04	0.04	0.06	
		G2	0.00	0.05	0.04	0.03	0.03	0.05	
	Caseína	C1	0.39	0.43	0.45	0.45	0.46	0.41	
		C2	0.19	0.13	0.15	0.15	0.16	0.12	
LCR	Tp. Gema		0.99	0.75	0.79	0.81	0.79	0.69	
	Tp. Gelatina		0.02	0.08	0.06	0.05	0.06	0.08	
	Tp. Caseína		0.57	0.42	0.41	0.41	0.42	0.44	



CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

Tabela 8 (cont) e Figura 19 (e-f) – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Gema de ovo”, durante os envelhecimento acelerados, e os valores padrão publicados e do LCR.

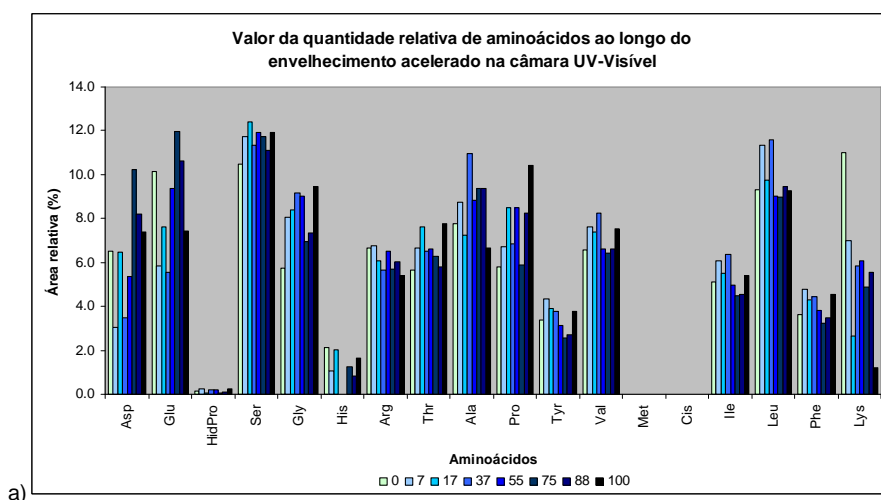
Valores padrão		Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática, CEN (anos)						
		0	8	19	38	77	100	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.62	0.10	0.12	0.14	0.12	0.23
		O2	0.65	0.28	0.29	0.33	0.32	0.07
	Gelatina	G1	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.10
		G2	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.11
	Caseína	C1	0.39	0.09	0.10	0.12	0.11	0.01
		C2	0.19	0.06	0.07	0.09	0.08	0.03
LCR	Tp. Gema	0.99	0.28	0.24	0.23	0.23	0.28	
	Tp. Gelatina	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	
	Tp. Caseína	0.57	0.16	0.15	0.15	0.16	0.03	

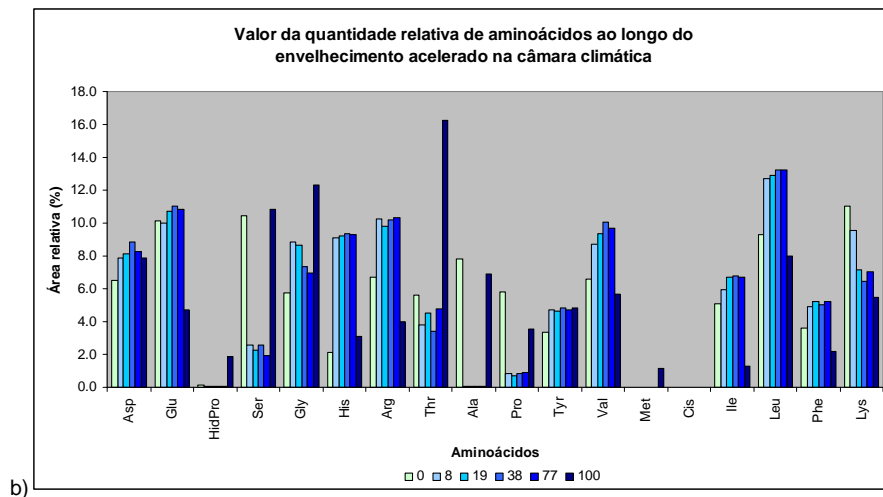


CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

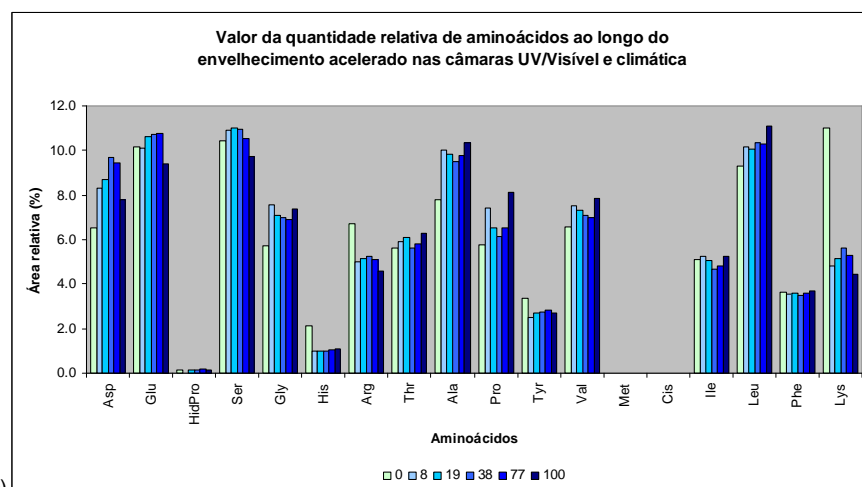
Analisando a tabela anterior, para o filme “Gema de ovo” é possível verificar que a correlação entre os valores experimentais e padrão é sempre mais elevada quando a correlação é feita com os valores padrão de “Têmpera de gema de ovo”, como seria de esperar. No entanto, os valores de correlação baixam ligeiramente quando as amostras são submetidas ao envelhecimento na câmara climática, principalmente nas primeiras horas de envelhecimento. No caso da utilização subsequente das duas câmaras, UV-Visível e climática, verifica-se que os valores de correlação com “têmpera de gema de ovo” baixam consideravelmente, principalmente nas primeiras horas de envelhecimento acelerado. Este facto indica que quanto mais envelhecida se encontra a amostra, mais difícil é identificá-la.

A variação da quantidade relativa dos aminoácidos ao longo de cada tipo de envelhecimento para os filmes “Gema de ovo” pode ser analisada nos três gráficos seguintes (Figura 20).





b)



c)

Figura 20 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Gema de ovo” durante o envelhecimento: a) na câmara de UV-Visível; b) na câmara climática; e c) nas câmaras UV-Visível e climática.

Nestes gráficos é possível verificar que não há uma variação homogênea em qualquer um dos aminoácidos, qualquer que seja o tipo de envelhecimento. No entanto, numa análise mais minuciosa verifica-se, uma diminuição progressiva da quantidade relativa de alguns aminoácidos, como a Lys, e, noutros casos, uma manutenção da quantidade relativa de aminoácidos ao longo do envelhecimento (Val, Leu e Phe). Isto deve-se, provavelmente, ao facto da amostra ser muito complexa e por a têmpera de ovo ter uma baixa quantidade de aminoácidos estáveis<sup>26</sup> (Pro, OH-Pro, Ala, Val).<sup>[5]</sup>

<sup>26</sup> Os aminoácidos estáveis são menos sensíveis aos efeitos do envelhecimento.<sup>[5]</sup>

**Têmpera de gema de ovo**

Tabela 9 e Figura 21 (a-f) – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de gema de ovo”, durante os envelhecimento acelerados, e os valores padrão publicados e do LCR.

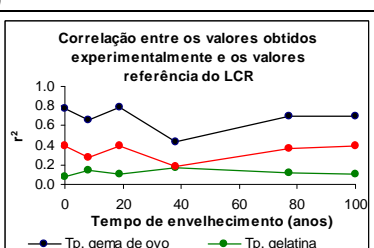
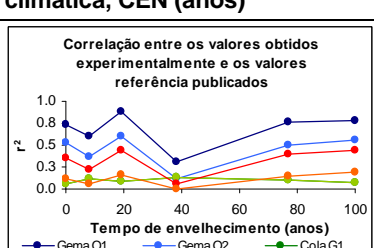
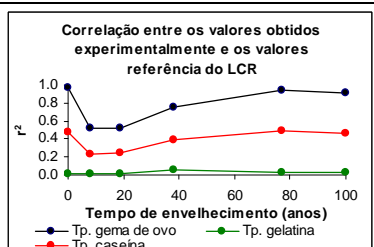
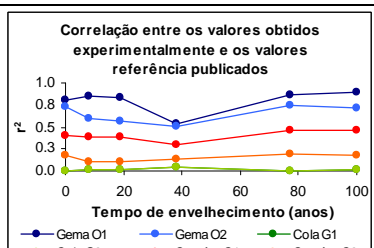
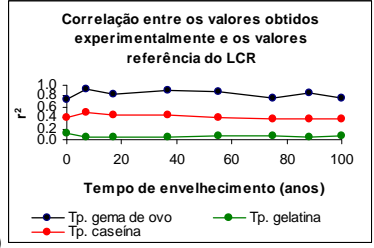
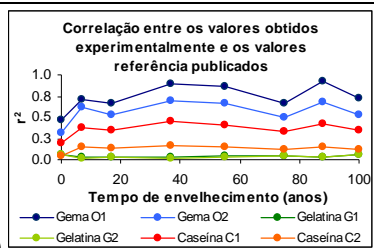
Valores padrão			Envelhecimento na câmara UV-Visível, CEN (anos)							
			0	7	17	37	55	75	88	100
Publicados	Gema de ovo	O1	0.46	0.72	0.67	0.89	0.87	0.67	0.92	0.73
		O2	0.32	0.61	0.53	0.70	0.66	0.50	0.69	0.52
	Gelatina	G1	0.07	0.02	0.03	0.02	0.04	0.05	0.03	0.06
		G2	0.06	0.02	0.03	0.02	0.04	0.04	0.03	0.05
	Caseína	C1	0.19	0.38	0.35	0.45	0.42	0.33	0.43	0.35
		C2	0.05	0.15	0.13	0.17	0.15	0.12	0.16	0.12
LCR	Tp. Gema		0.74	0.92	0.83	0.91	0.88	0.75	0.86	0.77
	Tp. Gelatina		0.11	0.05	0.05	0.05	0.06	0.07	0.05	0.08
	Tp. Caseína		0.40	0.49	0.46	0.46	0.41	0.39	0.38	0.39

Valores padrão			Envelhecimento na câmara climática, CEN (anos)						
			0	8	19	38	77	100	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.80	0.84	0.84	0.54	0.87	0.89	
		O2	0.73	0.59	0.57	0.50	0.75	0.72	
	Gelatina	G1	0.00	0.01	0.02	0.04	0.01	0.01	
		G2	0.00	0.01	0.01	0.04	0.00	0.01	
	Caseína	C1	0.41	0.39	0.39	0.30	0.46	0.46	
		C2	0.17	0.11	0.10	0.13	0.19	0.17	
LCR	Tp. Gema		0.98	0.52	0.52	0.76	0.94	0.91	
	Tp. Gelatina		0.01	0.02	0.02	0.06	0.02	0.03	
	Tp. Caseína		0.48	0.23	0.24	0.40	0.49	0.47	

Valores padrão			Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática, CEN (anos)						
			0	8	19	38	77	100	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.74	0.61	0.88	0.31	0.76	0.78	
		O2	0.53	0.37	0.60	0.11	0.50	0.56	
	Gelatina	G1	0.06	0.12	0.09	0.14	0.10	0.08	
		G2	0.05	0.12	0.08	0.13	0.10	0.07	
	Caseína	C1	0.35	0.22	0.45	0.06	0.40	0.44	
		C2	0.12	0.06	0.16	0.00	0.15	0.18	
LCR	Tp. Gema		0.78	0.66	0.79	0.43	0.69	0.70	
	Tp. Gelatina		0.08	0.15	0.11	0.18	0.12	0.10	
	Tp. Caseína		0.39	0.28	0.39	0.19	0.37	0.39	



CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

No caso dos filmes “têmpera de gema de ovo” verifica-se um comportamento parecido ao dos filmes “Gema de ovo” mas não tão acentuado, continuando a verificar-se uma ligeira diminuição na correlação entre os valores experimentais e padrão, principalmente nas primeiras horas após a utilização da câmara climática.

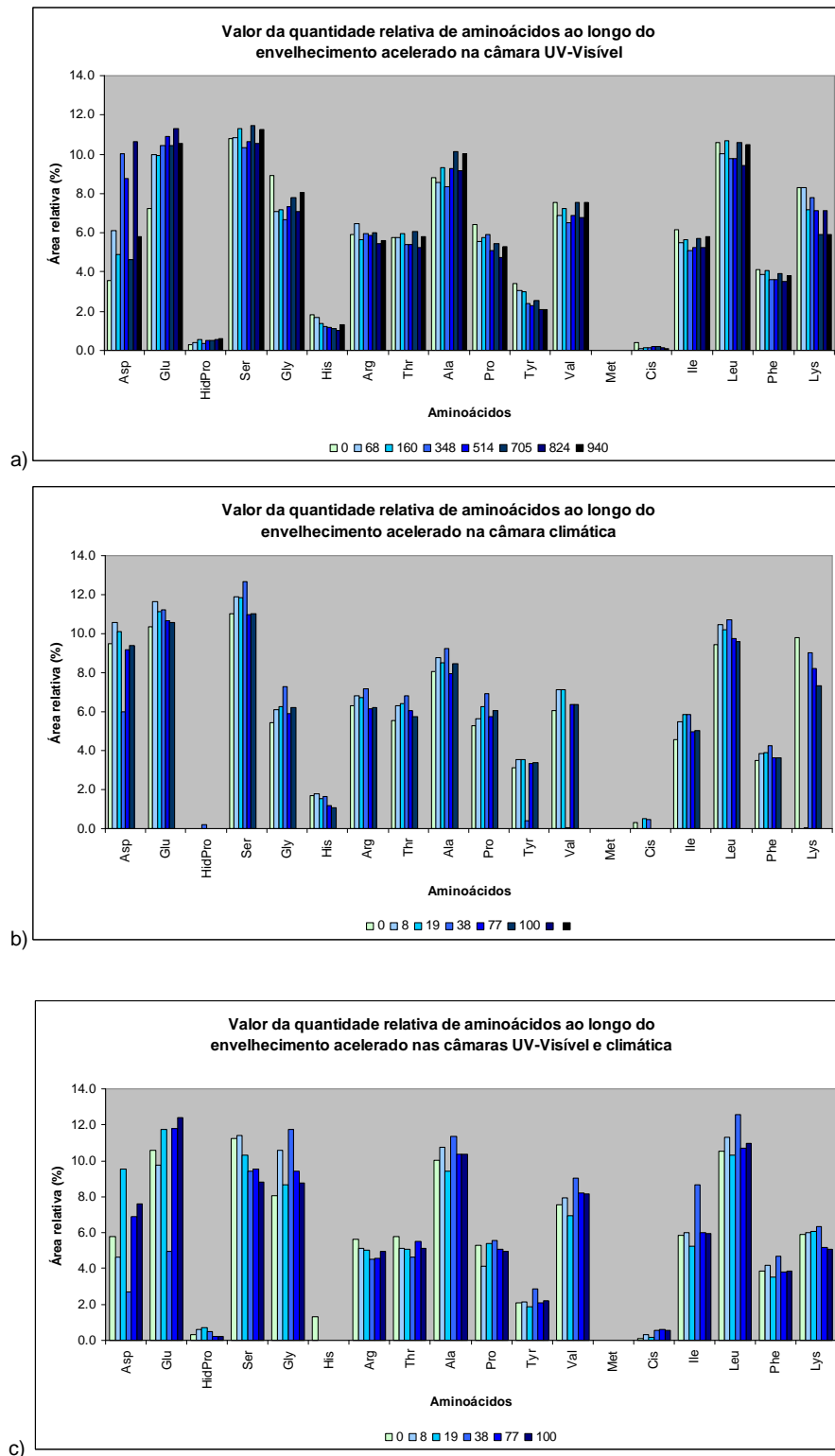


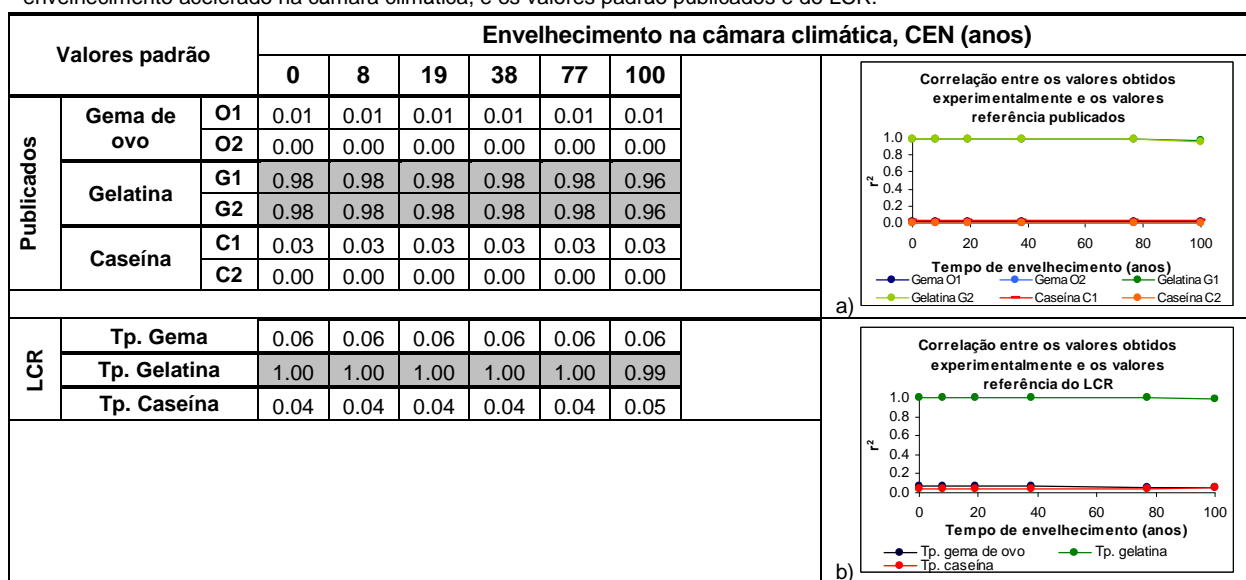
Figura 22 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento: a) na câmara de UV-Visível; b) na câmara climática; e c) nas câmaras UV-Visível e climática.

A variação da composição em aminoácidos nos diversos filmes é idêntica à obtida anteriormente para os filmes “Gema de ovo”, mas as variações são menos acentuadas. Isto já seria de esperar porque a “Têmpera de gema de ovo” é, na verdade a “Gema de ovo” dissolvida.

### Têmpera de gelatina

De lembrar que, devido a um problema na câmara UV-Visível, não foi possível efectuar os envelhecimentos desta têmpera nesta câmara, pelo que só se mostram os resultados obtidos na câmara climática.

Tabela 10 e Figura 23 (a-b) – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de gelatina”, durante o envelhecimento acelerado na câmara climática, e os valores padrão publicados e do LCR.



CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

É possível verificar que a correlação é excelente ( $r^2 > 0,96$ ) entre os valores experimentais dos filmes “Têmpera de gelatina” e os valores padrão para a gelatina, independentemente do tempo de envelhecimento que decorreu. Os valores da variação da composição de aminoácidos ao longo do envelhecimento (Figura 24) indicam que esta têmpera é muito estável, visto estes valores serem praticamente constantes.

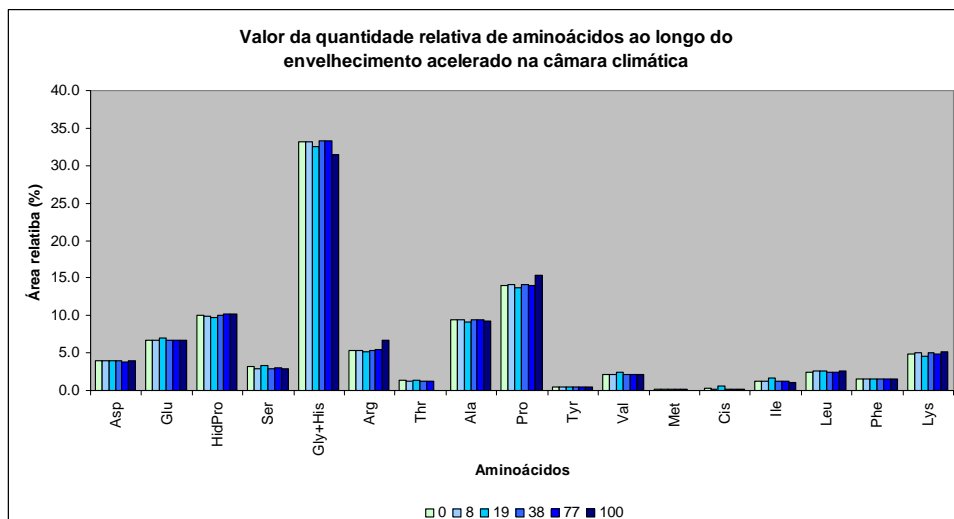
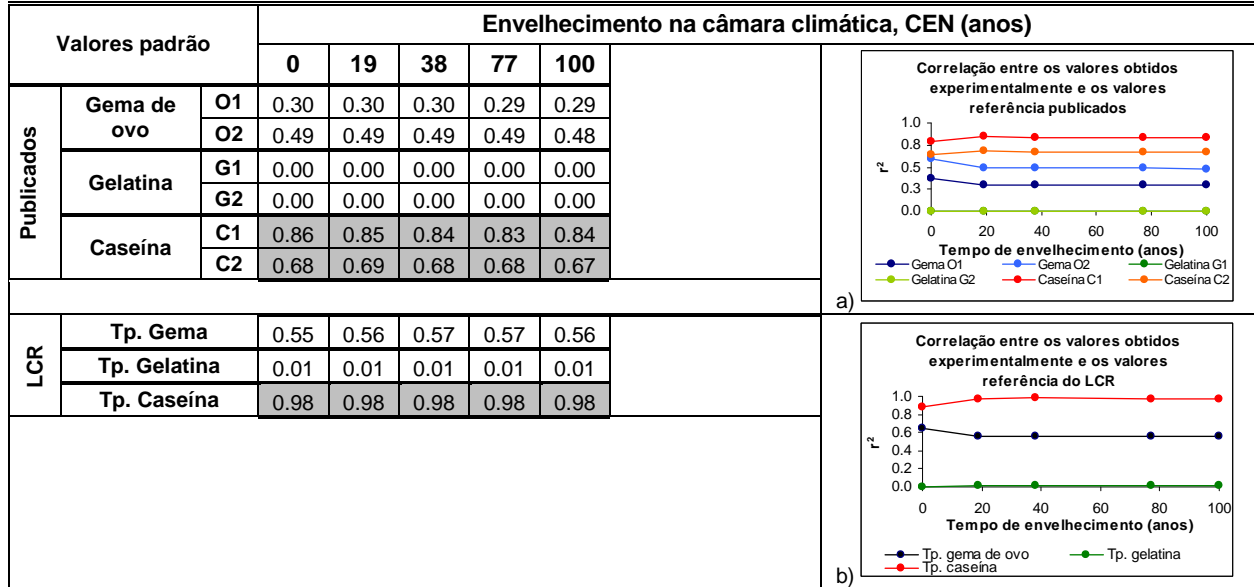


Figura 24 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Têmpera de gelatina” durante o envelhecimento na câmara climática.

### Têmpera de caseína

Também neste caso não foi possível efectuar os envelhecimentos desta têmpera na câmara de UV-Visível, pelo que só se mostram os resultados obtidos na câmara climática.

Tabela 11 e Figura 25 (a-b) – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Têmpera de caseína”, durante o envelhecimento acelerado na câmara climática, e os valores padrão publicados e do LCR.



CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

Também neste caso, para as amostras “Têmpera de caseína”, é possível verificar que a correlação é razoável, especialmente quando comparado com o padrão do LCR ( $r^2 > 0,98$ ), independentemente do tempo de envelhecimento acelerado que decorreu. Os valores da variação da composição de aminoácidos ao longo do envelhecimento (Figura 26) indicam que esta têmpera também é muito estável, visto estes valores serem praticamente constantes.

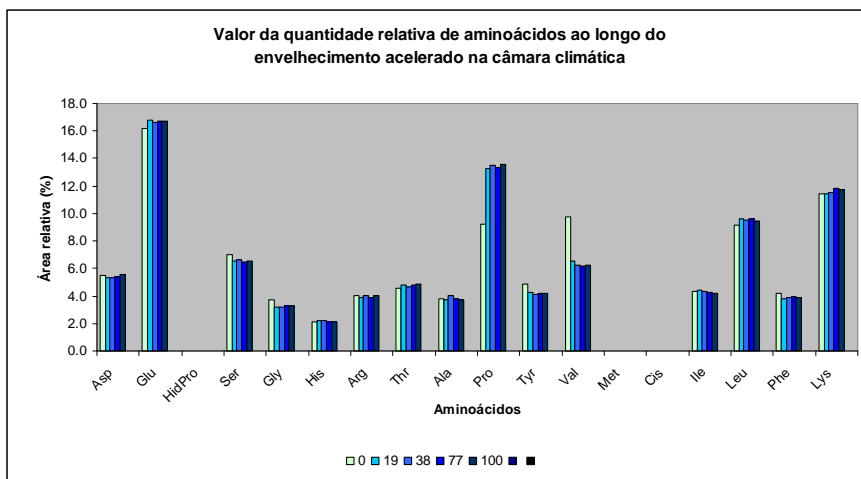
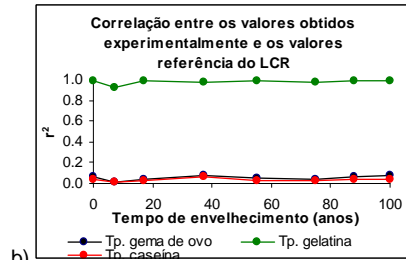
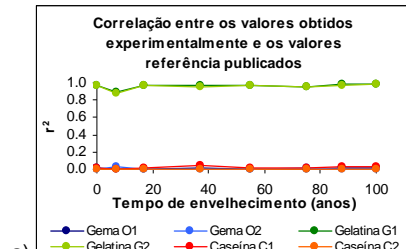


Figura 26 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Têmpera de caseína” durante o envelhecimento na câmara climática.

### Preparação Cola + Gesso

Tabela 12 e Figura 27 (a-b) – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Preparação cola + gesso”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.

Valores padrão			Envelhecimento na câmara UV-Visível, CEN (anos)							
			0	7	17	37	55	75	88	100
Publicados	Gema de ovo	O1	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02
		O2	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
	Gelatina	G1	0.96	0.90	0.97	0.96	0.98	0.96	0.98	0.99
		G2	0.95	0.89	0.97	0.95	0.97	0.95	0.97	0.98
	Caseína	C1	0.04	0.00	0.01	0.04	0.01	0.01	0.03	0.03
		C2	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
LCR	Tp. Gema		0.06	0.01	0.04	0.07	0.05	0.04	0.07	0.07
	Tp. Gelatina		0.99	0.92	0.98	0.98	0.98	0.97	0.99	0.99
	Tp. Caseína		0.03	0.02	0.03	0.06	0.03	0.02	0.04	0.03



CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

Os resultados para o filme “Preparação de cola + gesso”, esquematizados na Tabela 12, indicam que, como seria de esperar (depois de obtidos os valores para os filmes “têmpera de gelatina”), a correlação é muito boa para com o padrão “têmpera de gelatina”, independentemente do tempo de envelhecimento. Isto, aliado ao facto de não haver praticamente variação da composição de aminoácidos ao longo do tempo de envelhecimento (Figura 28) indica que esta preparação é muito estável. Este facto é confirmado pela utilização que este tipo de preparação tem tido ao longo de vários séculos em pintura, em que se tem verificado que é um meio muito estável.

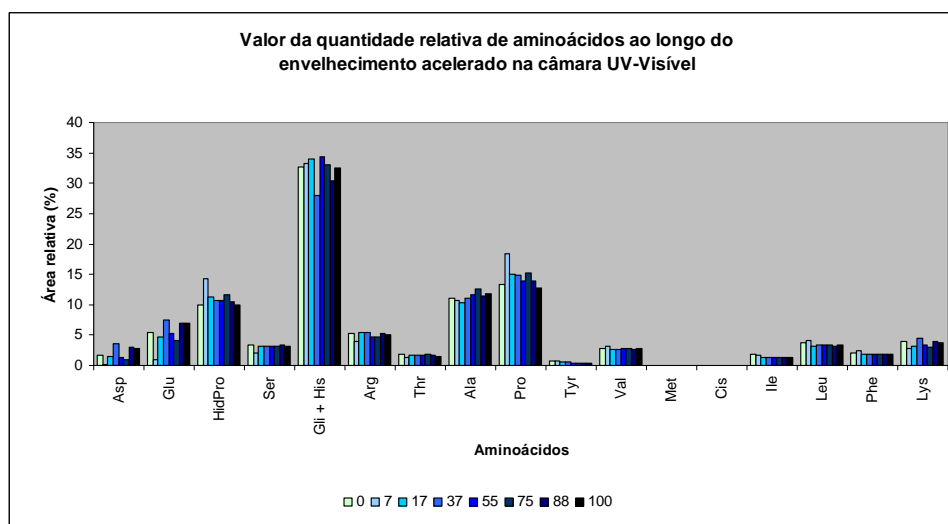
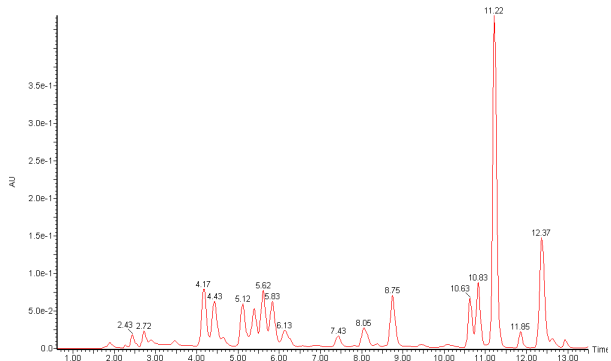


Figura 28 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Preparação cola + gesso” durante o envelhecimento na câmara UV-Visível.

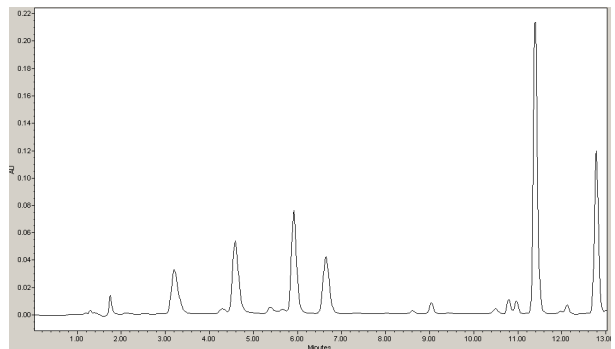


## Tintas

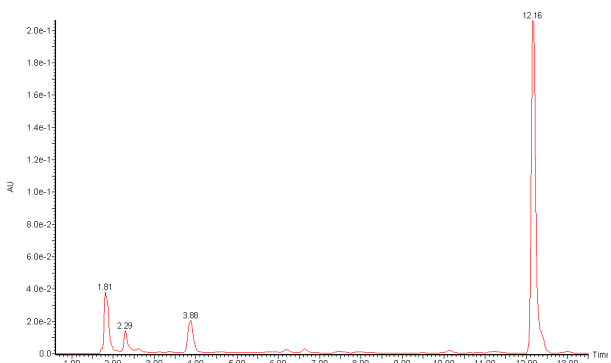
Numa primeira abordagem foi analisada uma amostra de cada tinta, obtendo-se os seguintes cromatogramas.



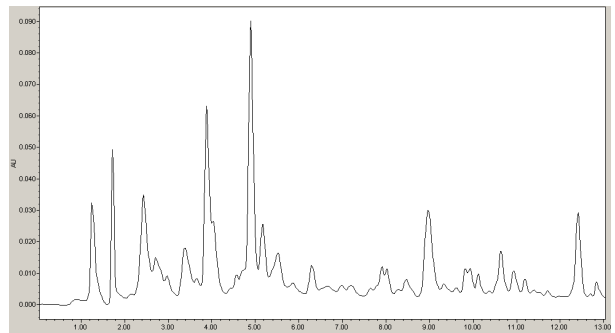
a) Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo.



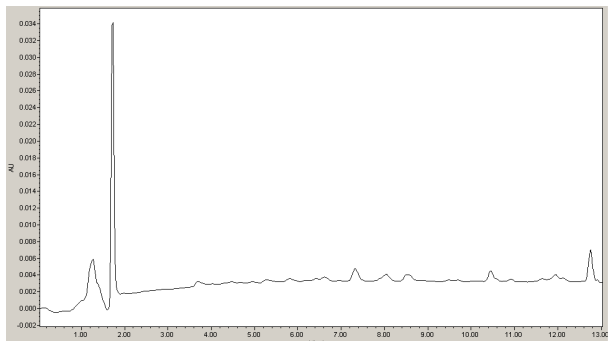
b) Tinta de branco de chumbo + têmpera de gelatina.



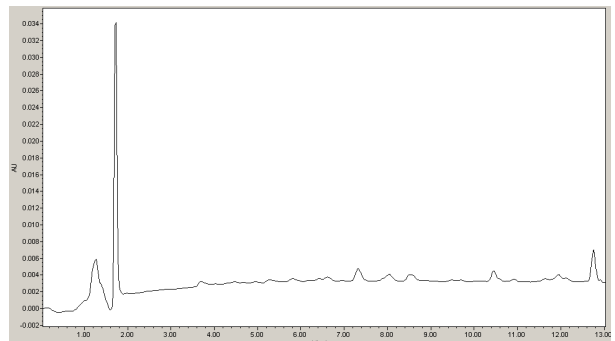
c) Tinta de bindheimite + têmpera de gema de ovo.



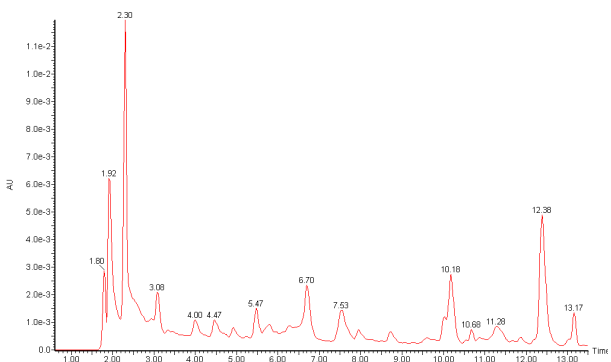
d) Tinta de bindheimite + têmpera de gelatina.



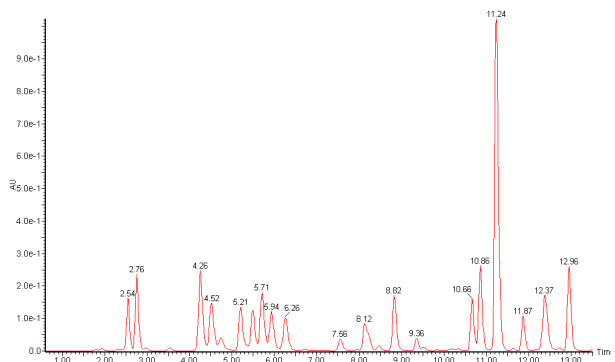
e) Tinta de hematite + têmpera de gema de ovo.



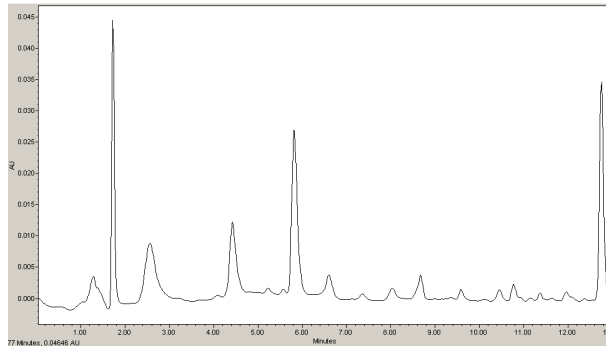
f) Tinta de ourpigmento + têmpera de gelatina.



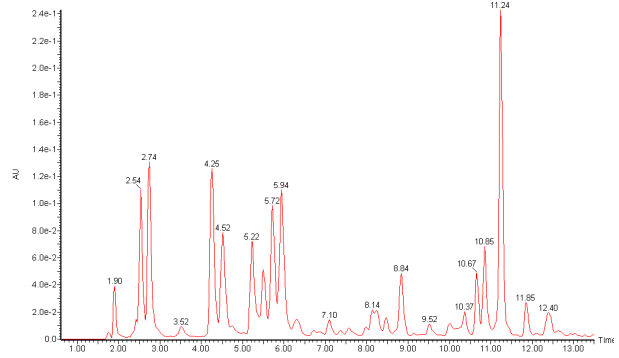
g) Tinta de goetite + têmpera de gema de ovo



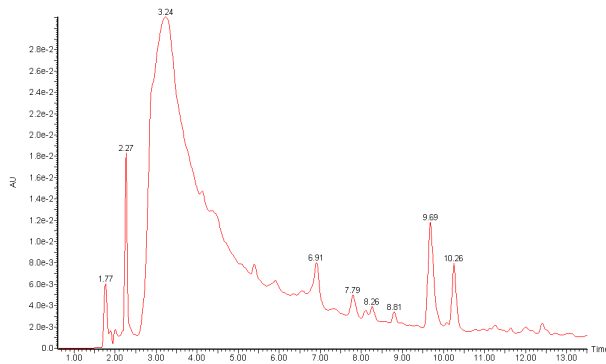
h) Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo



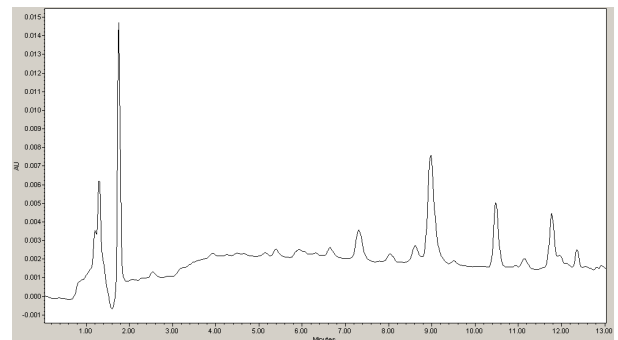
i) Tinta de realgar + têmpera de gelatina.



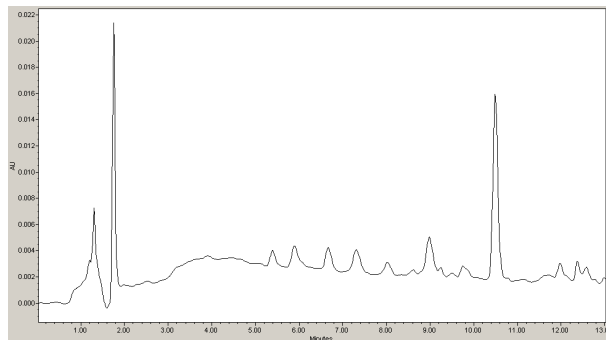
j) Tinta de vermelho + têmpera de gema de ovo.



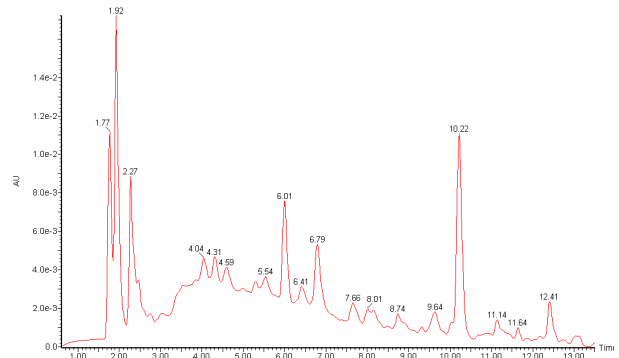
k) Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo.



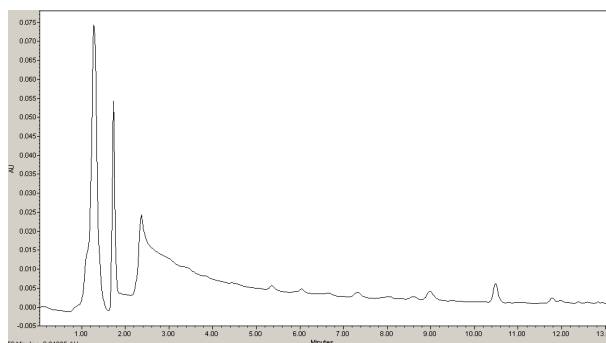
l) Tinta de azurite + têmpera de gelatina.



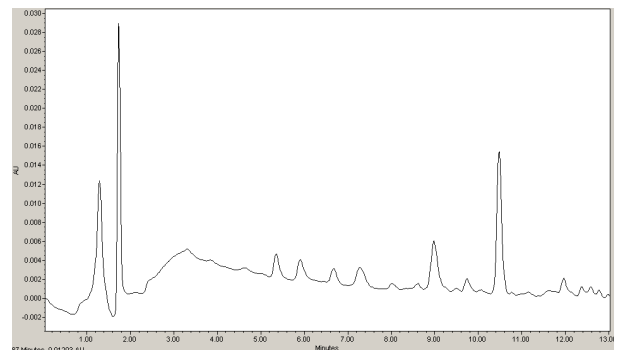
m) Tinta de azurite + têmpera de caseína



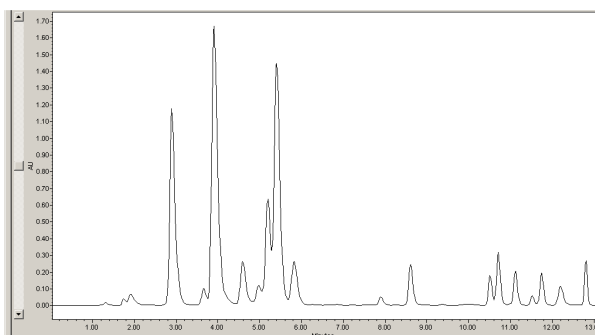
n) Tinta de malaquite + têmpera de gema de ovo



o) Tinta de malaquite + têmpera de gelatina



p) Tinta de malaquite + têmpera de caseína



q) Tinta de terra verde + têmpera de gelatina

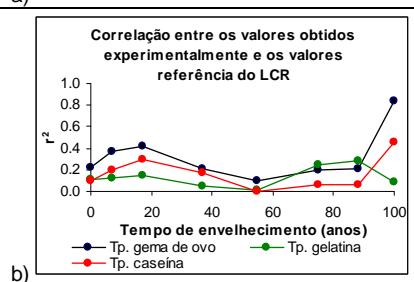
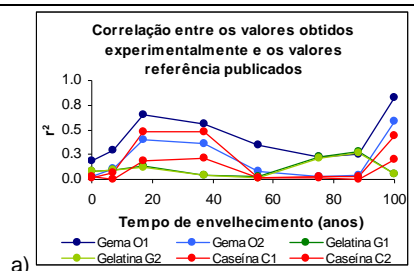
Figura 29 – Cromatograma das amostras de tinta.

Analisando estes cromatogramas foi possível verificar que alguns pigmentos interferiam na análise, nomeadamente os pigmentos à base de cobre (azurite, malaquite e crisocola). Este facto já tinha sido descrito anteriormente<sup>[3,22]</sup>, mas não se considerou que impedisse totalmente a identificação das têmperas, o que veio a verificar-se. Escolheram-se então os pigmentos branco de chumbo e realgar e para estudar a sua influência no envelhecimento das têmperas proteicas.

**Tinta de Têmpera de gema de ovo + Branco de chumbo**

Tabela 13 e Figura 30 (a e b) – Correlação entre os valores experimentais obtidos para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.

Valores padrão		Envelhecimento na câmara UV-Visível, CEN (anos)								
		0	7	17	37	55	75	88	100	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.18	0.29	0.66	0.56	0.34	0.22	0.25	0.83
		O2	0.03	0.10	0.39	0.36	0.08	0.03	0.03	0.59
	Gelatina	G1	0.08	0.10	0.14	0.05	0.02	0.23	0.29	0.06
		G2	0.07	0.09	0.12	0.04	0.02	0.22	0.27	0.06
	Caseína	C1	0.02	0.07	0.49	0.48	0.02	0.03	0.03	0.45
		C2	0.02	0.00	0.18	0.22	0.02	0.01	0.00	0.20
LCR	Tp. Gema	0.22	0.37	0.42	0.21	0.10	0.19	0.21	0.84	
	Tp. Gelatina	0.11	0.13	0.14	0.05	0.02	0.24	0.29	0.09	
	Tp. Caseína	0.09	0.19	0.30	0.17	0.00	0.06	0.06	0.45	



CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

É possível verificar que a identificação do tipo de têmpera nos filmes “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” piora com o envelhecimento na câmara de UV-Visível, podendo mesmo chegar a confundir-se com a têmpera de gema de ovo com a tempera de caseína, pelo que se conclui que o branco de chumbo dificulta a identificação de têmperas à base de gema de ovo. Isto pode dever-se ao facto das quantidades de Asp e Glu variarem consideravelmente, como se pode ver na Figura 31.

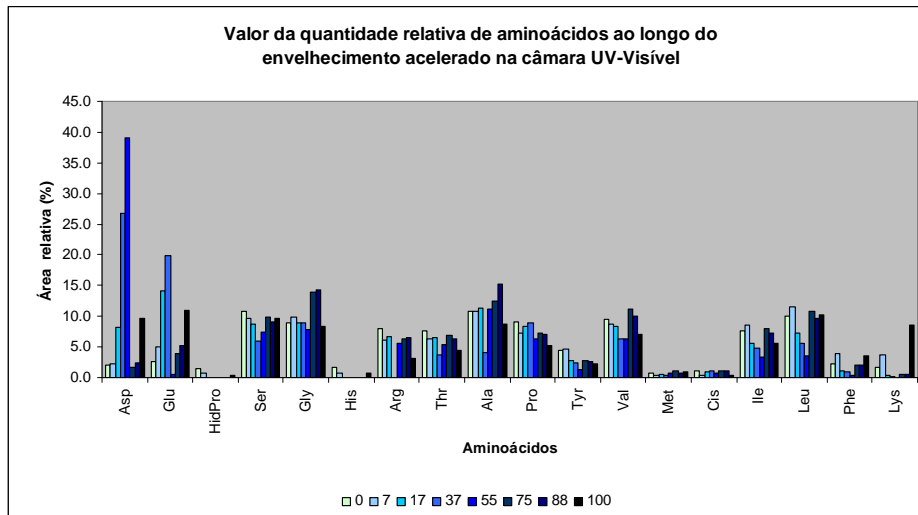


Figura 31 – Varia o da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento na câmara UV-Visível.

**Tinta de Têmpera de gema de ovo + Realgar**

Tabela 14 e Figuras 32 (a e b)– Correla o entre os valores experimentais obtidos para o filme “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo”, durante o envelhecimento acelerado na câmara UV-Visível, e os valores padrão publicados e do LCR.

Valores padrão		Envelhecimento na câmara UV-Visível, CEN (anos)								
		0	7	17	37	55	75	88	100	
Publicados	Gema de ovo	O1	0.60	0.84	0.77	0.85	0.86	0.88	0.81	0.82
		O2	0.51	0.63	0.57	0.60	0.60	0.59	0.51	0.57
	Gelatina	G1	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.06	0.11	0.07
		G2	0.02	0.02	0.04	0.04	0.03	0.06	0.10	0.06
	Caseína	C1	0.28	0.40	0.38	0.43	0.41	0.42	0.39	0.45
		C2	0.12	0.15	0.14	0.16	0.16	0.16	0.14	0.20
LCR	Tp. Gema	0.90	0.92	0.89	0.89	0.88	0.83	0.77	0.84	
	Tp. Gelatina	0.05	0.05	0.07	0.07	0.06	0.09	0.13	0.10	
	Tp. Caseína	0.47	0.46	0.47	0.48	0.43	0.41	0.38	0.47	

**Correla o entre os valores obtidos experimentalmente e os valores referência publicados**

Y-axis: r<sup>2</sup> from 0.0 to 1.0. X-axis: Tempo de envelhecimento (anos) from 0 to 100.

**Correla o entre os valores obtidos experimentalmente e os valores referência do LCR**

Y-axis: r<sup>2</sup> from 0.0 to 1.0. X-axis: Tempo de envelhecimento (anos) from 0 to 100.

CEN – Correspondência ao envelhecimento natural.

Pela análise dos resultados para os filmes “Tinta realgar + têmpera de gema de ovo” na tabela anterior, verifica-se que o realgar não influencia a identifica o da têmpera gema de ovo, pois a correla o com o padrão “Têmpera de gema de ovo”   boa, principalmente se considerarmos o padrão do LCR.

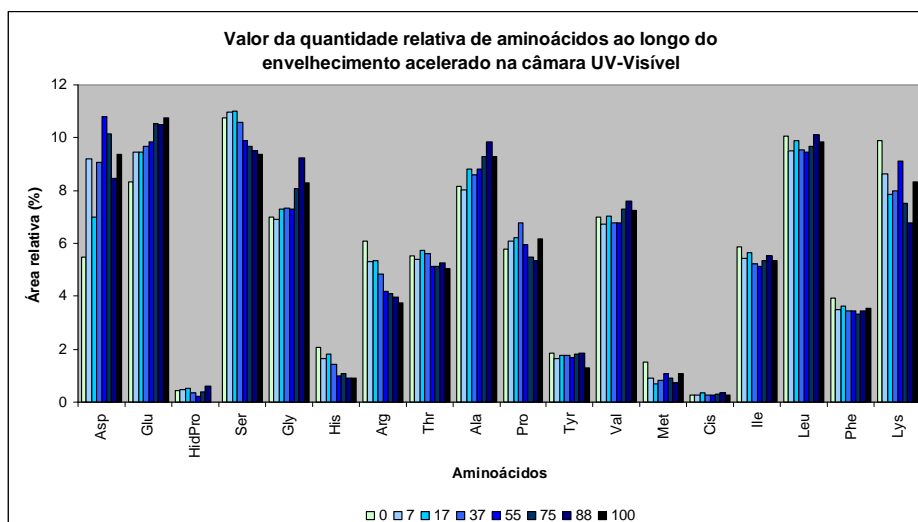


Figura 33 – Variação da quantidade relativa de cada aminoácido ao longo do tempo para a amostra “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento na câmara UV-Visível.

Ao longo do envelhecimento da têmpera de gema de ovo, na presença de realgar, verifica-se, no entanto, uma ligeira diminuição da quantidade de Ser, Lys, His e Arg.

### 5.3 Utilização do EDTA para inibir o efeito dos pigmentos sob as têmperas proteicas

Para a análise da utilização do EDTA como agente complexante do cobre procedeu-se à adição de 0,2 M Na<sub>2</sub>EDTA. Esta solução contém um tampão amónia/cloreto de amónia que proporciona um pH de ~9, favorável à formação de complexos de EDTA com os iões metálicos.<sup>[24]</sup>

Foram seleccionados os filmes: “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” e “Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo”. Compararam-se estes dois filmes porque o EDTA não tem grande influência no filme com branco de chumbo, servindo este como base de comparação. Analisou-se também o efeito em solução de padrão de aminoácido (20 µl) ao qual se adicionou cerca de 1 mg de cada um dos pigmentos mencionados (branco de chumbo e azurite).

A estas quatro amostras (“Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo”, “Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo”, “Padrão de aminoácidos + branco de chumbo” e “Padrão de aminoácidos + azurite”) foram adicionadas diversas quantidades de solução de EDTA 0,2 M em tampão a pH 9: 0 µl, 10 µl, 20µl, 50µl, 75 µl e 100 µl. Experimentou-se ainda a adição do EDTA nos diversos passos da preparação da amostra: antes da hidrólise; depois da hidrólise e antes do passo de secagem; depois do passo de secagem e antes do passo de derivatização. Nas Figura 34–Figura 37 é possível visualizar os resultados obtidos para os filmes sem adição de EDTA em com adição de 20 µl de 0,2M EDTA. Os resultados dos outros ensaios não são aqui apresentados mas os cromatogramas obtidos foram semelhantes aos mostrados anteriormente: continua a ser impossível identificar os aminoácidos nas amostras com cobre.

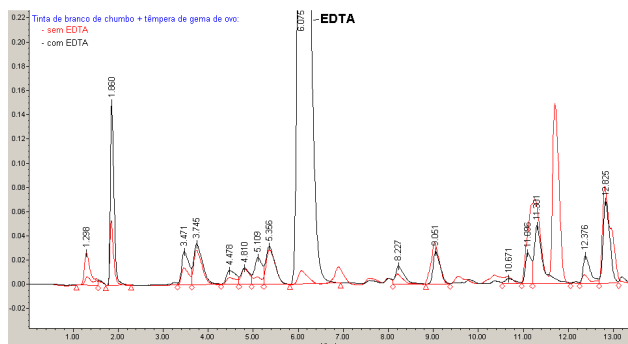


Figura 34 – Cromatograma das amostras “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” sem adição de EDTA (a vermelho) e com adição de 20 µl de EDTA 0,2 M em tampão de pH 9 (a preto).

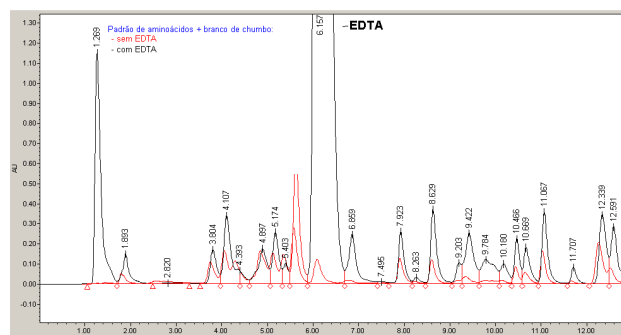


Figura 35 – Cromatograma das amostras “20 µl padrão de aminoácido + 1 mg Branco de chumbo” sem adição de EDTA (a vermelho) e com adição de 20 µl de EDTA 0,2 M em tampão de pH 9 (a preto).

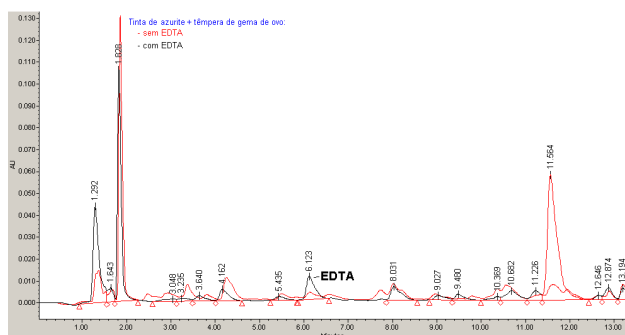


Figura 36 – Cromatograma das amostras “Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo” sem adição de EDTA (a vermelho) e com adição de 20 µl de EDTA 0,2 M em tampão de pH 9 (a preto).

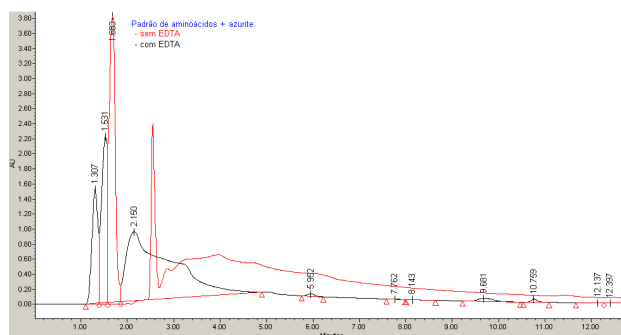


Figura 37 – Cromatograma das amostras “20 µl padrão de aminoácido + 1 mg de Azurite” sem adição de EDTA (a vermelho) e com adição de 20 µl de EDTA 0,2 M em tampão de pH 9.

É possível verificar que, quando se usa o pigmento branco de chumbo, o EDTA melhora a resolução de alguns picos, tornando mais fácil a identificação do tipo de têmpera. No entanto, quando se usa a azurite, não se verificou qualquer alteração quando a adição de EDTA e a identificação da têmpera continuou impossível. Tentou ainda aumentar-se a quantidade de EDTA adicionada (até a 1 ml) assim como diminuir a quantidade de pigmento utilizada, sem qualquer resultado no efeito de supressão da influência dos pigmentos na análise.

Analisando os resultados obtidos depreende-se que a interferência dos iões metálicos, nomeadamente do  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , ocorre logo no passo de hidrólise e que o EDTA não tem qualquer efeito para impedir esta reacção. Assim, uma hipótese seria utilizar um método de hidrólise mais rápido, como o método de hidrólise em solução por radiação micro-ondas<sup>[28]</sup>. Este método requer apenas 5 min. de hidrólise, ao contrário do método usado que requer 24h. É possível que com um tempo de hidrólise muito mais curto a decomposição dos aminoácidos não se dê de forma tão extensa, possibilitando a identificação das proteínas.

## 6. CONCLUSÕES

A técnica de HPLC implementada no LCR permite distinguir os vários tipos de aglutinantes. No entanto tem algumas limitações relacionadas com o modo de preparação da amostra, tanto mais que as quantidades de amostra disponíveis são muito pequenas: a hidrólise das proteínas pode não ser completa, assim como o passo de secagem e derivatização, para além disto, a secagem no liofilizador pode não ser bem sucedida.

Esta técnica não está ainda apurada quando as têmperas proteicas contêm pigmentos (ou outras substância) contendo cobre ou alguns outros iões metálicos.

A avaliação das alterações ocorridas nas diferentes têmperas submetidas a diferentes condições de envelhecimento acelerado permitiu detectar que:

– Há alguma alterações cromáticas das têmperas com o envelhecimento: (i) atenuação da cor na exposição à luz UV-Visível, (ii) amarelecimento e escurecimento da cor na câmara de temperatura e humidade, e (iii) efeito sinérgico entre as câmaras UV-Visível e climática, verificando-se um escurecimento da cor superior ao verificado no envelhecimento somente na câmara de temperatura e humidade. Estas alterações cromáticas são especialmente visíveis nos filmes à base de têmpera de gema de ovo, na ausência de pigmento.

– As têmperas de cola e caseína parecem ser mais estáveis que as de gema de ovo sob condições de envelhecimento acelerado idênticas. A diferença deve-se, em parte, ao facto da cola ter um elevado conteúdo de “aminoácidos estáveis”, e níveis baixos de aminoácidos facilmente foto-oxidados (como a histidina, tirosina e aminoácidos com enxofre como a metionina e cisteína). Pelo contrário, a gema de ovo promove a foto-oxidação e a decomposição induzida por radicais.<sup>[5]</sup> Para além disto, a têmpera de gema de ovo tem um elevado conteúdo em óleos, o que não se verifica nas têmperas de gelatina e caseína. A alteração da cor nas proteínas pode, portanto, dever-se à alteração dos óleos e não das proteínas. Isto é reforçado pelo facto de não haver alterações significativas com o envelhecimento na composição em aminoácidos nos filmes à base de têmpera de gema de ovo.

– Nas têmperas de gelatina e caseína não se verificam alterações significativas na quantidade relativa de aminoácidos ao longo do tempo. Nas têmperas à base de ovo verificam-se ligeiras alterações, mas que não se consideram muito significativas. Isto vem sublinhar o facto dos aglutinantes proteicos serem excelentes meios aglutinantes e terem sido utilizados ao longo de muito tempo. De facto, as têmperas à base de cola voltaram a estar de novo em voga devido à sua estabilidade.

– Alguns pigmentos, como o branco de chumbo, podem dificultar a identificação das têmperas, especialmente têmperas envelhecidas, pois o pigmento acelera a degradação de alguns aminoácidos como a Asp e o Glu; no entanto outros, como o realgar, não têm qualquer influência.

O efeito do EDTA como supressor da influência dos pigmentos, por coordenação aos iões metálicos, na identificação das amostras não foi confirmado. Os resultados obtidos indicam que a degradação dos aminoácidos catalisada por pigmentos como o cobre ocorre durante a hidrólise e que o EDTA não consegue impedir esta reacção.



## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

No seguimento deste estudo será importante a análise quantitativa das amostras, para um estudo mais minucioso da variação da quantidade de aminoácidos ao longo dos vários envelhecimentos.

A implementação de um método para HPLC capaz de impedir a interferência dos iões metálicos cobre, ferro ou chumbo, usando EDTA ou outros agentes quelantes, é, também fundamental, pois estes iões metálicos encontram-se muitas vezes em obras de arte, impedindo assim a identificação das proteínas. As tentativas encontradas<sup>[3, 5, 23, 24]</sup> e testadas neste trabalho para resolver este problema não se mostraram eficazes, sendo necessário mais estudos. Uma alternativa seria ainda usar um método de derivatização diferente, por ex. o-ftaldeído/mercaptoelanol e HPLC acoplado a um detector de fluorescência ou GC-MS. Para além disso poder-se-ia experimentar métodos de micro-extracção em fase sólida para retirar os metais.

Para o futuro, poder-se-ia, para além disso, implementar um método capaz de distinguir entre os vários tipos de cola animal. Já foram feitos alguns estudos<sup>[25]</sup> neste sentido, mas que requerem uma componente para análise de dados muito sofisticada e que não está facilmente disponível.<sup>[25]</sup> Uma simplificação destes métodos seria o ideal.

Poder-se-ia, por outro lado, implementar um método com recurso à espectrometria de massa como forma de identificação de têmperas proteicas.<sup>[25]</sup> Aparentemente este seria um método mais rápido e económico visto não ser necessário derivatizar as amostras, e só ser necessário o passo de hidrólise.

Um outro método que também poderia ser testado para este tipo de amostras é a electroforese capilar, que não requer a hidrólise das amostras. Por esta razão a interferência dos iões metálicos no passo de hidrólise seria automaticamente ultrapassada, problema que provavelmente nenhuma das alternativas mencionadas anteriormente permitirão resolver. A electroforese capilar, que possibilita o uso de muito pequenas quantidades de amostra, poderá portanto ser um método de utilização muito promissora.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] **Grzywacz, C. M.** (1994): *Identification of proteinaceous binding media in paintings by amino acid analysis using 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 676:177-183.
- [2] **Chiavari, G. et al.** (1998): *Characterisation of standard tempera painting layers containing proteinaceous binders by pyrolysis (methylation) - gas chromatography - mass spectrometry*. Chromatographia 47 (7-8): 420-426.
- [3] **Halpine, S. M.** (1992): *Amino acid analysis of proteinaceous media from Cosimo Tura's 'The annunciation with Saint Francis and Saint Louis of Toulouse'*. Studies in Conservation, 37 (1):22-38.
- [4] **Schilling, M. R.; Khanjian, H. P.; Souza, L. C.** (1996): *Gas chromatographic analysis of amino acids as ethyl chloroformate derivatives. Part I*. JAIC, 35 (1): 45-59.
- [5] **Schilling, M. R.; Khanjian, H. P.** (1996): *Gas chromatographic analysis of amino acids as ethyl chloroformate derivatives; Part II*. JAIC, 35 (2): 123-144.
- [6] **Halpine, S. M.** (1995): *An Investigation of Artist's Material's Using Amino Acid Analysis: Introduction of the One-Hour Extraction Procedure*", Conservation Research Studies in the History of Art, series II, volume 51, National Gallery of Art, Washington, DC: 28-69.
- [7] **Keck, S.; Peters, T.** (1969): *Identification of protein-containing paint media by quantitative amino acid analysis*. Studies in Conservation, 14 (2):75-82.
- [8] **Gettens, R.; Stout, G. L.** (1966): *Painting materials: A short encyclopedia*. Dover Publications, Inc., New York.
- [9] **Karpowicz, A.** (1981): *Ageing and deterioration of proteinaceous media*. Studies in Conservation, 26:153-160.
- [10] **Desalme, J.; Pierron, L.** (1910): *Couleurs, Peintures et Vernis*. Encyclopédie Industrielle. J. B. Baillière Fils.
- [11] **Bidlingmeyer, B. A.; Cohen, S. A.; Tarvin, T. L.** (1984): *Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization*. Journal of Chromatography, 336: 93-104.
- [12] **Newman, R.** (1998): *Tempera and other nondrying-oil media*. Painted wood: history and Conservation. The Getty Conservation Institute, Los Angeles: 33-63.

- [13] **Cennini, C. A.** (1960): *The Craftsmans Handbook. The Italian "Il libro dell'arte"*. Translated by Thompson, D. V. Dover publications, Inc., New York.
- [14] **Feller, R. L.** (1985): *Artists' Pigments: A Handbook of their History and Characteristics* (Volume 1, 2 and 3) National Gallery of art, Washington. Oxford Press.
- [15] **Feller, R. L.** (1990) *Accelerated aging; Photochemical and thermal aspects*. Research in conservation. Marina del Rey, Calif: Getty Conservation Institute.
- [15] **John, V. M., Sato, N. M.** *Durabilidade de componentes da construção*. Colectânea Habitare: Contrução e meio ambiente.
- [16] **Schilling, M. R.** (2003): *Paint Media Analysis Scientific Examination of Art: Modern techniques in conservation and analysis*. The National Academy Press. Wahington, D. C..
- [17] **Ohno, Y.** (2000): *CIE Fundamentals for Color Measurements*. Paper for IST NIP16 Conference, Vancouver, Canada. Oct. 16-20.
- [18] **Schaeffer, T. T.** (2001): *Effects of light on materials in collections: data on photoflash and related sources*. Research in Conservation. The Getty Conservation Institute.
- [19] (2002): *Stage 5 - Proposal, Global Document, Amino Acid Analysis*. Revised 7/18/02 following JP request. In: [www.nihs.go.jp/dbcb/Bio-Topic/amino.pdf](http://www.nihs.go.jp/dbcb/Bio-Topic/amino.pdf) a 25 de Novembro de 2007.
- [20] **Anders, J. C.** (2002): *Process Development: Advances in Amino Acid Analysis*. BioPharm, April: 32-39, 67.
- [21] (2004): *Amino Acid Analysis. The Protein Facility of the Iowa State University Office of Biotechnology*. 29/06/2004. In: <http://www.biotech.iastate.edu/facilities/pritein/aaa.html> a 25 de Novembro de 2007.
- [22] **Ronca, F.** (1994): *Protein determination in polychromed stone sculptures, stuccoes and gesso ground*. Studies in Conservation, 39 (2): 107-120.
- [23] **Chen, X, et. al.** (2005) *A study on the proteinous binding media in Tibetan murals wih reversed-phase high performance liquid chromatograpy*. Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy, vol 50 (6): 325-329.

- [24] **Cruz-Cañizaresa, J.; Doménech-Carbó, M. T.; Gimeno-Adelantado, J. V.; Mateo-Castro, R.; Bosch-Reig, F.** (2004): *Suppression of pigment interference in the gas chromatographic analysis of proteinaceous binding media in paintings with EDTA*. Journal of Chromatography A, 1025: 277-285.
- [25] **Peris-Vicente, J.; Simó-Alfonso, E.; Gimeno Adelantado, J. V.; Doménech Carbó, M. T.** (2005): *Direct infusion mass spectrometry as a fingerprint of protein-binding media used in works of art*. Rapid Commun. Mass Spectrom, 19: 3463-3467.
- [26] **Rie, E. R.; McGlinchey, C. W.**; *The effect of a hindred amine light stabilizer on the aging of dammar and mastic varnish in na environment free of ultraviolet light*. IIC Preprints of Contributions to the Brussels Confress, 3-7 September 1990 - Cleaning Retouching and Coating. London: IIC.
- [27] **Ackroyd, P.; Young, C.** (1999): *The preparation of artists' canvas: Factors that affect adhesion between ground and canvas*. ICOM Committee for Conservation, 1999. Vol I. Paintings I: Conservation and Restoration of paintings: 265-270.
- [28] **Weiss, M.; Mannerberg, M.** (1998): *Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins*. H. Chromatogr. A, 795: 263-275.

Outra bibliografia consultada para a realização deste trabalho:

- Colombini, M.P.; Modugno, F.** (2004): *Characterisation of proteinaceous binders in artistic paintings by chromatographic techniques*, Journal of Separation Science, 27: 147-160.
- Doerner, M.** (1949): *The materials of the artist and their use in painting with notes on the techniques of the old masters*. Harrap, London.
- Erhardt, D.; Mecklenburg, M. F.** (1995): *Accelerated vs. Natural Aging: effects of aging conditions on the aging process of cellulose*. Materials Research Society, 352 (1995): 247-70.
- Gómez, M. L.** (1998): *La Restauración: Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*. Cuadernos Arte Cátedra. Instituto del Patrimonio Histórico Español.
- Harrison, S. M.; Kaml, I.; Prokoratova, V.; Mazanek, M.; Kenndler, E.** (2005): *Animal glues in mixtures of natural binding media used in artistic and historic objects: identification by capillary zone electrophoresis*. Anal Bioanal Chem 382: 1520-1526.
- Kuckova, S.; Nemeč, I.; Hýnek, R.; Hradilova, J.; Grygar, T.** (2005): *Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art works*. Anal Bioanal Chem 382: 275-282.

**Masschelein-Kleiner, L.** (1974): *An improved method for the thin-layer chromatography of media in tempera paintings*. *Studies in Conservation*, 19: 207-211.

**Raymond, J.; Meilunas, J.; Bentsen, G.; Steinberg, A.** (1990): *Analysis of aged paint binders by FTIR spectroscopy*. *Studies in Conservation*, 35(1):33-51.

**Stulik, D.; Florsheim, H.** (1992): *Binding media identification in painted ethnographic objects*. *JAIC*, 31 (3): 275-288.

(2004): *Protein Sequence Analysis and Sample Preparation*. *Protein Sciences Facility*. In: [http://www.biotech.uiuc.edu/centers/Proteomics/Proteinscience/protein\\_sequence.htm](http://www.biotech.uiuc.edu/centers/Proteomics/Proteinscience/protein_sequence.htm) a 25 de Novembro de 2007.

## ANEXOS

### 1. Composição, em aminoácidos, de aglutinantes proteicos

#### Composição de tâmporas proteicas em artigos publicados

Tabela 15 – Composição em aminoácidos de padrões de referência: publicados e do LCR.

Padrões	Publicados						LCR		
	Cola de pele		Gema de ovo		Caseína		Têmpora de Ovo*	Têmpora de Gelatina**	Têmpora Caseína***
N.º de coluna	G1	G2	O1	O2	C1	C2			
AMINOÁCIDO									
Aspartato	5	5	12	9	8	5	7	4	4
Glutamato	7	7	11	13	19	20	10	7	15
Hidroxiprolina	10	11	0	0	0	0	0	10	0
Serina	4	4	11	9	7	5	11	3	6
Glicina	32	34	6	3	4	2	7	33	4
Histidina	1	1	1	3	2	3	2	0	2
Arginina	5	5	5	7	3	3	6	5	4
Treonina	2	2	6	6	5	3	6	1	4
Alanina	11	11	8	5	4	3	8	9	4
Prolina	12	11?	5	4	12	10	6	14	14
Tirosina	0	0	3	4	4	5	3	0	4
Valina	2	2	7	6	7	6	7	2	7
Metionina	1	1	2	3	2	8	0	0	0
Cisteína	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Isoleucina	1	1	6	6	5	5	5	2	5
Leucina	2	2	9	9	8	8	10	3	10
Fenilalanina	2	1	4	5	4	5	4	1	4
Lisina	2	3	5	7	6	8	9	5	11

Os resultados apresentados estão em percentagem molar e derivam das publicações indicadas em "N.º de coluna": G1 – Análise do colagénio da Sigma, ficheiro 1030A32A da NGA; G2 – Composição do colagénio da pele de rato de Sorber, H.A., *Handbook of Biochemistry: Selected Data for Molecular Biology*, 2<sup>ª</sup> ed. (Cleveland, 1973), C-282; O1 – Gema de ovo envelhecida naturalmente durante dois anos, ficheiro 1030D35A da NGA; O2 – Composição da gema de ovo de *Composition of Foods, Dairy and Egg Products*, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Handbook 8-1 (Washington, 1976), item 01-033; C1 – Caseína da Sigma, ficheiro 1030B323A da NGA; C2 – Composição do queijo parmesão, de *Composition of Foods, Dairy and Egg Products*, item 01-125.

\* Média de 4 de amostras independentes analisadas pelo método Pico-Tag®+HPLC no LCR; \*\* Média de 2 de amostras independentes analisadas pelo método Pico-Tag®+HPLC no LCR; \*\*\* Média de 3 de amostras independentes analisadas pelo método Pico-Tag®+HPLC no LCR;

## 2. Resultados de Colorimetria

### Gema de ovo

Tabela 16 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	77.36	7.65	40.90	41.61	79.40	
-	195*	75.11	6.79	41.25	41.81	80.65	
-	537*	77.15	5.79	38.02	38.46	81.34	
-	1005*	72.24	7.98	46.38	47.06	80.24	
-	1539*	73.31	6.66	49.73	50.17	82.37	
-	2139*	74.86	0.93	51.28	51.29	88.96	
-	4323*	75.72	2.25	51.77	51.82	87.51	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	74.86	0.93	51.28	51.29	88.96	
67	8	59.96	17.58	49.4	52.43	70.41	
161	19	63.26	13.33	51.87	53.55	75.59	
329	38	61.98	14.91	52.12	54.21	74.03	
665	77	57.19	20.14	45.74	49.98	66.23	
864	100	49.97	23.77	40.98	47.38	59.88	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	77,36	7,65	40,9	41,61	79,4	
68	7	90,41	-0,46	3,13	3,16	98,37	
160	17	85,67	-0,8	8,15	8,18	95,59	
348	37	85,79	-1,27	9,37	9,46	97,75	
514	55	82,41	-0,92	17,5	17,52	93	
705	75	80,9	-0,97	12,85	12,89	94,32	
824	88	81,94	-1,31	8,64	8,74	98,65	
940	100	80,72	-1,23	11,96	12,02	95,88	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática</b>							
0	0	63,59	13,01	48,34	50,06	74,94	
67	8	57,39	20,32	44,47	48,89	65,44	
161	19	45,61	24,37	28,73	37,67	49,69	
329	38	40,72	20,96	17,91	27,57	40,51	
665	77	33,03	11,84	6,85	13,68	30,06	
864	100	32,57	7,64	4,85	9,05	32,41	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

### Têmpera de gema de ovo

Tabela 17 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	-	-	-	-	-	-
-	195*	92.27	-1.02	7.92	7.99	97.36	
-	537*	91.35	-1.66	7.72	7.90	102.11	
-	1005*	91.02	-2.65	15.31	15.53	99.83	
-	1539*	94.59	4.68	17.71	18.31	284.82	
-	2139*	89.62	-0.98	3.04	3.19	107.8	
-	4323*	89.58	-2.29	14.39	14.58	99.04	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	89.62	-0.98	3.04	3.19	107.8	
67	8	88.41	-2.44	17.68	17.85	97.86	
161	19	87.48	-2.07	26.25	26.33	94.52	
329	38	83.23	0.96	38.64	38.65	88.57	
665	77	81.24	3.41	45.89	46.02	85.75	
864	100	83.32	2.39	44.18	44.24	86.9	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	-	-	-	-	-	-
68	7	94,02	0,86	-2,25	2,41	290,8	
160	17	89,92	0,38	-1	1,07	290,9	
348	37	91,63	-0,34	0,69	0,77	116,2	
514	55	88,02	-0,73	6,12	6,17	96,77	
705	75	92,69	0,64	-5,65	5,69	276,5	
824	88	91,67	1,08	-5,86	5,96	280,5	
940	100	91,25	0,53	-4,7	4,73	276,43	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática</b>							
0	0	91,82	1,26	0,04	1,26	1,84	
67	8	87,89	0,76	12,07	12,10	86,41	
161	19	80,47	5,08	37,29	37,64	82,24	
329	38	75,61	7,27	18,44	19,82	68,48	
665	77	72,37	10,48	20,33	22,87	62,73	
864	100	66,91	13,11	31,41	34,03	67,35	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Preparação de gelatina + gesso e gelatina + cré**

Tabela 18 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para os filmes “Preparação de gelatina + Gesso” e “Preparação de gelatina + cré” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Preparação de gelatina + Gesso</b>							
-	0*	99.78	0.23	-1.02	1.05	282.58	
-	195*	95.99	0.33	-2.44	2.46	277.73	
-	537*	97.15	0.22	-1.98	1.99	276.32	
-	1005*	97.69	0.03	-0.44	0.44	273.39	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Preparação de gelatina + cré</b>							
-	0*	96.06	0.67	-3.21	3.28	281.78	
-	195*	93.59	0.41	-2.95	2.97	277.93	
-	537*	95.55	0.90	-4.77	4.85	280.67	
-	1005*	95.81	0.37	-2.63	2.65	278.04	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Preparação de cola + gesso**

Tabela 19 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Preparação de cola + gesso” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	102.68	1.19	1.59	1.98	53.23	
-	195*	98.76	1.07	1.35	1.73	51.51	
-	537*	100.55	0.95	2.17	2.37	66.34	
-	1005*	96.37	0.97	0.44	1.06	24.70	
-	1539*	98.98	0.99	1.62	1.90	58.50	
-	2139*	98.74	0.96	1.81	2.05	62.01	
-	4323*	97.93	1.52	-0.62	1.65	337.83	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	98.74	0.96	1.81	2.05	62.01	
67	8	99.09	0.90	2.70	2.85	71.63	
161	19	98.38	0.71	1.93	2.06	69.90	
329	38	99.02	0.60	3.10	3.16	79.08	
665	77	98.58	0.57	3.83	3.87	81.55	
864	100	98.86	0.41	3.40	3.42	83.18	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	102,68	1,19	1,59	1,98	53,23	
68	7	97,83	0,33	-0,58	0,67	299,15	
160	17	104,37	0,23	-0,7	0,73	288,09	
348	37	98,94	0	0,21	0,21	88,96	
514	55	102,48	0,11	1,11	1,12	84,18	
705	75	102,16	0,23	-0,25	0,34	312,11	
824	88	103,52	0,24	-0,45	0,51	297,9	
940	100	100,85	0,25	-1,13	1,16	282,51	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.



### Preparação de cola + cré

Tabela 20 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Preparação de cola + gesso” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	104.28	-0.40	2.65	2.68	98.60	
-	195*	98.07	-0.47	2.63	2.67	100.06	
-	537*	102.98	-0.40	1.23	1.29	108.15	
-	1005*	102.79	-0.50	1.97	2.03	104.11	
-	1539*	99.01	-0.07	1.63	1.63	92.62	
-	2139*	97.65	-0.33	3.67	3.69	95.20	
-	4323*	99.95	-0.29	2.66	2.68	96.22	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	97.65	-0.33	3.67	3.69	95.20	
67	8	100.82	-0.45	2.39	2.43	100.76	
161	19	98.52	-0.56	4.61	4.64	96.95	
329	38	98.39	-0.66	4.84	4.89	97.73	
665	77	98.19	-0.56	4.07	4.11	97.84	
864	100	97.99	-0.54	4.35	4.39	97.07	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

### Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo

Tabela 21 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	91.59	0.00	14.96	14.96	90.00	
-	195	90.03	-0.34	12.82	12.83	91.51	
-	537	93.40	0.08	6.25	6.25	89.31	
-	1005	93.47	0.58	0.89	1.06	57.19	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	91,59	0,00	14,96	14,96	90	
68	7	96,65	-0,36	1,02	1,08	109,59	
160	17	98,95	-0,41	3,36	3,39	96,99	
348	37	94,16	0,17	-1,36	1,37	277,28	
514	55	95,88	-0,39	2,99	3,01	97,42	
705	75	95,61	0,49	-3,87	3,9	277,28	
824	88	96,69	0,30	-3,07	3,09	275,57	
940	100	94,43	0,13	-2,31	2,31	273,24	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de branco de chumbo + têmpera gelatina**

Tabela 22 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	96.84	0.87	-2.22	2.38	291.47	
-	195	94.16	1.54	-8.17	8.31	280.65	
-	537	93.72	0.41	-0.55	0.69	306.95	
-	1005	95.28	0.51	-1.46	1.55	289.29	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de bindheimite + têmpera de gema de ovo**

Tabela 23 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de bindheimite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	64.06	10.87	28.88	30.85	69.37	
-	195	58.59	12.25	33.31	35.49	69.81	
-	537	63.30	11.04	32.88	34.69	71.44	
-	1005	67.26	11.00	32.88	34.67	71.50	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	64.06	10.87	28.88	30.85	69.37	
68	7	65.82	11.07	30.32	32.28	69.93	
160	17	62.91	10.54	30.41	32.18	70.88	
348	37	60.80	9.91	25.15	27.03	68.50	
514	55	63.80	11.57	34.71	36.59	71.57	
705	75	70.02	8.62	38.09	39.05	77.25	
824	88	65.15	10.69	36.95	38.46	73.86	
940	100	71.30	7.49	35.75	36.53	78.16	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de bindheimite + têmpera de gelatina**

Tabela 24 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de bindheimite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	62.49	11.77	37.11	38.93	72.40	
-	195	59.41	11.91	36.62	38.51	71.99	
-	537	70.48	9.75	36.29	37.57	74.96	
-	1005	65.56	9.19	25.15	26.78	69.93	
-	1539	69.89	8.45	27.93	29.18	73.17	
-	2139	-	-	-	-	-	
-	4323	58.58	11.82	35.71	37.62	71.69	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de hematite + têmpera de gema de ovo**

Tabela 25 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de hematite+ têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	35.94	15.21	8.62	17.49	29.55	
-	195*	33.82	16.21	8.58	18.34	27.89	
-	537*	35.85	20.22	12.05	23.54	30.80	
-	1005*	38.10	17.72	9.24	19.28	27.55	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	35,94	15,21	8,62	17,49	29,55	
68	7	37,92	16,46	9,53	19,02	30,06	
160	17	36,18	18,33	10,85	21,3	30,62	
348	37	33,11	12,7	6,04	14,06	25,42	
514	55	31,79	17,16	10,07	19,9	30,4	
705	75	36,03	17,41	10,23	20,2	30,44	
824	88	39,73	15,27	6,8	16,71	24,02	
940	100	37,33	11,53	4,8	12,49	22,62	

Envelhecimento na câmara climática							
0	0	35,94	15,21	8,62	17,49	29,55	
67	8	36.51	18.62	11.63	21.95	32.00	
161	19	46.61	13.73	1.78	13.84	7.37	
329	38	44.09	15.73	6.29	16.94	21.79	
665	77	37.64	17.61	10.74	20.63	31.37	
864	100	36.46	16.92	11.46	20.44	34.09	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de hematite + têmpera de gelatina**






Tabela 26 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	37.62	11.00	2.89	11.38	14.71	
-	195	33.04	14.40	6.50	15.80	24.31	
-	537	33.03	13.03	5.83	14.27	24.10	
-	1005	34.72	9.62	2.38	9.91	13.92	
-	1539	35.31	11.34	5.42	12.57	25.55	
-	2139	-	-	-	-	-	
-	4323	46.79	5.22	-2.46	5.77	334.76	









TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural

**Tinta de ouropigmento + têmpera de gema de ovo**

Tabela 27 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de ouropigmento + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	76.04	17.24	62.34	64.68	74.55	
-	195	73.21	17.26	63.37	65.68	74.77	
-	537	76.29	16.73	65.69	67.79	75.71	
-	1005	75.27	15.01	60.70	62.53	76.11	
	1539	-	-	-	-	-	-
	2139	-	-	-	-	-	-
	4323	76.19	13.95	55.60	57.32	75.92	







  

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	76.04	17.24	62.34	64.68	74.55	
68	7	79.54	14.22	64.80	66.34	77.63	
160	17	78.40	13.82	66.62	68.03	78.28	
348	37	78.87	13.03	61.60	62.96	78.05	
514	55	77.61	9.22	44.22	45.17	78.22	
705	75	80.34	7.18	46.73	47.28	81.27	
824	88	80.99	5.55	41.04	41.41	82.30	
940	100	78.52	7.52	43.70	44.35	80.23	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de ouropigmento + têmpera de gelatina**

Tabela 28 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de ouropigmento + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	79.99	15.29	70.97	72.60	77.84	
-	195	74.37	17.48	61.68	64.11	74.17	
-	537	79.97	14.03	63.02	64.56	77.45	
-	1005	76.82	14.09	62.39	63.96	77.27	
-	1539	76.41	15.11	66.44	68.14	77.19	
-	2139	na	Na	na	na	na	-
-	4323	76.36	15.02	65.27	66.97	77.04	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural

**Tinta de goetite + têmpera de gema de ovo**

Tabela 29 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de goetite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	41.76	4.33	13.63	14.30	72.37	
-	195	39.03	5.43	12.42	13.55	66.39	
-	537	40.74	5.09	9.97	11.19	62.94	
-	1005	34.62	5.64	9.97	11.45	60.47	
	1539	-	-	-	-	-	-
	2139	-	-	-	-	-	-
	4323	30.10	4.88	7.93	9.31	58.37	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	41.76	4.33	13.63	14.30	72.37	
68	7	39.31	3.32	11.74	12.21	74.20	
160	17	36.55	3.34	10.92	11.42	73.01	
348	37	38.16	4.00	12.19	12.83	71.84	
514	55	36.97	3.63	10.68	11.28	71.24	
705	75	38.78	4.28	11.79	12.55	70.04	
824	88	39.33	3.95	12.34	12.96	72.25	
940	100	37.76	3.67	9.90	10.56	69.68	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática</b>							
0	0	39,46	3,72	11,68	12,26	72,35	
67	8	42,25	3,75	7,05	7,98	61,96	
161	19	40,47	4,67	9,47	10,56	63,74	
329	38	-	-	-	-	-	-
665	77	38,01	6,60	11,54	13,29	60,24	
864	100	-	-	-	-	-	-

\* TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de goetite + têmpera de gelatina**

Tabela 30 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de goetite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.





Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	H	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	29.66	5.58	9.22	10.77	58.82	
-	195	28.47	4.69	8.44	9.65	60.91	
-	537	41.04	5.14	5.43	7.48	46.59	
-	1005	30.29	5.47	8.24	9.89	56.44	
-	1539	56.35	4.82	-4.64	6.69	316.08	
-	2139	-	-	-	-	-	-
-	4323	28.47	6.02	9.44	11.20	57.96	















Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	29.66	5.58	9.22	10.77	58.82	
68	7	44.95	3.81	3.51	5.18	42.64	
160	17	28.54	5.46	9.30	10.78	59.56	
348	37	32.63	5.04	7.70	9.20	56.76	
514	55	33.98	5.79	9.41	11.05	58.39	
705	75	34.27	7.68	12.16	14.38	57.71	
824	88	31.59	5.11	7.77	9.30	56.68	
940	100	36.56	5.82	6.82	8.97	49.52	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo**

Tabela 31 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.






Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	63.77	42.71	50.86	66.41	49.98	
-	195	63.33	43.16	55.51	70.31	52.13	
-	537	68.45	43.94	53.78	69.45	50.75	
-	1005	65.37	41.00	53.90	67.72	52.74	









Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	63.77	42.71	50.86	66.41	49.98	
68	7	73.37	30.87	56.69	64.55	61.43	
160	17	68.78	35.06	61.27	70.59	60.22	
348	37	75.28	31.08	37.36	48.60	50.24	
514	55	69.21	29.26	42.70	51.76	55.58	
705	75	66.53	39.86	58.20	70.54	55.60	
824	88	63.74	41.44	56.15	69.78	53.57	
940	100	69.56	29.56	44.98	53.82	56.69	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática</b>							
0	0	59,85	28,10	42,77	51,18	56,69	
67	8	51,94	18,99	26,27	32,42	54,14	
161	19	49,79	21,25	26,73	34,15	51,52	
329	38	47,89	18,32	19,49	26,75	46,78	
665	77	50,89	14,85	18,25	23,53	50,85	
864	100	-	-	-	-	-	

\* TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de realgar + têmpera de gelatina**

Tabela 32 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de goetite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	H	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	70.71	45.41	67.39	81.26	56.03	
-	195	64.85	43.54	59.66	73.86	53.88	
-	537	63.90	46.85	62.08	77.77	52.96	
-	1005	72.40	33.46	33.44	47.31	44.99	
-	1539	66.14	41.36	42.32	74.80	56.43	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	70.71	45.41	67.39	81.26	56.03	
68	7	71.57	32.08	64.25	71.82	63.46	
160	17	71.24	31.68	61.66	69.32	62.81	
348	37	68.84	34.07	59.83	68.86	60.34	
514	55	66.95	37.27	66.41	76.16	60.70	
705	75	66.79	36.86	61.43	71.64	59.03	
824	88	69.04	34.11	55.81	65.41	58.57	
940	100	67.24	35.55	58.60	68.54	58.75	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de vermelhão + têmpera de gema de ovo**

Tabela 33 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de vermelhão+ têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	38.63	16.72	12.96	21.15	37.78	
-	195*	39.13	22.23	16.02	27.40	35.78	
-	537*	42.82	21.77	15.93	26.97	36.19	
-	1005*	44.84	15.66	9.55	18.34	31.38	
-	1539*	-	-	-	-	-	-
-	2139*	39.96	21.64	14.85	26.24	34.46	
-	4323*	38.39	12.35	13.34	18.18	47.19	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	38.63	16.72	12.96	21.15	37.78	
68	7	38.67	15.66	12.02	19.74	37.51	
160	17	34.94	15.14	12.24	19.47	38.96	
348	37	34.81	12.71	10.34	16.39	39.14	
514	55	35.30	11.09	8.60	14.03	37.79	
705	75	36.92	10.62	8.51	13.60	38.70	
824	88	36.58	10.05	7.23	12.38	35.72	
940	100	35.00	8.30	6.43	10.49	37.76	

Envelhecimento na câmara climática							
0	0	39.96	21.64	14.85	26.24	34.46	
67	8	37.87	15.78	14.79	21.63	43.15	
161	19	39.11	16.42	14.09	21.64	40.64	
329	38	38.53	14.95	14.24	20.65	43.61	
665	77	40.39	19.59	16.84	25.84	40.69	
864	100	36.77	14.75	15.84	21.64	47.04	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de vermelhão + têmpera de gelatina**

Tabela 34 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de vermelhão + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	38.20	22.23	15.72	27.22	35.26	
-	195	36.62	21.47	15.62	26.55	36.04	
-	537	37.98	22.38	15.40	27.17	34.54	
-	1005	48.88	16.27	5.96	17.32	20.12	
-	1539	39.03	18.61	13.87	23.21	36.70	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural

**Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo**

Tabela 35 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de azurite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	52.31	-8.74	-8.91	12.48	225.56	
-	195	37.12	-6.34	-9.63	11.53	236.61	
-	537	39.49	-4.18	-17.77	18.25	256.76	
-	1005	44.73	-3.18	-9.67	10.18	251.81	
-	1539	-	-	-	-	-	-
-	2139	-	-	-	-	-	-
-	4323	43.40	-4.33	-6.08	7.47	234.54	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	52,31	-8,74	-8,91	12,48	225,56	
68	7	38,63	-3,15	-16,81	17,1	259,38	
160	17	43,66	-8,49	-17,24	19,22	243,77	
348	37	39,3	-6,86	-16,79	18,14	247,78	
514	55	35,44	-3,35	-11,31	11,79	253,49	
705	75	39,24	-7,03	-18,66	19,94	249,37	
824	88	37,73	-5,04	-15,71	16,5	252,23	
940	100	38,73	-5,64	-15,62	16,61	250,16	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática</b>							
0	0	36,20	-4,49	-13,53	14,26	251,63	
67	8	40,45	-5,47	-9,13	10,65	239,10	
161	19	36,64	-4,58	-10,50	11,46	246,42	
329	38	32,00	-1,84	-0,94	2,07	207,19	
665	77	-	-	-	-	-	-
864	100	-	-	-	-	-	-

\* TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de azurite + têmpera de gelatina**

Tabela 36 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de azurite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	39.63	-6.88	-23.51	24.50	253.69	
-	195	39.75	-7.62	-21.31	22.63	250.33	
-	537	59.04	-2.11	-16.00	16.14	262.49	
-	1005	43.86	-6.12	-21.89	22.73	254.38	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural

**Tinta de azurite + têmpera de caseína**

Tabela 37 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de azurite + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	40.10	-7.97	-20.53	22.03	248.79	
-	195	44.13	-9.19	-22.38	24.20	247.68	
-	537	41.65	-7.92	-23.55	24.85	251.42	
-	1005	44.64	-8.79	-22.72	24.36	248.85	
-	1539	42.21	-3.96	-17.37	17.82	257.17	
-	2139	36.53	-6.03	-22.45	23.24	254.98	
-	4323	36.31	-3.40	-22.59	22.84	261.44	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	36.53	-6.03	-22.45	23.24	254.98	
68	7	37.35	-4.25	-17.50	18.01	256.34	
160	17	37.62	-4.77	-20.12	20.68	256.67	
348	37	38.00	-5.09	-20.99	21.60	256.37	
514	55	41.32	-5.46	-17.78	18.60	252.94	
705	75	43.19	-7.89	-23.24	24.54	251.25	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.



**Tinta de ultramarino + têmpera de gema de ovo**

Tabela 38 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de ultramarino + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	69.05	-1.72	6.76	6.98	104.26	
-	195	61.40	-1.86	5.56	5.86	108.52	
-	537	66.21	-2.29	10.88	11.12	101.88	
-	1005	68.43	-1.16	6.60	6.70	100.00	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	69.05	-1.72	6.76	6.98	104.26	
68	7	64.26	-2.02	4.22	4.68	115.59	
160	17	63.11	-1.39	1.65	2.15	130.05	
348	37	65.50	-1.65	-0.41	1.70	194.14	
514	55	60.18	-1.68	3.24	3.65	117.47	
705	75	63.59	-1.54	0.18	1.55	186.82	
824	88	72.55	-0.55	-2.12	2.19	255.38	
940	100	69.59	-1.27	-0.89	1.56	215.12	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de ultramarino + têmpera de gelatina**

Tabela 39 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de ultramarino + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	73.65	-0.59	-1.93	2.02	253.08	
-	195	65.97	-1.07	-0.19	1.09	190.11	
-	537	64.92	-1.09	-0.08	1.09	184.19	
-	1005	65.49	-0.40	-3.30	3.33	263.13	
	1539	66.68	-0.74	1.48	1.66	116.61	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural

**Tinta de ultramarino + têmpera de caseína**

Tabela 40 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de ultramarino + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	70.35	-0.70	-2.44	2.54	253.95	
-	195	69.19	-0.85	-1.73	1.93	243.78	
-	537	72.18	-0.61	-3.35	3.40	259.76	
-	1005	63.36	-1.28	-1.38	1.89	227.16	
-	1539	66.00	-0.84	1.50	1.71	240.84	
-	2139	66.21	-0.72	-1.65	1.80	246.36	
-	4323	71.97	0.36	-4.25	4.27	274.83	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	66.21	-0.72	-1.65	1.80	246.36	
68	7	63.22	-1.27	-0.20	1.29	188.99	
160	17	66.61	-1.02	0.26	1.05	165.9	
348	37	69.26	-0.82	-0.21	0.85	194.18	
514	55	65.05	-1.34	1.34	1.89	135.05	
705	75	76.61	0.26	-3.46	3.47	274.22	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de malaquite + têmpera de gema de ovo**

Tabela 41 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de malaquite + têmpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	70.14	-20.26	9.51	22.38	154.84	
-	195	65.61	-23.83	12.96	27.12	151.45	
-	537	69.29	-24.23	14.01	27.99	149.96	
-	1005	70.92	-17.96	8.23	19.75	155.39	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível</b>							
0	0	70,14	-20,26	9,51	22,38	154,84	
68	7	66,93	-26,29	10,56	28,33	159,11	
160	17	70	-26,31	11,67	28,78	156,07	
348	37	67,94	-18,9	12,26	22,53	147,03	
514	55	67,92	-25,26	15,8	29,79	147,98	
705	75	64,25	-26,25	15,14	30,3	150,03	
824	88	59,94	-22	11,94	25,03	151,51	
940	100	72,13	-14,68	10,07	17,8	145,54	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

**Tinta de malaquite + têmpera de gelatina**

Tabela 42 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de malaquite + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	77.52	-23.12	6.47	24.01	164.35	
-	195	78.28	-21.39	5.32	22.05	166.04	
-	537	71.90	-28.21	8.49	29.46	163.26	
-	1005	82.24	-16.27	2.86	16.52	170.03	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural

**Tinta de malaquite + têmpera de caseína**

Tabela 43 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de malaquite + têmpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	75.32	-26.68	7.74	27.78	163.81	
-	195	80.75	-22.81	5.45	23.45	166.56	
-	537	73.36	-23.98	6.07	24.74	165.78	
-	1005	73.65	-24.23	6.23	25.02	165.57	
-	1539	74.50	-24.72	7.14	25.73	163.88	
-	2139	75.32	-26.68	7.74	27.78	163.81	
-	4323	78.03	-24.88	6.48	25.71	165.41	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	75.32	-26.68	7.74	27.78	163.81	
68	7	81.54	-18.07	2.85	18.30	171.05	
160	17	86.60	-14.71	0.80	14.73	176.87	
348	37	75.71	-22.49	5.76	23.22	165.64	
514	55	74.29	-22.32	6.36	23.21	164.09	
705	75	75.51	-23.96	7.33	25.06	162.99	

TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

### Tinta de terra verde + t mpera de gema de ovo

Tabela 44 – Par metros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de terra verde + t mpera de gema de ovo” durante o envelhecimento natural e nas c maras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Par�metros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	54.76	0.55	13.27	13.28	87.64	
-	195*	54.92	0.61	10.86	10.88	86.81	
-	537*	45.73	0.40	13.57	13.58	88.31	
-	1005*	51.85	0.89	9.34	9.38	84.58	
-	1539*	48.64	0.95	16.13	16.16	86.62	
-	2139*	52.06	1.20	12.63	12.69	84.55	

Tempo		Par�metros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na c�mara UV-Visível</b>							
0	0	54.76	0.55	13.27	13.28	87.64	
68	7	60.65	0.08	8.01	8.01	89.45	
160	17	61.42	-0.72	12.44	12.46	93.29	
348	37	60.57	-0.54	7.86	7.88	93.93	
514	55	58.45	-0.86	10.07	10.11	94.88	
705	75	58.15	-0.83	11.11	11.14	94.26	
824	88	62.21	-1.04	10.96	11.01	95.40	
940	100	61.96	-1.07	9.74	9.80	96.24	

Envelhecimento na c�mara climática							
0	0	52.06	1.20	12.63	12.69	84.55	
67	8	49.06	1.50	15.32	15.39	84.42	
161	19	-	-	-	-	-	-
329	38	53.76	2.09	21.62	21.72	84.47	
665	77	53.23	2.31	15.94	16.10	81.75	
864	100	46.14	2.16	17.41	17.54	82.92	

Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática							
0	0	60,66	-0,48	13,46	13,47	92,03	
67	8	56,23	0,21	16,14	16,14	89,27	
161	19	-	-	-	-	-	-
329	38	51,66	1,67	17,24	17,32	84,48	
665	77	55,13	2,16	17,15	17,28	82,82	
864	100	52,42	1,95	17,25	17,36	82,56	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

### Tinta de terra verde + têmpera de gelatina

Tabela 45 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de terra verde + têmpera de gelatina” durante o envelhecimento natural.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	68.86	0.35	9.91	9.91	88.00	
-	195	62.95	0.08	9.50	9.50	89.54	
-	537	63.77	0.49	9.39	9.40	86.99	
-	1005	56.97	0.12	11.96	11.96	89.42	

TC – Tempo na c mara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspond ncia para envelhecimento natural

### Tinta de terra verde + t mpera de caseína

Tabela 46 – Par metros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme “Tinta de terra verde + t mpera de caseína” durante o envelhecimento natural e nas c maras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Par�metros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	62.09	0.02	10.26	10.26	89.90	
-	195	60.51	0.07	13.47	13.47	89.71	
-	537	69.34	0.06	10.19	10.19	89.67	
-	1005	57.64	-0.10	12.57	12.57	90.46	
-	1539	59.57	0.10	12.43	12.43	89.54	
-	2139	66.58	0.30	11.13	11.13	88.48	
-	4323	56.18	-0.03	10.09	10.09	90.18	

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	66.58	0.30	11.13	11.13	88.48	
68	7	58.24	0.09	12.26	12.26	89.57	
160	17	61.02	0.21	13.03	13.03	89.06	
348	37	57.91	0.33	12.85	12.86	88.51	
514	55	54.78	-0.05	12.78	12.78	90.21	
705	75	53.40	0.07	12.32	12.32	89.68	

TC – Tempo na c mara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspond ncia para envelhecimento natural.

### Tinta de crisocola + t mpera de gema de ovo

Tabela 47 – Par metros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme "Tinta de crisocola + t mpera de gema de ovo" durante o envelhecimento natural e nas c maras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Par�metros de cor					Cor
TC (h)	CEN (anos)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0*	60.64	-16.26	16.97	23.51	133.78	
-	195*	57.86	-17.07	20.53	26.71	129.74	
-	537*	50.14	-20.83	16.25	26.41	142.05	
-	1005*	67.68	-15.46	18.96	24.46	129.20	
-	1539*	52.69	-13.03	15.75	20.44	129.59	
-	2139*	63.15	-14.82	20.57	25.35	125.77	
-	4323*	69.75	-17.81	10.13	20.49	150.36	
<b>Envelhecimento na c�mara climática</b>							
0	0	63.15	-14.82	20.57	25.35	125.77	
67	8	44.21	-13.52	17.79	22.35	127.24	
161	19	54.99	-9.10	24.65	26.28	110.26	
329	38	51.25	-10.30	20.37	22.82	116.82	
665	77	57.88	-6.31	24.50	25.30	104.43	
864	100	63.41	-5.21	28.55	29.02	100.33	
<b>Envelhecimento na c�mara UV-Visível</b>							
0	0	60.64	-16.26	16.97	23.51	133.78	
68	7	59.49	-19.77	17.20	26.20	138.98	
160	17	56.93	-22.11	16.37	27.51	143.49	
348	37	57.53	-15.32	18.01	23.65	130.38	
514	55	54.00	-14.85	19.39	24.42	127.44	
705	75	63.27	-8.15	11.86	14.39	124.48	
824	88	63.56	-9.22	14.98	17.59	121.60	
940	100	55.56	-14.27	18.02	22.99	128.38	
<b>Envelhecimento na câmara UV-Visível e climática</b>							
0	0	58,39	-8,14	9,81	12,75	129,69	
67	8	57,34	-7,89	23,25	24,55	108,74	
161	19	65,20	-0,59	-1,33	1,45	245,96	
329	38	46,65	-3,28	12,36	12,79	104,87	
665	77	48,61	-1,74	16,74	16,83	95,92	
864	100	50,84	-0,44	8,04	8,05	93,16	

\* – dias; TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

### Tinta de crisocola + têmpera de gelatina

Tabela 48 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme "Tinta de crisocola + t mpera de gelatina" durante o envelhecimento natural.

Tempo		Par�metros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	71.85	-19.65	10.64	22.35	151.57	
-	195	77.61	-13.75	7.09	15.47	152.71	
-	537	69.13	-13.04	4.83	13.91	159.67	
-	1005	70.32	-10.47	1.82	10.63	170.12	

TC – Tempo na c mara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural

### Tinta de crisocola + têmpera de caseína

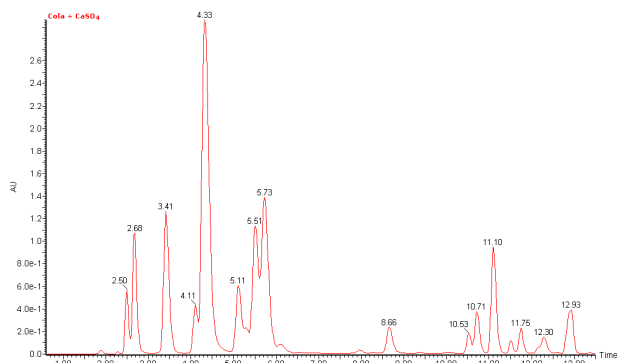
Tabela 49 – Parâmetros L\*, a\*, b\*, c\* e h obtidos no DataColor e cor correspondente obtida no *Photoshop* para o filme "Tinta de crisocola + têmpera de caseína" durante o envelhecimento natural e nas câmaras de envelhecimento acelerado.

Tempo		Parâmetros de cor					Cor
TC (h)	CEN (dias)	L*	a*	b*	c*	h	
<b>Envelhecimento natural</b>							
-	0	69.66	-13.12	2.39	13.34	169.69	
-	195	64.95	-13.63	3.51	14.08	165.56	
-	537	71.48	-11.41	1.20	11.48	173.99	
-	1005	72.11	-13.19	1.68	13.30	172.73	
-	1539	64.52	-14.66	4.20	15.25	164	
-	2139	65.99	-14.70	3.50	15.11	166.59	
-	4323	64.06	-13.81	2.78	14.09	168.61	
<b>Envelhecimento na câmara climática</b>							
0	0	65.99	-14.70	3.50	15.11	166.59	
68	7	72.86	-10.90	0.70	10.92	176.31	
160	17	61.65	-14.86	4.46	15.51	163.28	
348	37	67.20	-13.87	3.50	14.31	165.84	
514	55	57.24	-15.69	5.18	16.52	161.74	
705	75	65.09	-14.09	3.86	14.61	164.7	

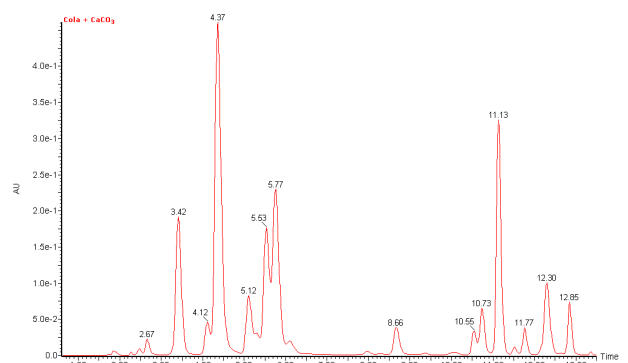
TC – Tempo na câmara de envelhecimento acelerado; CEN – Correspondência para envelhecimento natural.

### 3. Resultados de HPLC

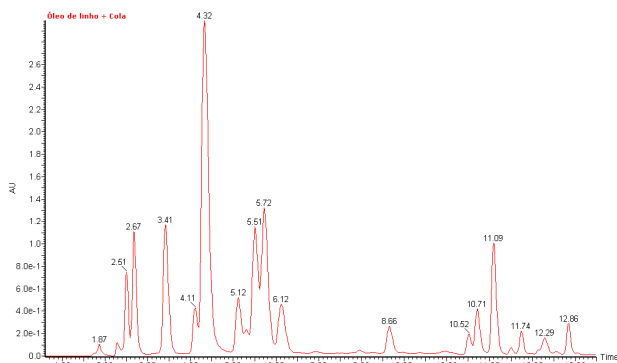
#### Filmes preparados em 1976



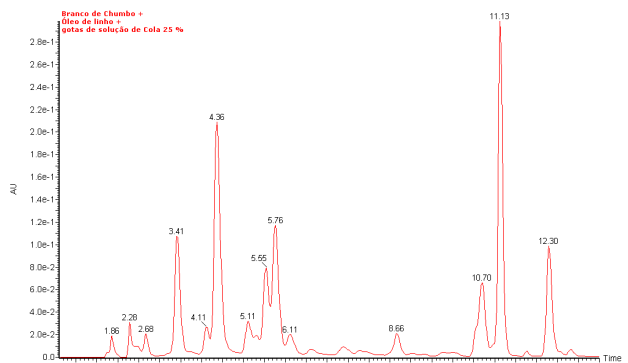
a) Cola + Gesso.



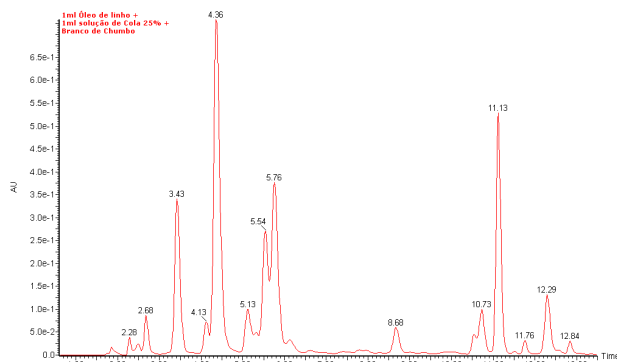
b) Cola + Cré.



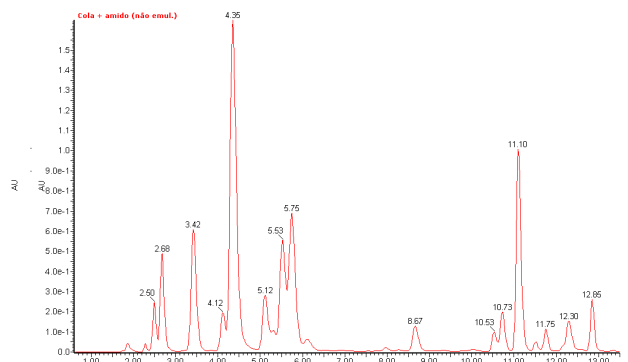
c) Óleo de linho + Cola.



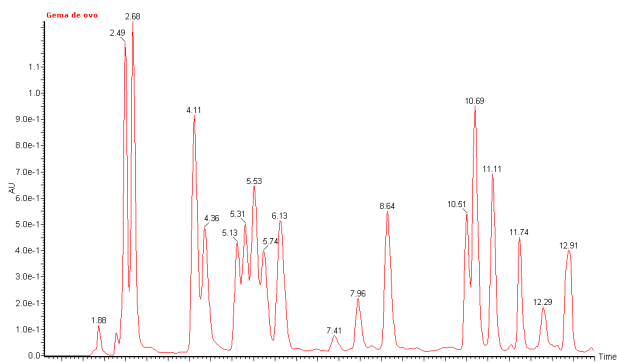
d) Branco de chumbo + óleo linho + gotas de sol. cola 25 %.



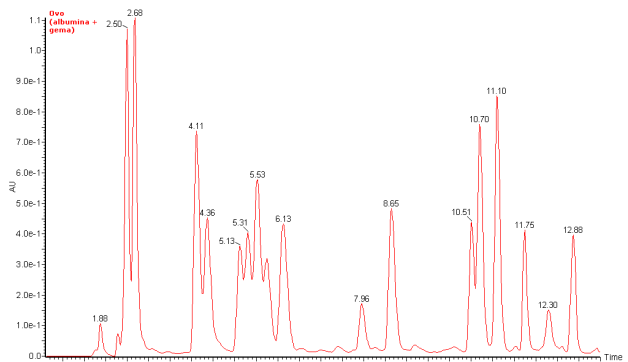
e) Branco de chumbo + óleo linho + gotas de sol. cola 25 %.



f) Cola + amido (não emul.).



g) Gema de ovo.



h) Ovo (clara + gema).

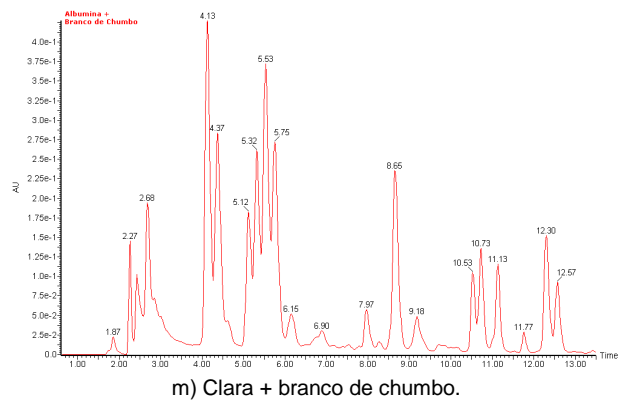
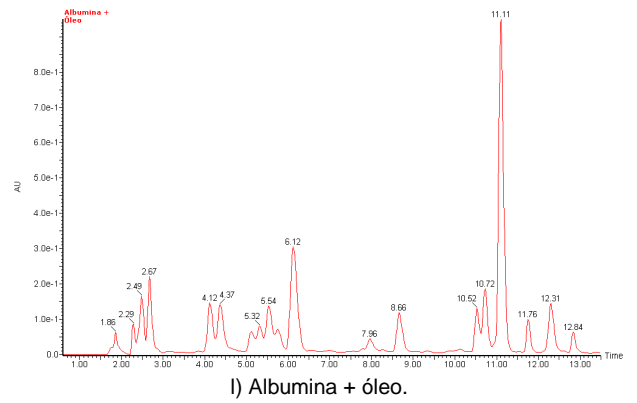
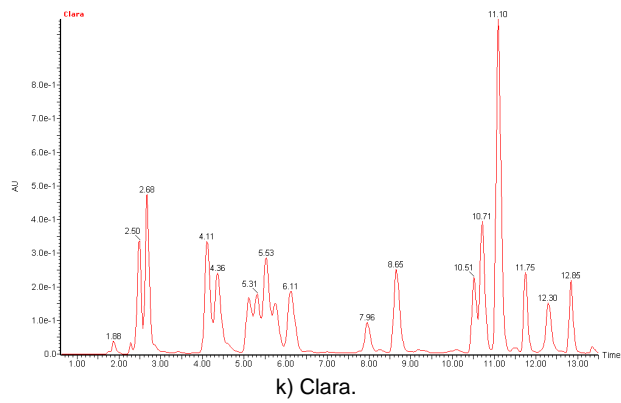
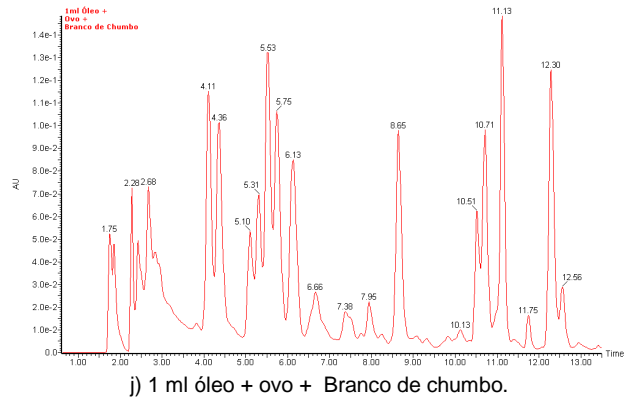
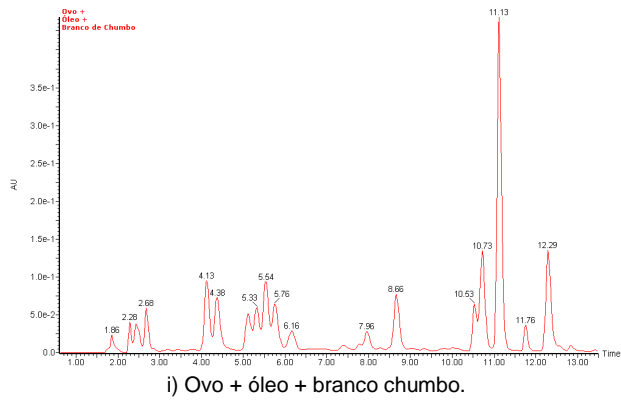


Figura 38 – Cromatogramas dos filmes de 1976.

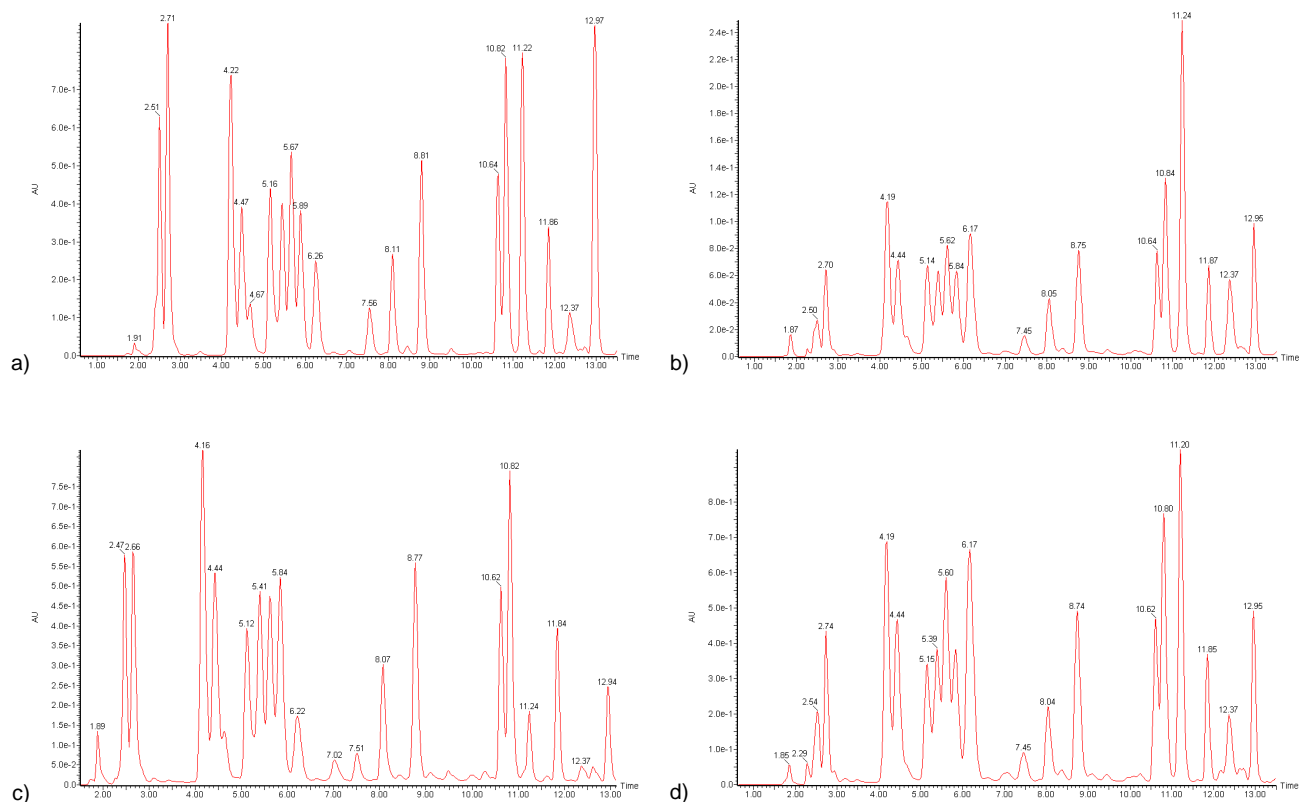
Tabela 50 – Composição em aminoácidos dos filmes “1976”.

Aminoácido	Filmes de 1976													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Asp	4.3	0.5	4.4	0.4	3.8	1.0	2.9	10.2	10.7	4.5	3.9	0.6	9.7	3.8
Glu	8.3	1.2	7.4	0.8	2.3	0.9	6.5	11.2	12.2	5.7	5.4	8.6	11.8	6.9
OH-Pro	10.5	12.3	9.7	29.5	14.0	13.7	10.3	0.0	0.1	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0
Ser	2.7	2.4	2.8	2.0	2.5	2.4	2.8	11.0	10.5	10.6	12.0	11.0	9.5	15.4
Gly+His	31.0	33.6	34.2	20.1	28.9	35.1	33.9	7.1	7.7	9.2	12.6	10.2	11.4	11.6
Arg+Tgr	6.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arg	-	5.6	4.3	2.6	3.9	4.3	5.0	4.9	4.8	6.0	4.7	5.6	3.9	6.1
Thr	-	1.3	1.5	2.0	1.6	1.3	1.3	6.1	5.5	6.8	6.5	6.1	4.7	9.3
Ala	9.8	11.6	10.9	4.4	10.3	12.1	10.7	9.0	9.7	11.6	14.5	10.8	9.4	15.4
Pro	15.5	18.4	14.4	33.8	16.7	19.2	14.9	5.5	5.2	8.3	12.1	5.8	3.9	11.4
Tyr	0.3	0.3	0.3	0.2	0.5	0.3	0.3	2.6	2.5	3.1	2.0	3.3	3.0	1.9
Val	2.4	2.5	2.3	1.6	3.0	2.5	2.3	7.3	7.4	9.1	10.2	9.0	8.2	9.6
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	1.1	1.7	1.3	0.5	0.0	1.4	1.4	5.2	5.0	5.8	4.8	6.2	6.7	3.2
Leu	2.6	3.5	3.2	0.9	11.3	3.9	3.0	10.6	9.9	15.0	9.8	11.6	9.7	4.5
Phe	1.4	1.8	1.4	0.2	0.4	0.9	1.5	3.8	4.2	2.9	1.1	5.7	4.7	0.8
Lys	3.7	3.3	1.9	1.0	0.8	1.0	3.3	5.5	4.7	0.9	0.4	5.2	3.1	0.0

A – “1976 - Cola + Gesso”; B – “1976 - Cola + Cré”; C – “1976 - Óleo de linho + cola”; D – “1976 - 1 ml óleo de linho + 3 ml sol cola + Branco de chumbo”; E – “1976 - Branco de chumbo + óleo linho + gotas de sol. cola 25 %”; F – “1976 - 1 ml óleo de linho + 1 ml sol. cola 25 % + branco de chumbo”; G – “1976 - Cola + amido (não emul.)”; H – “1976 - Gema de ovo”; I – “1976 - Gema de ovo + Branco de chumbo (não emul.)”; J – “1976 - Ovo (albumina + gema); J – “1976 - Ovo + óleo + Branco de chumbo”; K – “1976 - 1 ml óleo + ovo + Branco de chumbo”; L – “1976 - Branco ovo (albumina)”; M – “1976 - Albumina + óleo”; N – “1976 - Albumina + Branco de chumbo”

## Gema de ovo

### Envelhecimento na câmara de UV-Visível



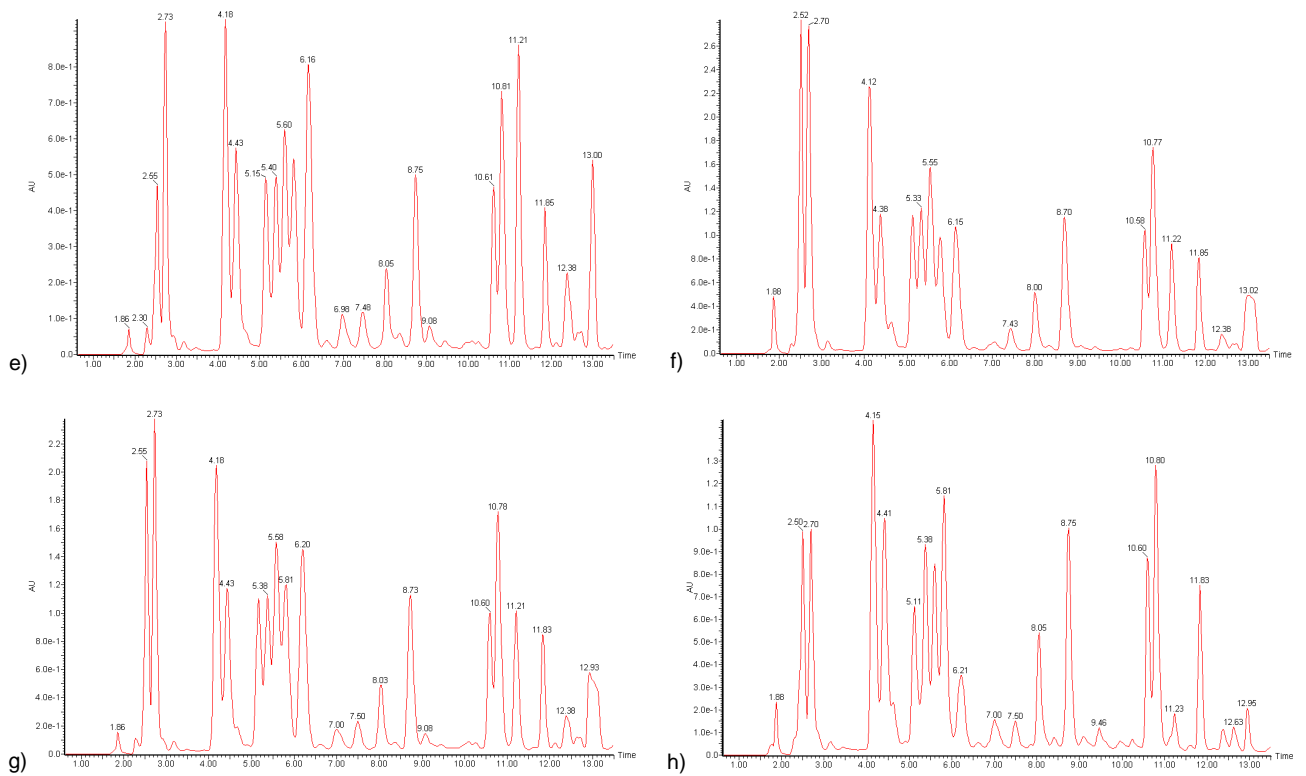


Figura 39 – Cromatogramas dos filmes “Gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível: a) 0h; b) 68h; c) 160h; d) 348h; e) 514h; f) 705h; g) 824h; h) 940h.

Tabela 51 – Composição em aminoácidos dos filmes “Gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.

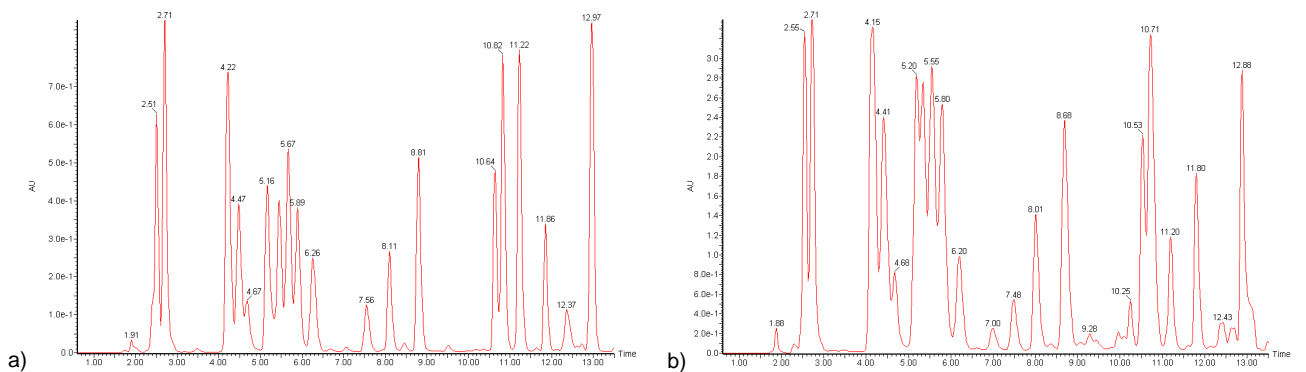
aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
Asp	6.5	3.0	6.5	3.5	5.3	10.2	8.2	7.4
Glu	10.1	5.8	7.6	5.5	9.4	12.0	10.6	7.4
OH-Pro	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2
Ser	10.5	11.8	12.4	11.3	11.9	11.7	11.1	11.9
Gly	5.7	8.0	8.4	9.2	9.0	7.0	7.3	9.5
His	2.1	1.1	2.0	0.0	0.0	1.3	0.8	1.6
Arg	6.7	6.7	6.1	5.7	6.5	5.7	6.1	5.4
Thr	5.6	6.7	7.6	6.5	6.6	6.3	5.8	7.8
Ala	7.8	8.7	7.2	10.9	8.9	9.4	9.4	6.6

aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
Pro	5.8	6.7	8.5	6.9	8.5	5.9	8.2	10.4
Tyr	3.4	4.4	3.9	3.8	3.1	2.5	2.7	3.7
Val	6.6	7.6	7.4	8.3	6.6	6.4	6.6	7.5
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	5.1	6.1	5.5	6.4	5.0	4.5	4.5	5.4
Leu	9.3	11.3	9.8	11.6	9.0	9.0	9.4	9.3
Phe	3.6	4.8	4.3	4.5	3.8	3.2	3.5	4.5
Lys	11.0	7.0	2.7	5.9	6.1	4.9	5.6	1.2

aa - aminoácido

**Envelhecimento na câmara climática**





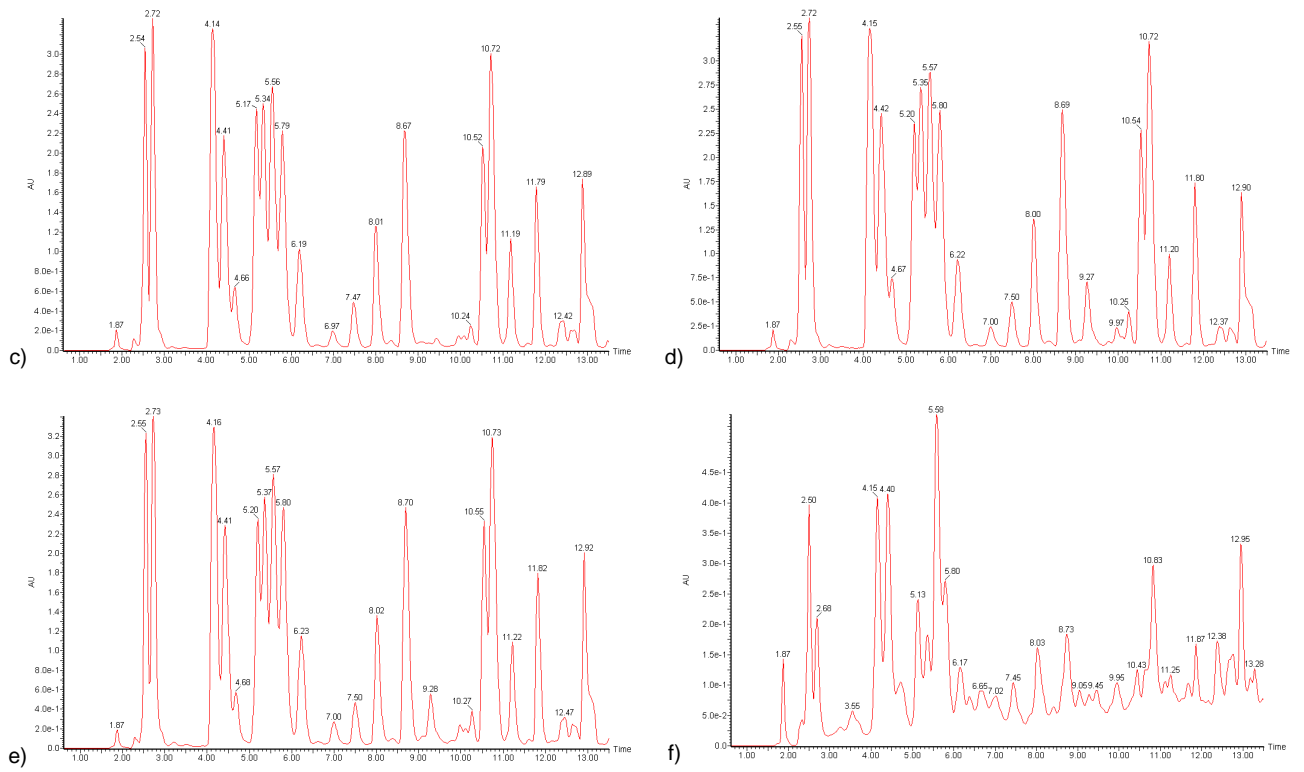
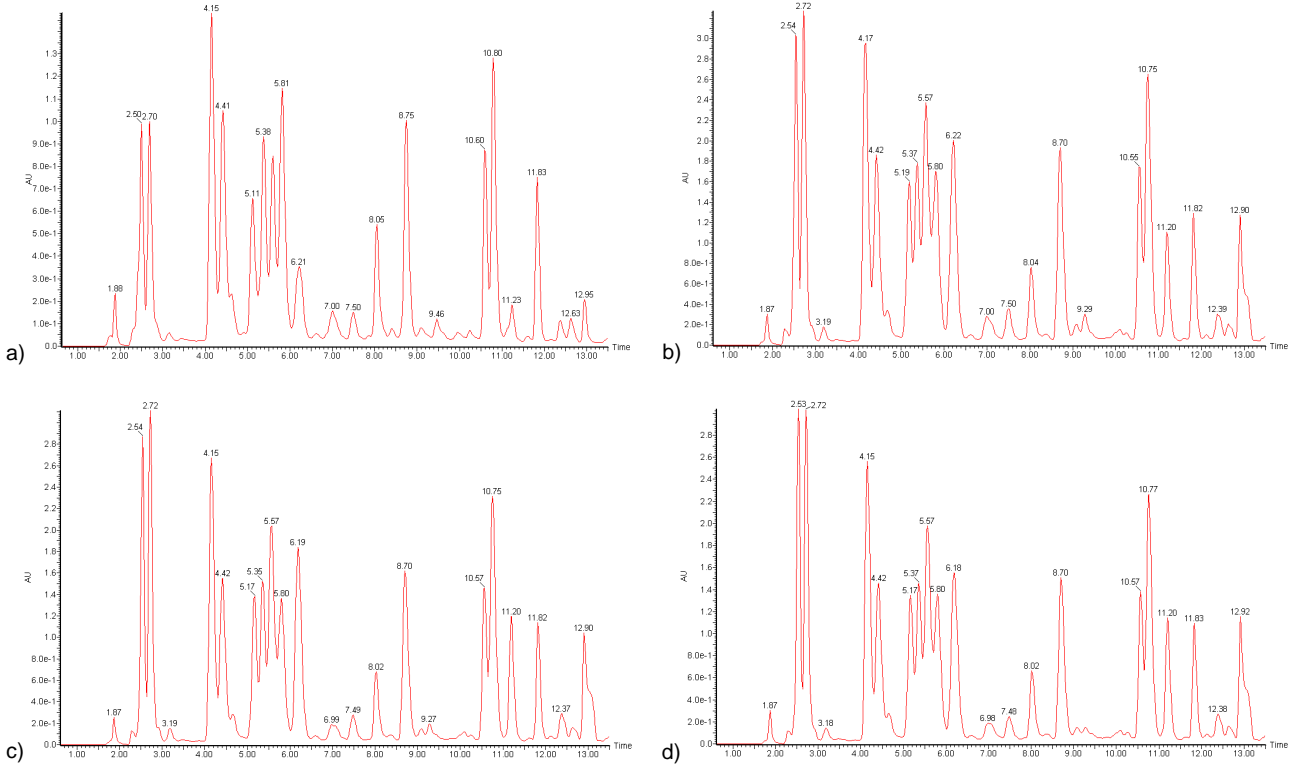


Figura 40 – Cromatograma dos filmes “Gema de ovo” envelhecidos na câmara climática: a) 0h; b) 67h; c) 161h; d) 329h; e) 665h; f) 864h.

**Envelhecimento nas câmaras UV-Visível e climática**



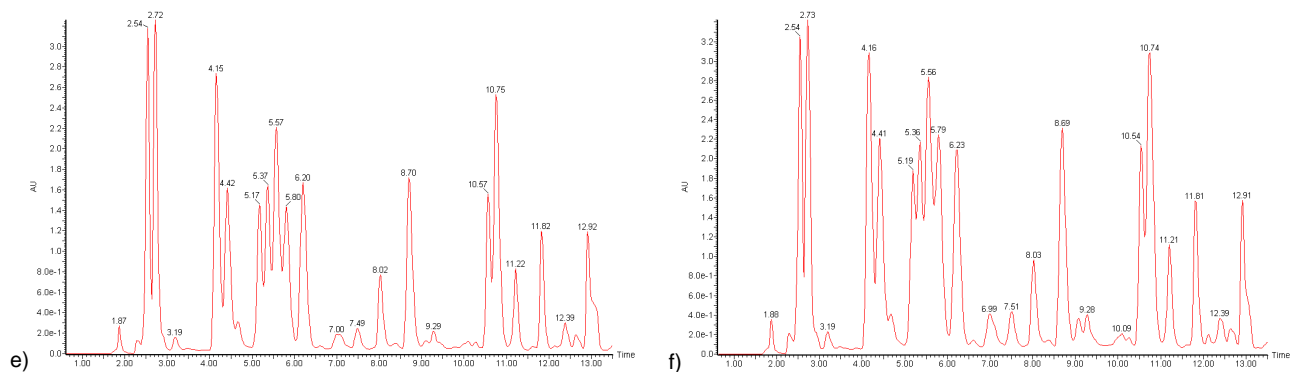


Figura 41 – Cromatograma dos filmes “Gema de ovo” envelhecidos nas câmaras UV-Visível e climática: a) 0h; b) 67h; c) 161h; d) 329h; e) 665h; f) 864h.

Tabela 52 – Composição em aminoácidos dos filmes “Gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.

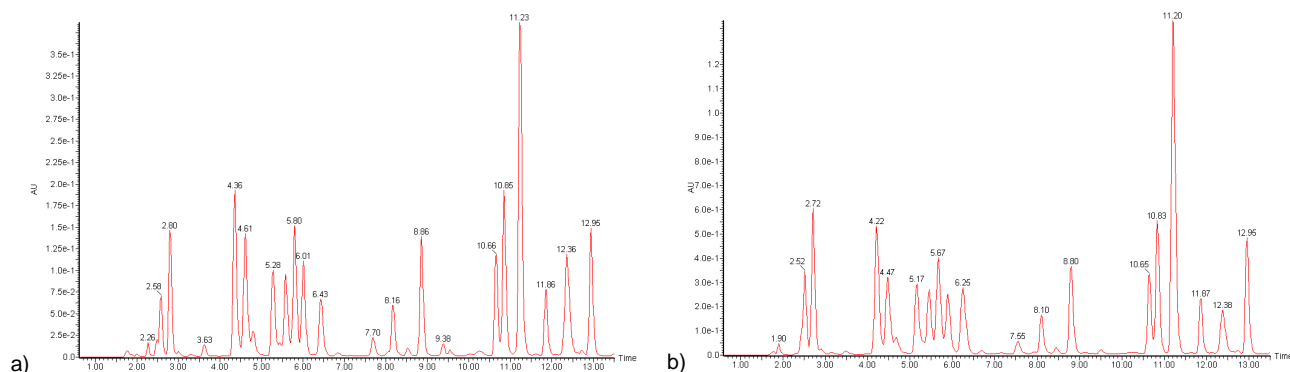
Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
Asp	6.5	7.9	8.1	8.8	8.2	7.9
Glu	10.1	10.0	10.7	11.0	10.8	4.7
OH-Pro	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	1.8
Ser	10.5	2.6	2.2	2.6	2.0	10.8
Gly	5.7	8.8	8.6	7.3	6.9	12.3
His	2.1	9.1	9.2	9.3	9.3	3.1
Arg	6.7	10.2	9.8	10.2	10.3	4.0
Thr	5.6	3.8	4.5	3.4	4.8	16.3
Ala	7.8	0.0	0.1	0.1	0.1	6.9
Pro	5.8	0.9	0.7	0.8	0.9	3.6
Tyr	3.4	4.7	4.6	4.8	4.7	4.8
Val	6.6	8.7	9.3	10.0	9.6	5.7
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2
Cis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	5.1	5.9	6.7	6.8	6.7	1.3
Leu	9.3	12.7	12.9	13.2	13.2	8.0
Phe	3.6	4.9	5.2	5.1	5.2	2.2
Lys	11.0	9.5	7.1	6.4	7.0	5.5

Tabela 53 – Composição em aminoácidos dos filmes “Gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado nas câmaras UV-Visível e climática.

Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
Asp	6.5	8.3	8.7	9.7	9.5	7.8
Glu	10.1	10.1	10.7	10.7	10.8	9.4
OH-Pro	0.1	0.0	0.1	0.1	0.2	0.2
Ser	10.5	10.9	11.0	11.0	10.6	9.7
Gly	5.7	7.5	7.1	7.0	6.9	7.4
His	2.1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1
Arg	6.7	5.0	5.1	5.3	5.1	4.6
Thr	5.6	5.9	6.1	5.6	5.8	6.3
Ala	7.8	10.0	9.8	9.5	9.8	10.4
Pro	5.8	7.4	6.5	6.1	6.5	8.1
Tyr	3.4	2.5	2.7	2.7	2.8	2.7
Val	6.6	7.5	7.3	7.1	7.0	7.9
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	5.1	5.3	5.0	4.7	4.8	5.3
Leu	9.3	10.1	10.1	10.4	10.3	11.1
Phe	3.6	3.5	3.6	3.5	3.6	3.7
Lys	11.0	4.8	5.1	5.6	5.3	4.4

### Têmpera de gema de ovo

#### Envelhecimento na câmara de UV-Visível



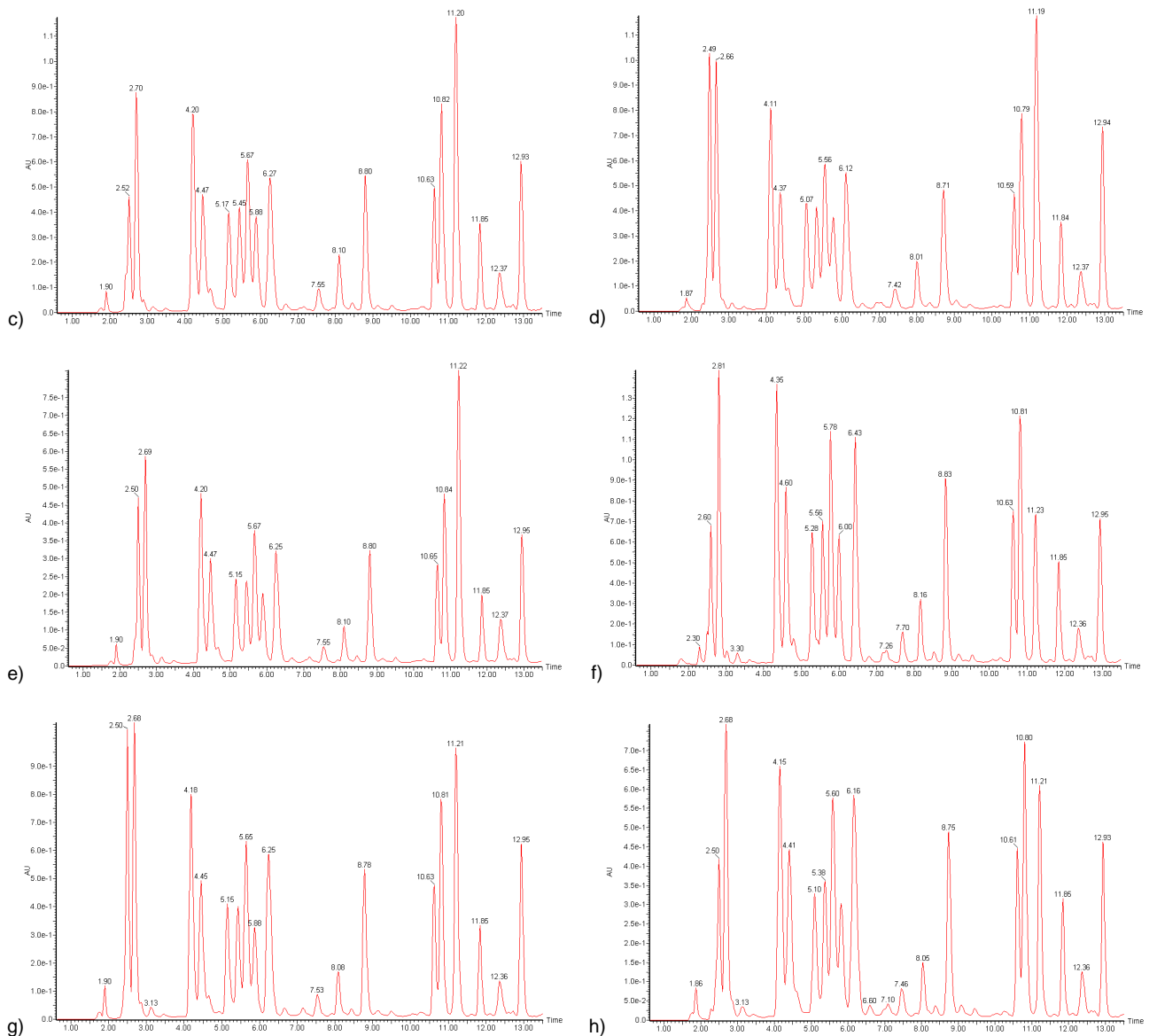


Figura 42 – Cromatograma dos filmes “Têmpera de gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível: a) 0h; b) 68h; c) 160h; d) 348h; e) 514h; f) 705h; g) 824h; h) 940h.

Tabela 54 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.

$\alpha$	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Asp</b>	3.5	6.1	4.9	10.0	8.8	4.6	10.7	5.8
<b>Glu</b>	7.2	10.0	9.9	10.4	10.9	10.4	11.3	10.5
<b>OH-Pro</b>	0.3	0.4	0.6	0.4	0.5	0.5	0.6	0.6
<b>Ser</b>	10.8	10.8	11.3	10.3	10.7	11.5	10.5	11.2
<b>Gly</b>	8.9	7.1	7.2	6.7	7.3	7.8	7.1	8.0
<b>His</b>	1.8	1.7	1.4	1.2	1.1	1.1	1.0	1.3
<b>Arg</b>	5.9	6.5	5.6	5.9	5.9	6.0	5.4	5.6
<b>Thr</b>	5.7	5.7	6.0	5.4	5.4	6.1	5.2	5.8
<b>Ala</b>	8.8	8.5	9.3	8.3	9.3	10.1	9.1	10.0

aa - aminoácido

aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Pro</b>	6.4	5.6	5.8	5.9	5.1	5.4	4.7	5.3
<b>Tyr</b>	3.4	3.1	3.0	2.4	2.3	2.5	2.1	2.1
<b>Val</b>	7.5	6.9	7.2	6.5	6.9	7.5	6.8	7.5
<b>Met</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Cis</b>	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
<b>Ile</b>	6.1	5.5	5.7	5.1	5.2	5.7	5.3	5.8
<b>Leu</b>	10.6	10.0	10.7	9.8	9.8	10.6	9.4	10.5
<b>Phe</b>	4.1	3.9	4.1	3.6	3.6	3.9	3.5	3.8
<b>Lys</b>	8.3	8.3	7.2	7.8	7.1	5.9	7.1	5.9

**Envelhecimento na câmara climática**

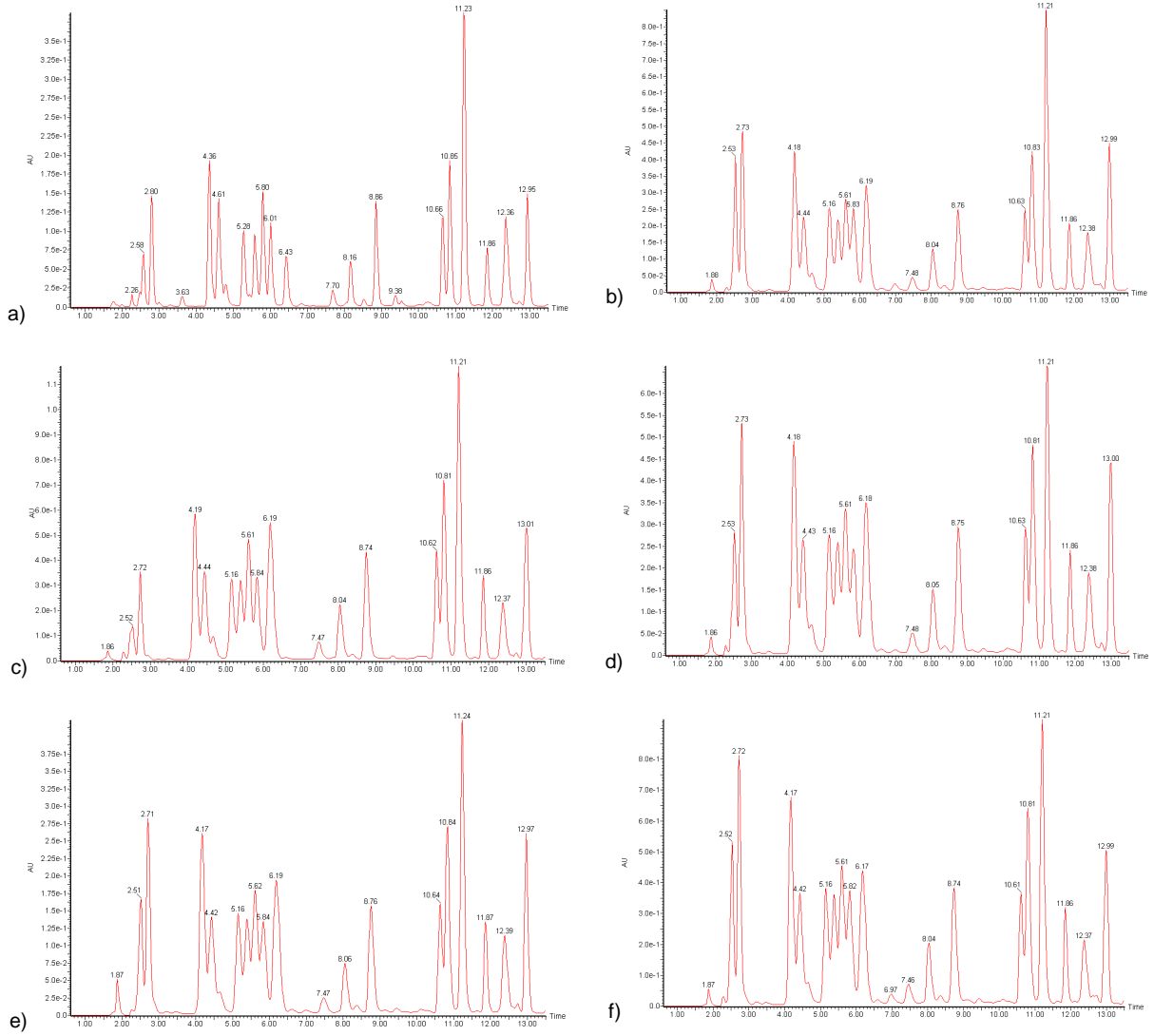
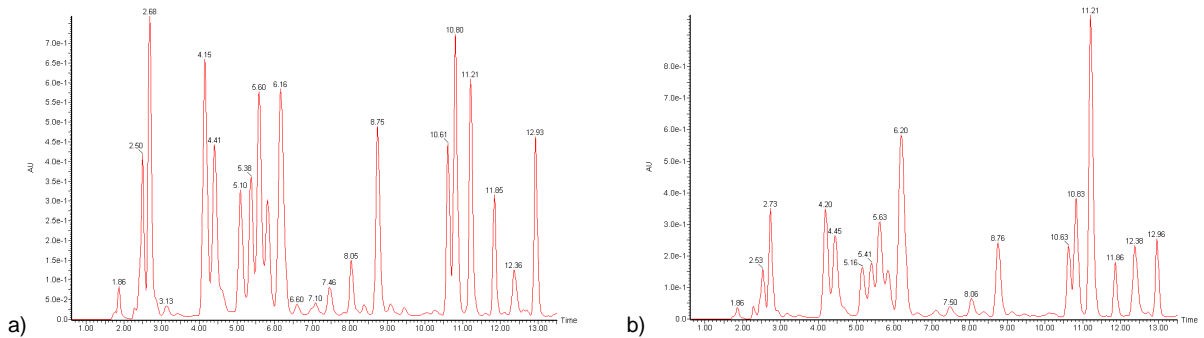


Figura 43 – Cromatograma dos filmes “Têmpera de gema de ovo” envelhecidos na câmara climática: a) 0h; b) 67h; c) 161h; d) 329h; e) 665h; f) 864h.

**Envelhecimento nas câmaras UV-Visível e climática**



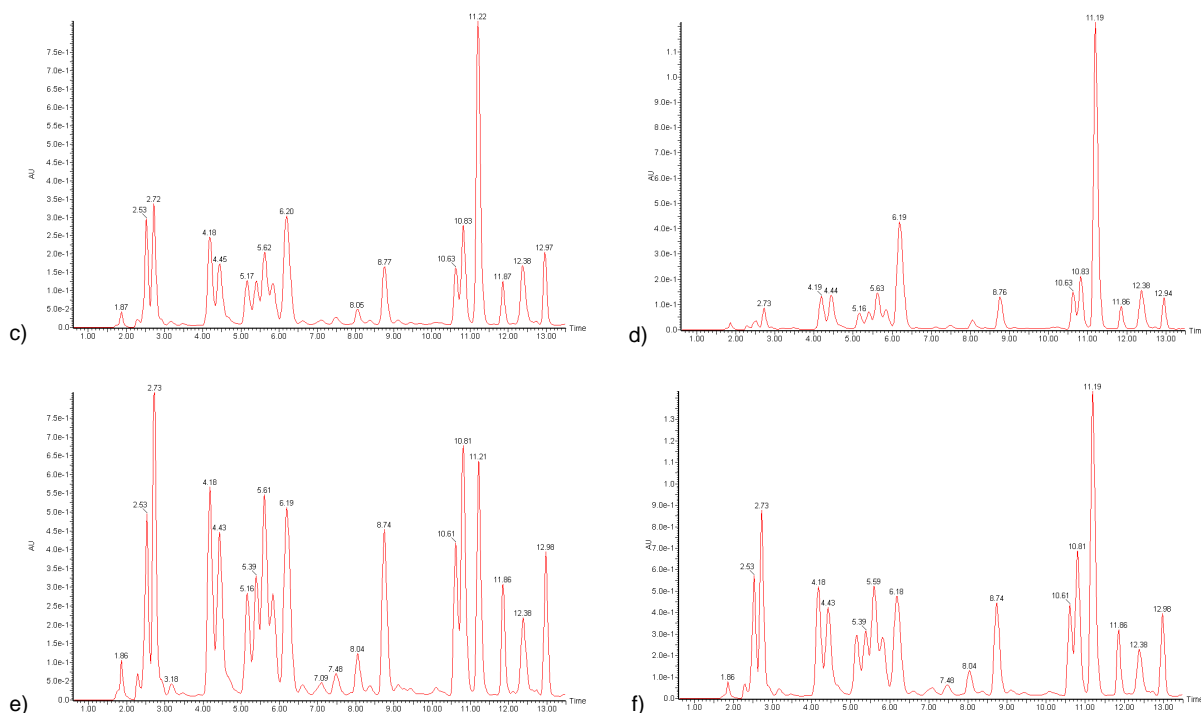


Figura 44 – Cromatograma dos filmes “Têmpera de gema de ovo” envelhecidos nas câmaras UV-Visível e climática: a) 0h; b) 67h; c) 161h; d) 329h; e) 665h; f) 864h.

Tabela 55 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.

Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
Asp	9.5	10.6	10.1	6.0	9.2	9.4
Glu	10.3	11.6	11.1	11.2	10.7	10.6
OH-Pro	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
Ser	11.0	11.9	11.9	12.7	11.0	11.0
Gly	5.4	6.1	6.3	7.3	5.9	6.2
His	1.7	1.8	1.5	1.7	1.2	1.1
Arg	6.3	6.8	6.7	7.2	6.1	6.2
Thr	5.5	6.3	6.4	6.8	6.0	5.8
Ala	8.1	8.8	8.5	9.2	7.9	8.5
Pro	5.3	5.6	6.3	6.9	5.7	6.0
Tyr	3.1	3.6	3.5	0.4	3.3	3.4
Val	6.1	7.1	7.1	0.1	6.3	6.4
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cis	0.3	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0
Ile	4.5	5.5	5.8	5.9	5.0	5.0
Leu	9.4	10.5	10.2	10.7	9.7	9.6
Phe	3.5	3.8	3.9	4.3	3.6	3.7
Lys	9.8	0.0	0.1	9.0	8.2	7.3

Tabela 56 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado nas câmaras UV-Visível e climática.

Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
Asp	5.8	4.6	9.5	2.7	6.9	7.6
Glu	10.6	9.7	11.8	5.0	11.8	12.4
OH-Pro	0.3	0.6	0.7	0.5	0.2	0.2
Ser	11.3	11.4	10.3	9.4	9.5	8.8
Gly	8.1	10.6	8.7	11.7	9.4	8.7
His	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arg	5.6	5.1	5.0	4.5	4.6	5.0
Thr	5.8	5.1	5.1	4.6	5.5	5.1
Ala	10.0	10.8	9.4	11.3	10.4	10.4
Pro	5.3	4.1	5.4	5.5	5.1	4.9
Tyr	2.1	2.1	1.9	2.8	2.1	2.2
Val	7.6	8.0	6.9	9.1	8.2	8.2
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cis	0.1	0.3	0.2	0.5	0.6	0.5
Ile	5.8	6.0	5.2	8.6	6.0	6.0
Leu	10.5	11.3	10.3	12.6	10.7	11.0
Phe	3.8	4.2	3.5	4.7	3.8	3.9
Lys	5.9	6.0	6.1	6.3	5.2	5.1

**Têmpera de gelatina**  
**Envelhecimento na câmara climática**

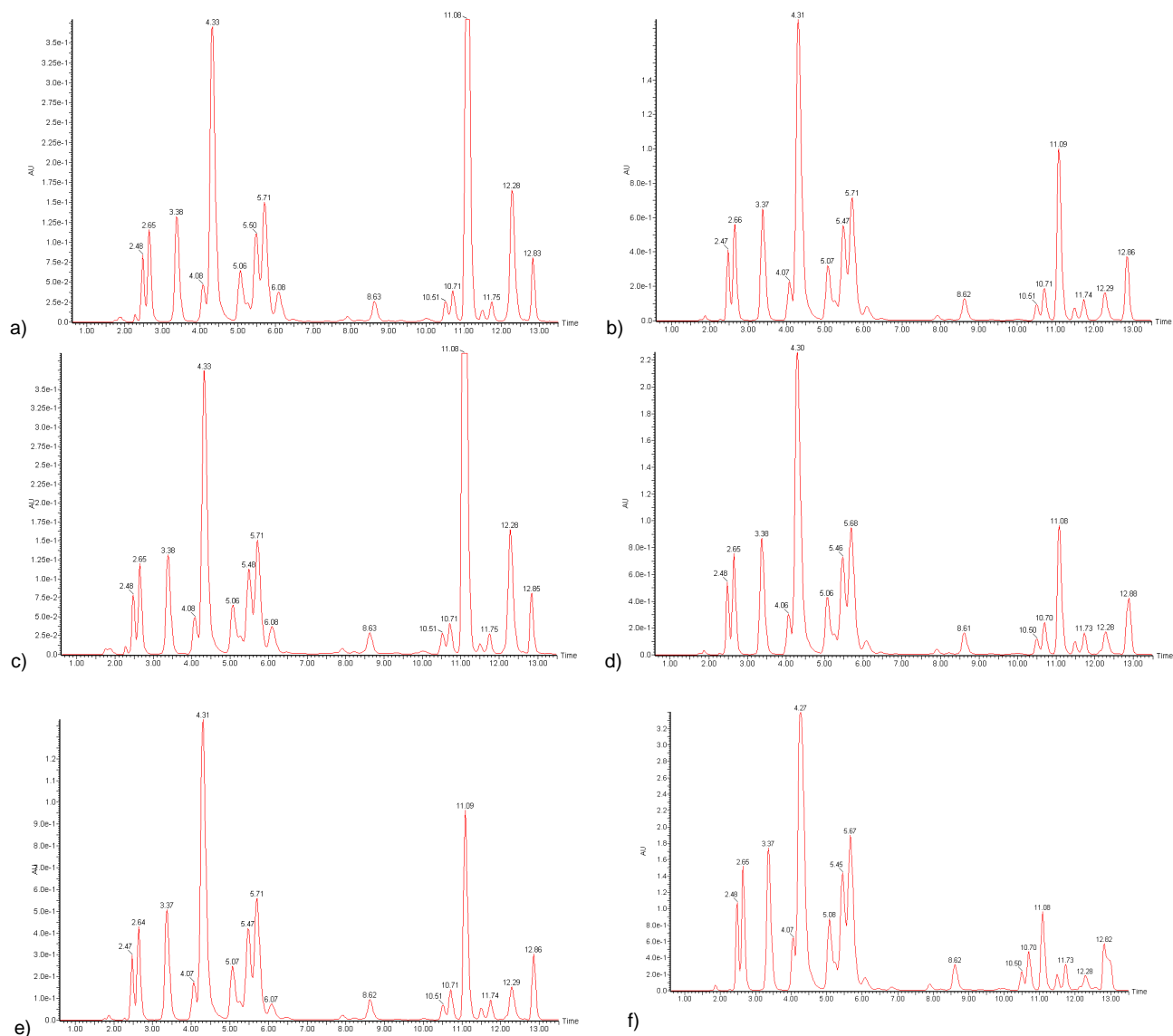


Figura 45 – Cromatograma dos filmes “Têmpera de gelatina” envelhecidos na câmara climática: a) 0h; b) 67h; c) 161h; d) 329h; e) 665h; f) 864h.

Tabela 57 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de gelatina” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.

Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
<b>Asp</b>	3.9	4.0	4.0	4.0	3.8	4.0
<b>Glu</b>	6.7	6.8	7.0	6.7	6.6	6.7
<b>OH-Pro</b>	10.0	9.9	9.7	10.0	10.2	10.2
<b>Ser</b>	3.1	2.9	3.3	2.9	3.0	2.8
<b>Gly + His</b>	33.1	33.2	32.6	33.3	33.4	31.5
<b>Arg</b>	5.3	5.4	5.2	5.3	5.5	6.8
<b>Thr</b>	1.4	1.2	1.4	1.3	1.2	0.0
<b>Ala</b>	9.4	9.4	9.1	9.4	9.4	9.3
<b>Pro</b>	14.0	14.1	13.6	14.1	14.0	15.4

Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
<b>Tyr</b>	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4
<b>Val</b>	2.1	2.1	2.4	2.1	2.1	2.1
<b>Met</b>	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
<b>Cis</b>	0.2	0.2	0.6	0.2	0.2	0.2
<b>Ile</b>	1.2	1.2	1.7	1.1	1.2	1.1
<b>Leu</b>	2.5	2.5	2.6	2.5	2.4	2.6

## Têmpera de caseína

### Envelhecimento na câmara climática

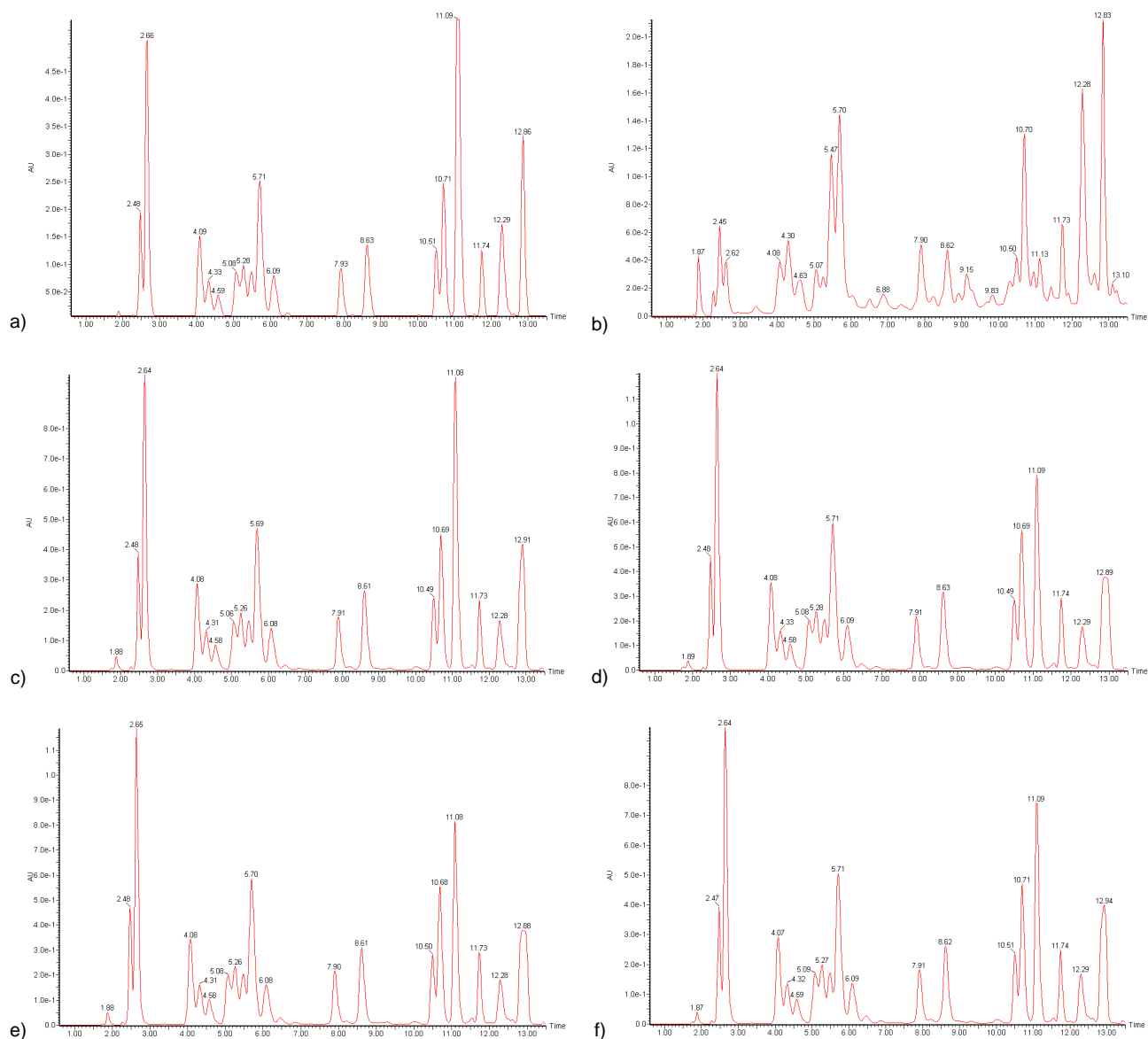


Figura 46 – Cromatograma dos filmes “Têmpera de caseína” envelhecidos na câmara climática: a) 0h; b) 67h; c) 161h; d) 329h; e) 665h; f) 864h.

Tabela 58 – Composição em aminoácidos dos filmes “Têmpera de caseína” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara climática.

Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
Asp	5.2	5.3	5.4	5.3	5.4	5.6
Glu	16.6	3.7	16.8	16.6	16.7	16.7
OH-Pro	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ser	6.8	4.8	6.6	6.6	6.5	6.6
Gly	3.6	7.3	3.2	3.2	3.3	3.3
His	2.1	4.0	2.2	2.2	2.2	2.1
Arg	4.1	3.5	3.9	4.1	3.9	4.0
Thr	4.7	2.5	4.8	4.6	4.8	4.9
Ala	3.7	13.8	3.8	4.0	3.8	3.8

Aminoácido	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)					
	0	8	19	38	77	100
Pro	13.4	19.3	13.3	13.5	13.3	13.6
Tyr	4.3	6.1	4.2	4.2	4.2	4.2
Val	6.8	5.7	6.6	6.3	6.2	6.2
Met	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cis	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	4.9	3.6	4.4	4.4	4.3	4.2
Leu	8.8	1.4	9.6	9.5	9.6	9.5
Phe	3.9	17.9	3.8	3.9	4.0	3.9
Lys	10.9	1.2	11.4	11.5	11.8	11.7

**Preparação Cola + Gesso**  
**Envelhecimento na câmara UV-Visível**

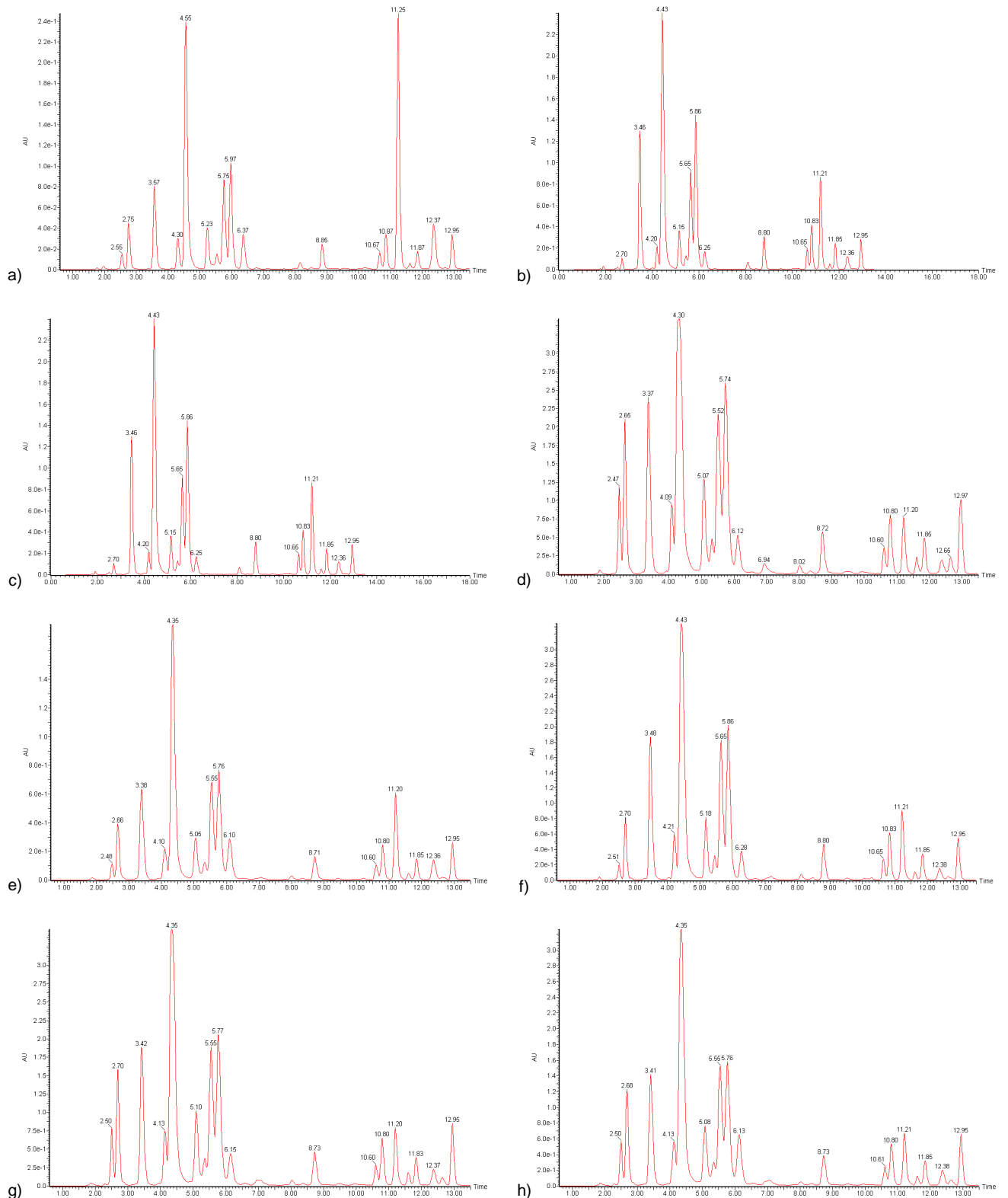


Figura 47 – Cromatograma dos filmes “Preparação de cola + gesso” envelhecidos na câmara de UV-Visível:  
a) 0h; b) 68h; c) 160h; d) 348h; e) 514h; f) 705h; g) 824h; h) 940h.



Tabela 59 – Composição em aminoácidos dos filmes “Preparação cola + Gesso” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.

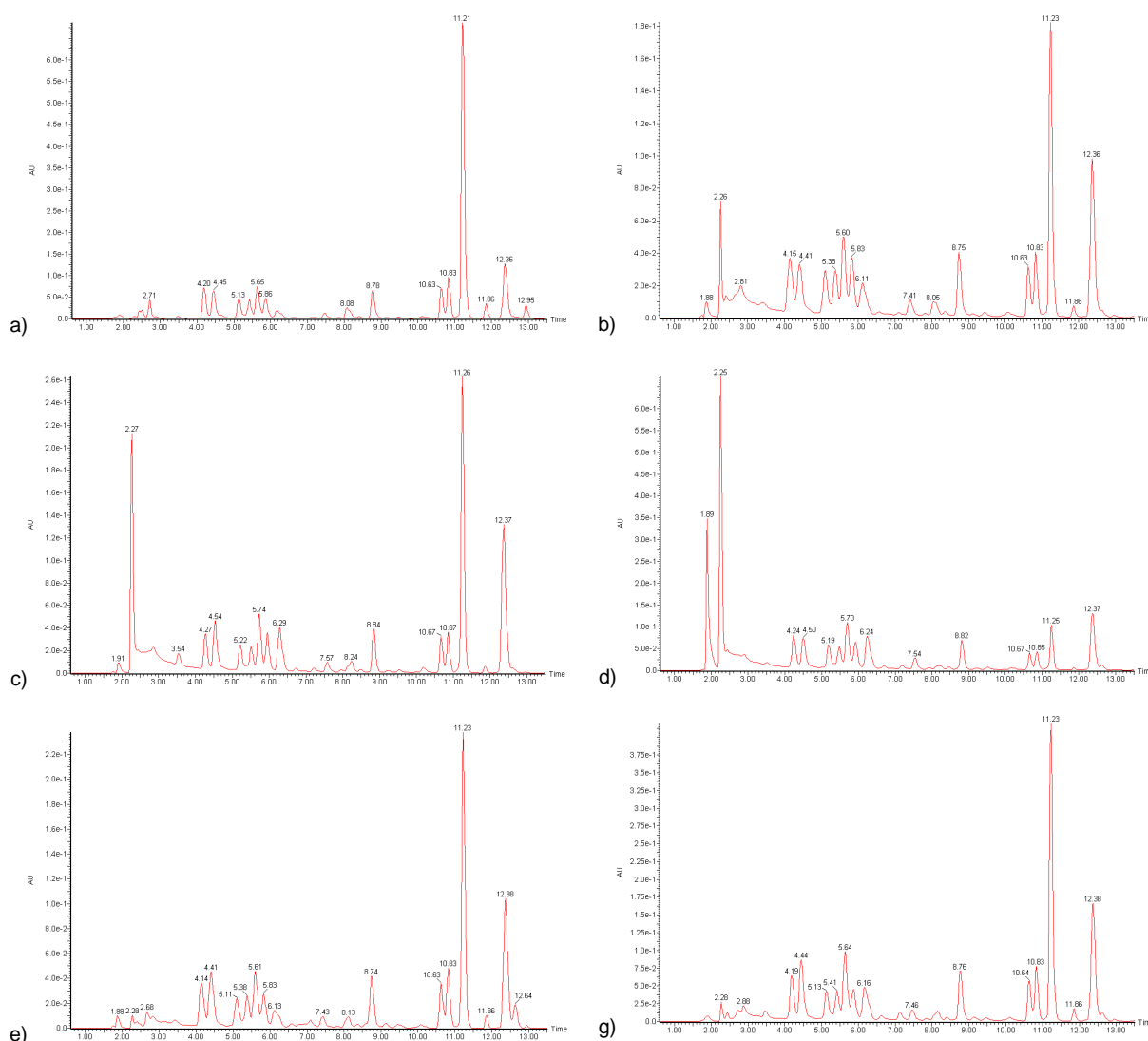
aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Asp</b>	1.6	0.2	1.6	3.5	1.3	1.0	3.1	2.7
<b>Glu</b>	5.4	1.0	4.7	7.5	5.2	4.1	7.0	6.9
<b>OH-Pro</b>	9.9	14.2	11.3	10.6	10.7	11.6	10.4	10.0
<b>Ser</b>	3.5	2.1	3.3	3.2	3.1	3.2	3.4	3.3
<b>Gly+His</b>	32.6	33.3	34.0	28.0	34.4	33.0	30.5	32.4
<b>Arg</b>	5.3	3.9	5.4	5.4	4.7	4.7	5.3	5.0
<b>Thr</b>	1.9	1.2	1.8	1.7	1.8	1.8	1.6	1.6
<b>Ala</b>	11.2	10.6	10.4	11.1	11.7	12.5	11.4	11.8
<b>Pro</b>	13.4	18.3	15.1	14.8	13.8	15.1	13.9	12.8

aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Tyr</b>	0.8	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4
<b>Val</b>	2.9	3.2	2.5	2.7	2.9	2.8	2.6	2.9
<b>Met</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Cis</b>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>Ile</b>	1.8	1.8	1.3	1.3	1.4	1.4	1.3	1.3
<b>Leu</b>	3.8	4.1	3.1	3.3	3.4	3.4	3.2	3.3
<b>Phe</b>	2.0	2.4	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9	1.8
<b>Lys</b>	3.9	2.8	3.2	4.4	3.3	3.0	3.9	3.7

aa - aminoácido

### Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo

#### Envelhecimento na câmara UV-Visível



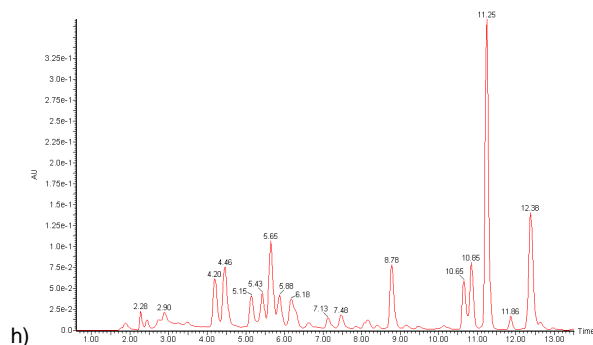


Figura 48 – Cromatograma dos filmes “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível: a) 68h; b) 160h; c) 348h; d) 514h; e) 705h; f) 824h; g) 940h.

Tabela 60 – Composição em aminoácidos dos filmes “Tinta de branco de chumbo + têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.

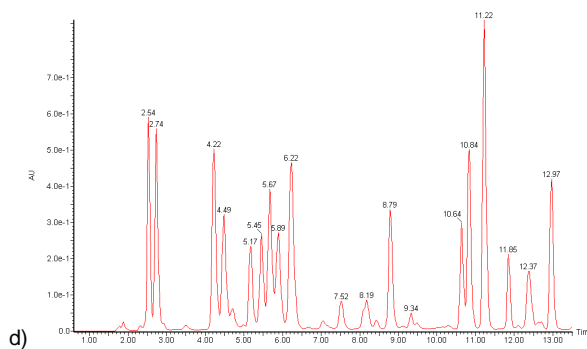
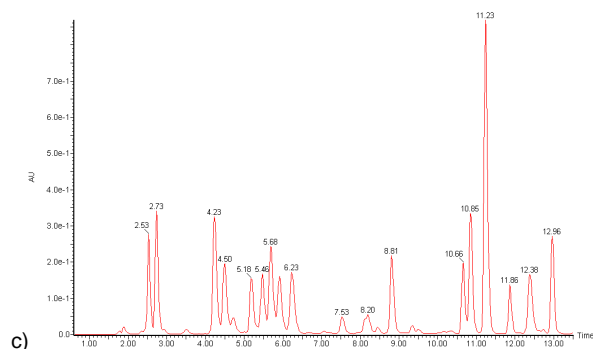
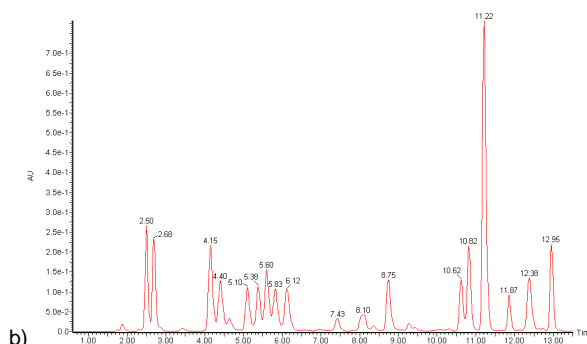
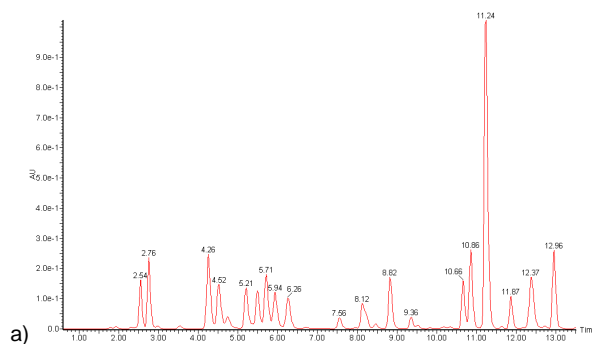
aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Asp</b>	2.0	2.2	8.2	26.7	39.0	1.7	2.4	9.7
<b>Glu</b>	2.7	4.9	14.2	19.9	0.6	4.0	5.3	11.0
<b>OH-Pro</b>	1.5	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
<b>Ser</b>	10.7	9.6	8.7	5.9	7.4	9.8	9.2	9.6
<b>Gly</b>	8.9	9.8	9.0	8.9	7.9	14.0	14.3	8.4
<b>His</b>	1.6	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
<b>Arg</b>	8.0	6.2	6.8	0.0	5.6	6.4	6.5	3.1
<b>Thr</b>	7.6	6.2	6.4	3.8	5.4	6.9	6.3	4.4
<b>Ala</b>	10.7	10.7	11.3	4.0	11.2	12.4	15.3	8.8

aa - aminoácido

aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Pro</b>	9.0	7.3	8.5	8.9	6.4	7.3	7.0	5.3
<b>Tyr</b>	4.5	4.7	2.7	2.5	1.4	2.8	2.6	2.3
<b>Val</b>	9.4	8.7	8.3	6.3	6.4	11.1	10.0	7.1
<b>Met</b>	0.7	0.4	0.6	0.5	0.7	1.1	0.7	1.0
<b>Cis</b>	1.1	0.4	1.0	1.1	0.7	1.2	1.1	0.3
<b>Ile</b>	7.6	8.5	5.6	4.8	3.3	7.9	7.3	5.6
<b>Leu</b>	10.0	11.5	7.3	5.6	3.6	10.8	9.7	10.2
<b>Phe</b>	2.3	3.8	1.2	0.9	0.4	2.1	2.0	3.5
<b>Lys</b>	1.7	3.7	0.3	0.2	0.1	0.6	0.5	8.6

### Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo

#### Envelhecimento na câmara climática



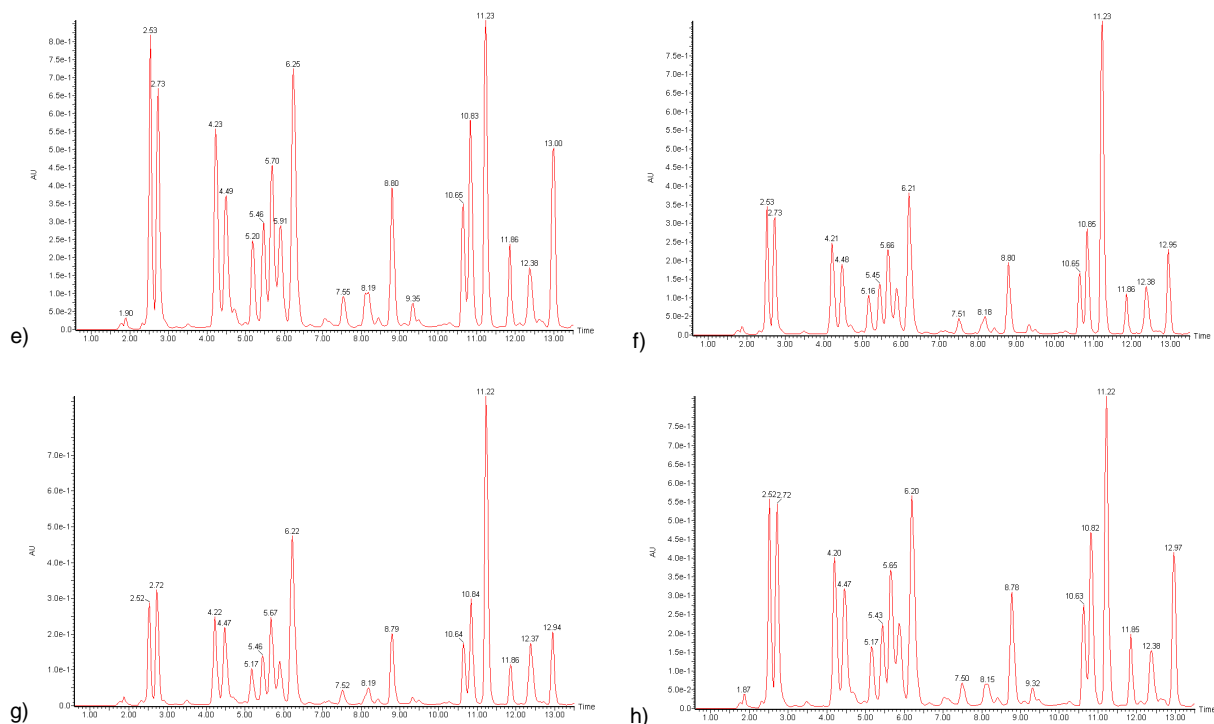


Figura 49 – Cromatograma dos filmes “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo” envelhecidos na câmara de UV-Visível: a) 0h; b) 68h; c) 160h; d) 348h; e) 514h; f) 705h; g) 824h; h) 940h.

Tabela 61 – Composição em aminoácidos dos filmes “Tinta de realgar + têmpera de gema de ovo” ao longo do envelhecimento acelerado na câmara de UV-Visível.

aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Asp</b>	5.5	9.2	7.0	9.1	10.8	10.1	8.5	9.4
<b>Glu</b>	8.3	9.4	9.4	9.7	9.8	10.5	10.5	10.8
<b>OH-Pro</b>	0.4	0.5	0.5	0.3	0.2	0.4	0.6	0.0
<b>Ser</b>	10.7	10.9	11.0	10.6	9.9	9.7	9.5	9.4
<b>Gly</b>	7.0	6.9	7.3	7.3	7.3	8.1	9.2	8.3
<b>His</b>	2.1	1.6	1.8	1.4	1.0	1.1	0.9	0.9
<b>Arg</b>	6.1	5.3	5.4	4.8	4.2	4.1	4.0	3.8
<b>Thr</b>	5.5	5.4	5.7	5.6	5.1	5.1	5.2	5.1
<b>Ala</b>	8.1	8.0	8.8	8.6	8.8	9.3	9.9	9.3

aa - aminoácido

aa	Correspondência ao envelhecimento natural (anos)							
	0	7	17	37	55	75	88	100
<b>Pro</b>	5.8	6.1	6.2	6.8	5.9	5.5	5.3	6.2
<b>Tyr</b>	1.9	1.6	1.8	1.8	1.7	1.8	1.9	1.3
<b>Val</b>	7.0	6.7	7.0	6.8	6.8	7.3	7.6	7.2
<b>Met</b>	1.5	0.9	0.7	0.8	1.1	0.9	0.8	1.1
<b>Cis</b>	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
<b>Ile</b>	5.9	5.4	5.6	5.2	5.1	5.4	5.5	5.4
<b>Leu</b>	10.1	9.5	9.9	9.6	9.4	9.7	10.1	9.8
<b>Phe</b>	3.9	3.5	3.6	3.4	3.4	3.3	3.5	3.6
<b>Lys</b>	9.9	8.6	7.9	8.0	9.1	7.5	6.8	8.4