
EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL BIODETERIORO FÚNGICO EN PINTURAS AL ÓLEO SOBRE LIENZO EN EL MARCO DEL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN SOSTENIBLES

Agustí Sala Luis¹, Pilar Bosch Roig¹, Susana Martín Rey¹ y María Teresa Doménech Carbó¹

¹Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio, Universitat Politècnica de València, España

Autor de contacto: Agustí Sala Luis, agustisalaluis@gmail.com

RESUMEN: El desarrollo fúngico en pinturas al óleo sobre lienzo supone el deterioro de los materiales por la acción enzimática y liberación de ácidos grasos durante sus procesos vitales, como la solubilización de los pigmentos, la debilidad estructural de los estratos o cambios cromáticos. Este trabajo, enmarcado en una tesis doctoral sobre el uso de biocidas naturales y ecosostenibles en procesos de restauración de pinturas al óleo biodeterioradas por hongos, evalúa a través de ensayos *in vitro* las capacidades biodeteriorantes de hongos aislados de una pintura al óleo sobre lienzo: “Paisaje urbano”, obra atribuida a Antonio Iglesias, del siglo XX. Para ello, se ha utilizado un medio de cultivo sólido modificado con pigmentos, siguiendo el modelo de Vacar, L et al., (2022) pero utilizando tierra sombra tostada, rojo inglés, ocre amarillo y azul ultramar (CTS®), este último, de naturaleza sintética. En la parte experimental del trabajo, se inocularon colonias de siete días de crecimiento en las placas Petri, y se cultivaron durante siete días más a 28°C en estufa, repitiéndose el ensayo por triplicado. El grado de afección de las colonias sobre de los pigmentos se evaluó midiendo los posibles cambios colorimétricos. A través de este ensayo se ha podido cuantificar el grado de afección de los pigmentos debido al deterioro fúngico producido por *Aspergillus westerdijkiae* y *Penicillium rubens*, siendo un aspecto fundamental para conocer los riesgos que supone la presencia de estos microorganismos en las pinturas, y el punto de partida para el desarrollo de nuevas estrategias de conservación-restauración ecosostenibles.

PALABRAS CLAVE: Pintura al óleo sobre lienzo, Pigmentos, Biodeterioro fúngico, Conservación-Restauración.

English version

TITLE: “*In vitro*” evaluation of fungal biodeterioration in oil-on-canvas paintings within the framework of developing sustainable conservation strategies.

ABSTRACT: Fungal development in oil-on-canvas paintings supposes the deterioration of materials due to enzymatic action and the release of fatty acids during their life processes, such as pigment solubilization, structural weakening of layers, or chromatic changes. This work, framed within a doctoral thesis on the use of natural and eco-sustainable biocides in restoration processes of oil paintings biodeteriorated by fungi, evaluates through *in vitro* tests the biodeteriorative capabilities of fungi isolated from an oil-on-canvas: “Paisaje urbano”, a work attributed to Antonio Iglesias, from the 20th century. For this, solid culture mediums were modified with pigments, following the model of Vacar, L et al., (2022), but using burnt umber, English red, yellow ochre, and ultramarine blue (CTS®), the latter being of synthetic nature. In the experimental part of the work, seven-day-old colonies were inoculated and cultivated for seven days at 28°C in an incubator, repeating the test in triplicate. The degree of impact of the colonies on the pigments was evaluated by measuring possible colorimetric changes. Through this test, it was possible to quantify the degree of pigment damage due to fungal deterioration caused by *Aspergillus westerdijkiae* and *Penicillium rubens*, a key aspect in understanding the risks posed by these microorganisms in paintings, and the starting point for the development of new eco-sustainable conservation-restoration strategies.

KEYWORDS: Oil-on-canvas painting, Pigments, Fungal biodeterioration, Conservation-Restoration.

1. INTRODUCCIÓN

El Patrimonio Cultural se encuentra presente en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) en el marco de la Agenda 2030 de la Unión Europea como un elemento a proteger y conservar, tal y como indica el ODS 11.4. (Guzmán *et al.*, 2017). Sin embargo, la conservación-restauración del Patrimonio Cultural tiene una responsabilidad añadida, en tanto en cuanto debe utilizar materiales y metodologías que garanticen una correcta sostenibilidad medioambiental (ODS 6. Agua limpia y saneamiento) y que garantice la atoxicidad para las personas (ODS 3. Salud y Bienestar), además de no contribuir al cambio climático (ODS 13. Acción por el clima). En este sentido, la “conservación verde” juega un papel fundamental y su desarrollo también se potencia a través de los diferentes programas financiados por los fondos Horizonte 2020 de la Unión Europea mediante la innovación en productos, estrategias y tecnologías verdes aplicables a la conservación y restauración (Baglioni and Chelazzi, 2021).

En este marco I+D+i enfocado a promover la sostenibilidad en los procesos de conservación y restauración se encuentra el proyecto ANTIMICOTIC (2020-2022) financiado por la Agencia Estatal de Investigación a través del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España, y que tenía como fin el análisis del uso de preservantes atóxicos sostenibles en tratamientos de conservación y restauración de colecciones tan diversas como pueden ser las colecciones patrimoniales universitarias. En el marco de este proyecto se inició un trabajo final de máster que ha continuado con una tesis doctoral. Dentro de esta última se halla inscrito este trabajo, que estudia la aplicación y compatibilidad cromática, mecánica, química y biocida de sustancias fungicidas naturales y adhesivos empleados en la consolidación-fijación de pintura al óleo sobre lienzo con problemas estructurales y de biodeterioro.

La pintura de caballete, y concretamente la pintura al óleo sobre lienzo, es una técnica artística materialmente muy compleja, compuesta por materiales orgánicos como celulosa, proteínas, lípidos o gomas, presentes en los diferentes estratos, así como materiales inorgánicos como los pigmentos generalmente presentes en los estratos pictóricos (Colombini *et al.*, 2022). Todos estos materiales orgánicos y algunos pigmentos son susceptibles a la acción deteriorante de los hongos si se alcanzan las condiciones ambientales ideales de proliferación y desarrollo de este tipo de microorganismos. Estas condiciones se cumplen si se supera el 70% de Humedad Relativa (HR) y la temperatura se sitúa entre los 25-30°C. La proliferación de hongos es causa de una serie de patologías a nivel estructural, debido a la penetración del micelio vegetativo en la superficie, pero también estéticas y

químicas, debido a la segregación de sustancias externas (López-Miras, Piñar, *et al.*, 2013a; Sterflinger, 2010; Sterflinger and Piñar, 2013). Las condiciones ideales para el biodeterioro son habituales en los almacenes de pequeños museos y colecciones. Asimismo, se dan episodios ocasionales como inundaciones o filtraciones de humedad, siendo la proliferación de hongos en las pinturas un problema recurrente en zonas de ambientes húmedos o lluviosas.

Entre los daños estéticos (Figura 1) derivados de la existencia de biodeterioro asociado a patologías fúngicas en los estratos pictóricos de una pintura al óleo sobre lienzo, se encuentran la alteración de los pigmentos (Salvador *et al.*, 2022) y excreción de nuevas sustancias colorantes por parte de los hongos (Poyatos *et al.*, 2018). Estos deterioros, como los de tipo estructural o mecánico, se producen a causa de las enzimas y sustancias ácidas segregadas (Beata, 2020; Okpalanozie *et al.*, 2016), y de las sustancias coloreadas segregadas como mecanismo de defensa en situaciones de estrés (Cordero and Casadevall, 2017) como la asperservina (amarillo) en el caso del *Aspergillus versicolor*, o la nigerina (negro) en el caso del *Aspergillus niger* (de Oliveira *et al.*, 2022).

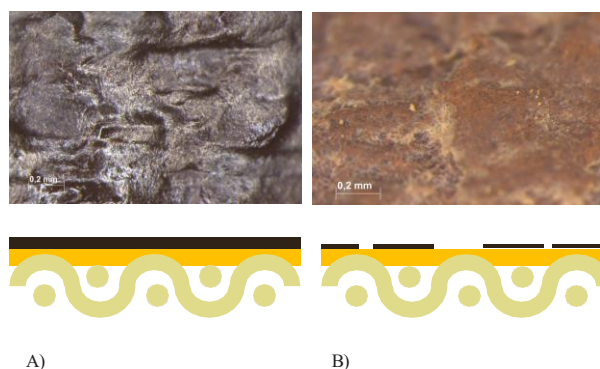


Figura 1. A) Probeta de pintura al óleo sin biodeteriorar; B) y tras el biodeterioro producido por *A. westerdijkiae*

Existen diversas técnicas de evaluación del biodeterioro, ya sea en laboratorio mediante el análisis *in vitro* (Trovão *et al.*, 2020), mediante el uso de técnicas microscópicas (Poyatos *et al.*, 2013), o combinando ambas. Por lo que respecta al análisis *in vitro*, pese a que tiene limitaciones, diversos equipos de investigación han realizado estudios con medios comunes o medios enriquecidos con los materiales constituyentes del Patrimonio Cultural para estudiar sus capacidades biodeteriorantes (Negi and Sarethy, 2019). Noohi & Papizadeh, 2022, analizaron la actividad celulolítica de *Cladosporium phaenocomae*, *Curvularia buchloes* y *Alternaria infectoria* en un medio de cultivo rico en carboximetilcelulosa (CMC), comprobando dicha actividad en medios de cultivo líquidos dentro de los cuales se introducía un fragmento de tejido. En este estudio, se determinó la presencia de celulasas segregadas por hongos y su capacidad de degradar la

celulosa de los soportes de las pinturas. Por otro lado, Văcar et al., 2022, estudiaron la sensibilidad de los pigmentos utilizados en la pintura de caballete a las colonias de *Pennicilium chrysogenum* y *Trhicroderma citrinoviride* determinando así que eran capaces de solubilizar ambos el azul ultramar sintético debido a la liberación de ácidos orgánicos y cambios de color en el pigmento blanco en el caso del *T. citrinoviride*. También realizaron perfiles de actividad enzimática analizando la producción de esterases, lipasas, lecitinasas, caseinasas, gelatinasas y amilasas. Por otro lado, se han realizado ensayos de solubilidad de CaCO_3 para determinar su susceptibilidad al biodeterioro, puesto que es un material empleado tanto en pintura mural, y como en pintura de caballete – como carga en las imprimaciones –, o es el material constituyente de muchos tipos de piedra utilizados en escultura (Trovão and Portugal, 2021).

Para este trabajo, se ha utilizado como objeto de estudio una pintura al óleo sobre lienzo atribuida a Antonio Iglesias, de mediados del siglo XX (Figura 2). Esta obra sufre un estado de conservación deficiente y patologías derivadas del crecimiento fúngico, como se describirá posteriormente.

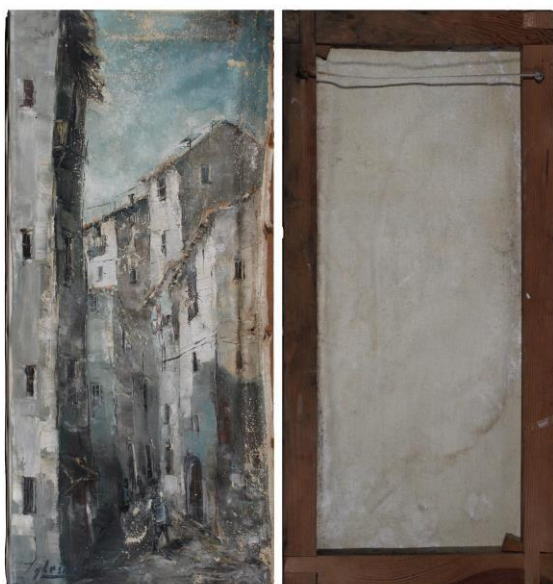


Figura 2. Paisaje urbano. Antonio Iglesias, siglo XX. A) Anverso B) Reverso

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio ha sido determinar las capacidades biodeteriorantes de los hongos identificados en la pintura sobre los pigmentos la pintura a través del muestreo y siembra de estos en diferentes medios de cultivo enriquecidos, para establecer un

primer punto de partida en el desarrollo de estrategias de conservación sostenible, alineadas con los ODS.

3. METODOLOGÍA

Los medios de cultivo empleados en este ensayo fueron enriquecidos con los pigmentos más empleados en la pintura al óleo de los siglos XIX y XX (Caravá et al., 2020; Caselli et al., 2018), atendiendo además a la sensibilidad al biodeterioro de los pigmentos y añadiendo el azul ultramar sintético, siguiendo la metodología de Văcar et al., 2022 en su artículo, aunque realizando algunas modificaciones.

De esta manera, los pigmentos empleados fueron la tierra sombra tostada, rojo inglés, ocre amarillo y azul ultramar sintético, todos suministrados por CTS®. El resto de los componentes del medio fueron *M9 Broth*, compuesto principalmente por sales inorgánicas, Extracto de levadura y Dextrosa, además de agar-agar como gelificante. De esta manera, el medio estaba compuesto por: 1L de agua, 10g de glucosa, 1g de *M9 Broth*, 0,05g de Extracto de levadura, 10g de pigmento y 15g de agar-agar. Después de preparar los cuatro medios, se esterilizaron en el autoclave y se vertieron en placas Petri de 90mm para posteriormente sembrar los hongos objeto de estudio: *Aspergillus westerdijkiae* y *Pennicilium rubens* (Figura 3). Estos hongos fueron aislados de la obra de Antonio Iglesias a través de la toma de muestras con hisopos de algodón estériles (Carlo et al., 2016) y seleccionados en anteriores investigaciones a través de una consecución de cultivos enriquecidos para determinar su potencial biodeteriorante (Sala-Luis et al., 2022). Una vez sembrados por triplicado, se cultivaron en una estufa de cultivo a 28°C, y se realizaron controles de evaluación a los 7, 15 y 30 días mediante el análisis visual y microscopía óptica (Leica® MZ APO).

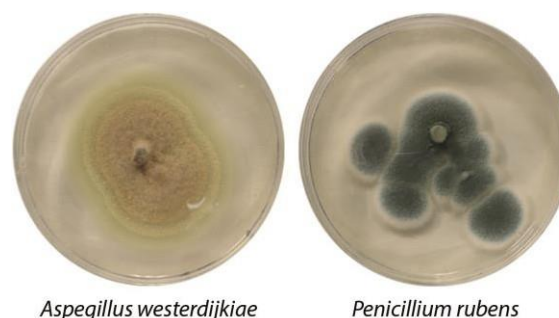


Figura 3. Colonias objeto de estudio tras 7 días de crecimiento en medio de cultivo *Saboroud Dextrose Agar*

4. RESULTADOS

4.1. Alteraciones observadas en la obra pictórica

La obra pictórica objeto de esta investigación presenta graves problemas estructurales debido a episodios de HR elevada y a colonizaciones fúngicas, dando como resultado una película pictórica frágil, con de adhesión entra los estratos pictóricos y el soporte. Se desconocen las condiciones de almacenamiento de esta obra, pues se adquirió en un rastro popular, pero previsiblemente ha estado expuesta a condiciones medioambientales inapropiadas tanto en lo relativo a HR como a temperatura. Además, en el vértice inferior derecho del lienzo y, coincidiendo con la zona más afectada tanto a nivel biológico como estructural de la policromía, se observan los efectos de un episodio puntual de humectación/mojado intenso que bien pudo ser provocado por una inundación o un fenómeno de condensación que afectó de manera parcial a la parte baja de la obra. Otra posible causa podría haber sido el contacto directo accidental con agua o con algún objeto que transfirió humedad de forma intensa en esa zona. En cuanto a los deterioros estéticos producidos por la presencia de colonias fúngicas se aprecia el enmascaramiento de la superficie por parte del micelio aéreo (Figura 4A) y manchas en forma de punteaduras en las zonas aledañas a las colonias fúngicas (4B).

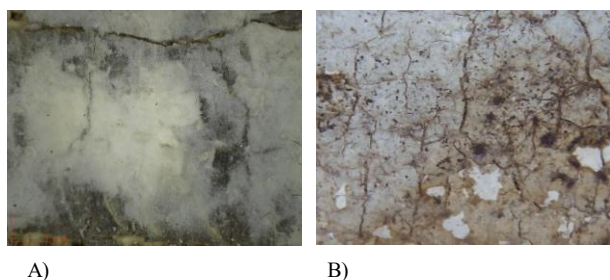


Figura 4. A) Biodeterioro en pinturas colonizadas por hongos. A) Enmascaramiento de la superficie pictórica; B) Manchas y punteaduras

4.2. Cambios observados en los cultivos *in vitro*

Transcurrido el tiempo de ensayo, los cambios más significativos se observaron en el pigmento azul ultramar. Las observaciones a ojo desnudo y mediante microscopio óptico de los cambios que experimentaron los cultivos se describen seguidamente:

Los medios modificados con pigmentos inoculados con *A. westerdijkiae* experimentan un leve oscurecimiento del pigmento en las zonas donde han actuado los hongos. Este cambio cromático se aprecia transcurridos siete días en el azul ultramar, con mayor intensidad (Figura 5B) mientras que en los tres pigmentos restantes no se observa hasta pasados treinta días. En las probetas inoculadas con *P. rubens*, no se observaron cambios

significativos en los pigmentos tierra. Sin embargo, cabe destacar los cambios extremos en el aspecto visual que se observaron en el pigmento azul ultramar ya que en las tres réplicas realizadas el halo cubría toda la placa Petri tras quince días y el pigmento aparecía completamente decolorado (Figura 5C).

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Conocer las patologías derivadas del biodeterioro fúngico es un paso fundamental para poder establecer pautas de conservación y restauración que solventen este tipo de patologías, con el fin de erradicarlas si ya se han producido (Kakakhel *et al.*, 2019) y de prevenirlas si aún no se han desarrollado a través de estrategias de conservación preventiva (Laborda *et al.*, 2022).

La complejidad matérica de las pinturas al óleo sobre lienzo supone una alta susceptibilidad al biodeterioro fúngico en condiciones ideales para su crecimiento, debido a un mal acondicionamiento de los espacios donde se conservan las obras (Caselli *et al.*, 2018). Gran diversidad de hongos ha sido aislada del aire y/o de pinturas conservadas en ambientes interiores (Bastholm *et al.*, 2022; Grabek-Lejko *et al.*, 2017; López-Miras, Martín-Sánchez, *et al.*, 2013) así como también conservadas en ambientes exteriores (Poyatos-Jiménez *et al.*, 2021). En el estudio de Poyatos-Jiménez *et al.*, 2021, *Penicillium spp* y *Aspergillus spp* se desarrollaron tanto en el anverso como en el reverso de las pinturas conservadas en el exterior y, además, en los estudios de Bastholm *et al.*, 2022 y Grabek-Lejko *et al.*, 2017 estaban presentes en el aire especies como *Penicillium italicum* y *Aspergillus fumigatus*, muy relacionados con las condiciones ambientales interiores (Grabek-Lejko *et al.*, 2017). Es por ello por lo que no resulta extraño que en una pintura como la obra objeto de estudio, conservada inadecuadamente tanto en ambientes de exterior como de interior se hayan aislado colonias tanto de *Aspergillus spp.* como *Penicillium spp.*

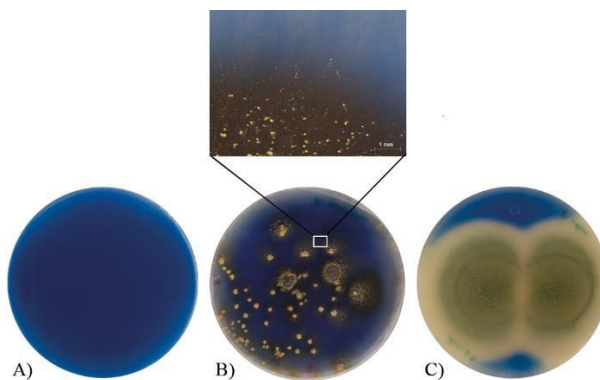


Figura 5. A) Medio de cultivo con azul ultramar; B) cultivado con *A. westerdijkiae*; C) cultivado con *P. rubens*

Como ya se ha comentado, los hongos son capaces de alterar química y físicamente los materiales constituyentes, produciendo también cambios en el color. Las consecuencias del biodeterioro fúngico producido por *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* - entre otras especies - en pintura al óleo sobre lienzo han sido recogidas por multitud de investigaciones en los últimos años, a través de ensayos que combinan análisis con microscopía y en laboratorio, utilizando métodos de ensayo *in vitro*. Este tipo de ensayos resultan muy útiles para, precisamente, conocer las capacidades biodeteriorantes de los hongos, además de ser ensayos rápidos y poco costosos (Trovão and Portugal, 2021). A través de este estudio se ha conocido como afectan esos microorganismos en condiciones de laboratorio a través de la siembra de estos en medios de cultivo enriquecidos con algunos de los pigmentos presentes en las pinturas al óleo sobre lienzo.

En estudios similares de evaluación del biodeterioro a través de medios modificados con pigmentos, como los de Văcar et al., 2022 y Pavić et al., 2015 tomados como referencia para los ensayos *in vitro* de este trabajo, determinaron que tanto hongos como bacterias tienen la capacidad de desarrollarse y producir cambios de color en medios cuyo componente principal eran los pigmentos empleados en las obras de arte, además de producir actividad enzimática que deteriora materiales como la celulosa o aceites, presentes en los soportes y capas pictóricas de las pinturas al óleo sobre lienzo. En esta línea, los principales resultados obtenidos en este trabajo están acorde con los resultados publicados en el ensayo de Văcar et al., 2022, sobretudo en el caso del azul ultramar. La liberación de ácidos grasos o sustancias quelantes por parte de los hongos son seguramente los causantes de la decoloración de pigmentos, la mayoría compuestos por metales (López-Miras, 2011; Piñar and Sterflinger, 2009).

Con relación a los cambios en la apariencia o el aspecto visual de la pintura ocasionados por la presencia y crecimiento de los hongos descritos en la anterior sección de resultados, pueden establecerse tres diferentes vías o mecanismos que han sido ampliamente reportados en la bibliografía (López-Miras, Piñar, et al., 2013b; Piñar and Sterflinger, 2009; Poyatos et al., 2018; Sabatini et al., 2018):

- 4.3. La hidrólisis de los ésteres triglicéridos del aceite secante utilizado como aglutinante que es catalizada enzimáticamente por el hongo liberando ácidos y diácidos grasos saturados de cadena corta, media y larga.
- 4.4. La disminución del pH provocada por la segregación de metabolitos de tipo ácidos como el ácido penicílico y el ácido ciclopiazónico contribuyendo a reducir el pH del medio y, de manera concomitante,

favorecen la hidrólisis de los ésteres triglicéridos y la liberación de ácidos grasos.

- 4.5. La segregación de micotoxinas coloreadas por parte de las especies fúngicas consideradas en este estudio. En particular, se ha comprobado que la especie *A. westerdijkiae* es productora de metabolitos tales como el ácido penicílico (amarillo), ochratoxina A (amarillo verdoso), xantomegnina, viomelleina (verde) y vioxantina (verde) (Visagie et al., 2014). Estas tres últimas son micotoxinas también segregadas por un amplio espectro de hongos (Blank et al., 1966). Las especies *Penicillium spp.* preferentemente segregan ochratoxina A y patulina (blanca) y, en menor proporción, ácido penicílico, ácido ciclopiazónico (blanco), citreoviridina, citrinina (amarillo limón) y roquefortina C (blanco) (Perrone and Susca, 2017).

Admitiendo que estos mecanismos han tenido lugar en el experimento llevado a cabo, el oscurecimiento de los pigmentos en la zona afectada por la colonización y en la zona circundante observado como principal alteración producida por la especie *A. westerdijkiae* estaría asociado a la segregación de micotoxinas coloreadas a. penicílico, ochratoxina A, xantomegnina, viomelleina (verde) y vioxantina en colores amarillos y verdes que contribuirían al oscurecimiento del pigmento y al cambio en el índice de refracción. Análoga explicación se daría para explicar las alteraciones observadas en los tres pigmentos tierra y óxidos de hierro inoculados con la especie *Penicillium rubens*. La severa decoloración exhibida por el pigmento azul ultramar inoculado por este último, sin embargo, ha tenido lugar siguiendo un mecanismo diferente y mucho más complejo.

El azul ultramar es un pigmento con estructura compleja consistente en un aluminosilicato de sodio conteniendo átomos de azufre con una relación molar $(\text{Na,Ca})_8(\text{AlSiO}_4)_6(\text{SO}_4,\text{S,Cl})_2$, donde la proporción de aluminio, silicio y oxígeno corresponde a la de un mineral de tipo feldespató o feldespatóide y el resto de elementos químicos están presentes como aniones o cationes en proporción variable (Plesters, 1993). Hoffman et al. (1969) (Hofmann et al., 1969) demostró que la red de aluminosilicato del azul ultramar contiene iones del tipo polisulfuro (S_2^- y S_3^-). Estos iones son radicales muy reactivos que solo se estabilizan al incorporarse a la red de aluminosilicato que son responsables del color azul del pigmento. En medios ácidos, incluso moderados como los que se generan por los procesos hidrolíticos del aceite secante del óleo, estos iones polisulfuro reaccionan con los iones hidronio formando H_2S gaseoso. La eliminación del azufre del retículo aluminosilíceo produce la pérdida de color del pigmento, lo cual es conocido desde muy antiguo como “enfermedad del azul ultramar”. Este mecanismo de reacción explica la extrema decoloración observada en

este pigmento tras el proceso de incubación y sugiere que la capacidad para acidificar el medio de cultivo que poseen las especies *Penicillium rubens* es muy superior a la de la especie *A. westerdijkiae*.

Los ensayos *in vitro* realizados también ha permitido comprender cómo se produjeron las alteraciones observadas en la obra “Paisaje urbano”. Los dos primeros mecanismos (a, b) descritos explicarían la grave pérdida de cohesión y adherencia observada en la zona afectada por episodios de condensación de la obra ya que la hidrólisis de ácidos grasos genera moléculas de menor tamaño con cierta movilidad y reduce el grado de reticulación del aglutinante en las películas pictóricas.

El tercer mecanismo de deterioro (c) anteriormente descrito podrían explicar los daños estéticos que presenta la obra. La liberación de micotoxinas coloreadas por parte de los hongos estudiados – especialmente *A. westerdijkiae* – como se ha comprobado en los estudios *in vitro* podría relacionarse con la presencia de manchas en las zonas próximas a las colonias. Si bien en la obra no se aprecia decoloración del pigmento, en los ensayos *in vitro* se ha podido determinar como la colonia de *Penicillium rubens* aislada de la obra objeto de estudio presenta gran capacidad de decoloración del pigmento azul ultramar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen al Proyecto ANTIMICOTIC PID2019-110616RB-I00 financiado por la Agencia Estatal de Investigación a través del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España. Además, el autor Agustí Sala-Luís, agradece al Proyecto Predoctoral CIACIF/2022/179 de la Generalitat Valenciana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baglioni, P. and Chelazzi, D. (2021), “How Science Can Contribute to the Remedial Conservation of Cultural Heritage”, *Chemistry - A European Journal*, John Wiley and Sons Inc, 26 July, doi: 10.1002/chem.202100675.

Bastholm, C.J., Madsen, A.M., Andersen, B., Frisvad

J.C. and Richter, J. (2022), “The mysterious mould outbreak - A comprehensive fungal colonisation in a climate-controlled museum repository challenges the environmental guidelines for heritage collections”, *Journal of Cultural Heritage*, Elsevier Masson s.r.l., Vol.55, pp. 78–87, doi: 10.1016/j.culher.2022.02.009

Beata, G. (2020), “The use of -omics tools for assessing biodeterioration of cultural heritage: A review”, *Journal*

of Cultural Heritage, Elsevier Masson s.r.l., 1 September, doi: 10.1016/j.culher.2020.03.006

Blank, F., Ng, A.S. and Just, G. (1966), “Metabolites of pathogenic fungi: V. Isolation and tentative structures of vioxanthin ETABOLITES OF PATHOGENIC FUNGI: V. ISOLATION AND TENTATIVE STRUCTURES OF VIOXANTHIN AND VIOPURPURIN, TWO COLORED METABOLITES OF TRICHOPHYTON VIOLACEUM”, *Canadian Journal of Chemistry*, Vol. 44 No. 23, pp. 2873–2879, doi: 10.1139/v66-427

Caravá, S., Roldán García, C., Vázquez de Agredos Pascual, M.L., Murcia Mascarós, S. and Izzo, F.C.(2020), “Investigation of modern oil paints through a physico-chemical integrated approach. Emblematic cases from Valencia, Spain”, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier B.V., Vol. 240, doi: 10.1016/j.saa.2020.118633

Carlo, E. Di, Chisesi, R., Barresi, G., Barbaro, S., Lombardo, G., Rotolo, V., Sebastianelli, M., et al. (2016), “Fungi and Bacteria in Indoor Cultural Heritage Environments: Microbial-related Risks for Artworks and Human Health”, *Environment and Ecology Research*, Horizon Research Publishing Co., Ltd., Vol. 4 No. 5, pp. 257–264, doi: 10.13189/eer.2016.040504

Caselli, E., Pancaldi, S., Baldissarroto, C., Petrucci, F., Impallaria, A., Volpe, L., D’Accolti, M., et al. (2018), “Characterization of biodegradation in a 17 th century easel painting and potential for a biological approach”, *PLoS ONE*, Public Library of Science, Vol. 13 No. 12, doi: 10.1371/journal.pone.0207630

Colombini, M.P., Degano, I. and Nevin, A. (2022), “Analytical Approaches to the Analysis of Paintings: An Overview of Methods and Materials”, pp. 95–111, doi: 10.1007/978-3-030-86865-9_3

Cordero, R.J.B. and Casadevall, A. (2017), “Functions of fungal melanin beyond virulence”, *Fungal Biology Reviews*, Elsevier Ltd, 1 March, doi: 10.1016/j.fbr.2016.12.003

Grabek-Lejko, D., Tekiel, A. and Kasprzyk, I. (2017), “Risk of biodeterioration of cultural heritage objects, stored in the historical and modern repositories in the Regional Museum in Rzeszow (Poland). A case study”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Elsevier Ltd, Vol. 123, pp. 46–55, doi: 10.1016/j.ibiod.2017.05.028

Guzmán, P.C., Roders, A.R.P. and Colenbrander, B.J.F. (2017), “Measuring links between cultural heritage management and sustainable urban development: An overview of global monitoring tools”, *Cities*, Elsevier Ltd, Vol. 60, pp. 192–201, doi: 10.1016/j.cities.2016.09.005

- Hofmann, U., Herzenstiel, E., Schönemann, E. and Schwarz, K. -H. (1969), "Ultramarín", *Zeitschrift Für Anorganische Und Allgemeine Chemie*, Vol. 367 No. 3 4, pp. 119–129, doi: 10.1002/zaac.19693670303.
- Kakakhel, M.A., Wu, F., Gu, J.-D., Feng, H., Shah, K. and Wang, W. (2019), "Controlling biodeterioration of cultural heritage objects with biocides: A review", *International Biodeterioration & Biodegradation*, Elsevier Ltd, Vol. 143, p. 104721, doi: 10.1016/j.ibiod.2019.104721.
- Laborda, J., García-Castillo, A.M., Mercado, R., Peiró-Vitoria, A. and Perles, A. (2022), "From concept to validation of a wireless environmental sensor for the integral application of preventive conservation methodologies in low-budget museums", *Heritage Science*, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, Vol. 10 No. 1, doi: 10.1186/s40494-022-00837-9
- López-Miras, M. del M. (2011), "Identificación y caracterización de comunidades microbianas presentes en pinturas sobre lienzo. Estudio de su capacidad como agentes de biodeterioro", Granada: Universidad de Granada
- López-Miras, M., Piñar, G., Romero-Noguera, J., Bolívar-Galiano, F.C., Ettenauer, J., Sterflinger, K. and Martín-Sánchez, I. (2013a), "Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: Identification and evaluation of their biodegradative potential", *Aerobiologia*, Vol. 29 No. 2, pp. 301–314, doi: 10.1007/s10453-012-9281-z
- López-Miras, M., Piñar, G., Romero-Noguera, J., Bolívar-Galiano, F.C., Ettenauer, J., Sterflinger, K. and Martín-Sánchez, I. (2013b), "Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: Identification and evaluation of their biodegradative potential", *Aerobiologia*, Vol. 29 No. 2, pp. 301–314, doi: 10.1007/s10453-012-9281-z
- López-Miras, M.D.M., Martín-Sánchez, I., Yebra-Rodríguez, Á., Romero-Noguera, J., Bolívar-Galiano, F., Ettenauer, J., Sterflinger, K., et al. (2013), "Contribution of the microbial communities detected on an oil painting on canvas to its biodeterioration", *PLoS ONE*, Vol. 8 No. 11, doi: 10.1371/journal.pone.0080198
- Negi, A. and Sarethy, I.P. (2019), "Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses", *Microbial Ecology*, Springer New York LLC, 1 November, doi: 10.1007/s00248-019-01366-y
- Noohi, N. and Papizadeh, M. (2022), "Study of Biodeterioration Potential of Microorganisms Isolated in the Paintings Storeroom of Mouze Makhsus Museum, Golestan Palace, Tehran", *Studies in Conservation*, Taylor and Francis Ltd., doi: 10.1080/00393630.2022.2118269
- Okpalanozie, O.E., Adebuseye, S.A., Troiano, F., Polo, A., Cappitelli, F. and Ilori, M.O. (2016), "Evaluating the microbiological risk to a contemporary Nigerian painting: Molecular and biodegradative studies", *International Biodeterioration and Biodegradation*, Elsevier Ltd, Vol. 114, pp. 184–192, doi: 10.1016/j.ibiod.2016.06.017
- de Oliveira, L.A., Segundo, W.O.P.F., de Souza, É.S., Peres, E.G., Koolen, H.H.F. and de Souza, J.V.B. (2022), "Ascomycota as a source of natural colorants", *Brazilian Journal of Microbiology*, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, doi: 10.1007/s42770-022-00768-4
- Pavić, A., Ilić-Tomić, T., Pačevski, A., Nedeljković, T., Vasiljević, B. and Morić, I. (2015), "Diversity and biodeteriorative potential of bacterial isolates from deteriorated modern combined-technique canvas painting", *International Biodeterioration and Biodegradation*, Elsevier Ltd, Vol. 97, pp. 40–50, doi: 10.1016/j.ibiod.2014.11.012
- Perrone, G. and Susca, A. (2017), "Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins", pp. 107–119, doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_5
- Piñar, G. and Sterflinger, K. (2009), "Microbes and building materials", *Building Materials: Properties, Performance and Applications*, Nova Science Publishers
- Plesters, J. (1993), "Ultramarine Blue, Natural and Artificial", *Artists' Pigments: A Handbook of Their History and Characteristics*, Vol. Volume 2, Washington: National Gallery of Art
- Poyatos, F., Martín, I. and Boívar, F. (2013), "Protocolo analítico-científico aplicado a la identificación de microorganismos y al estudio de biodeterioro en bienes culturales. Análisis en pintura sobre lienzo", *La Ciencia y El Arte IV. Ciencias Experimentales y Conservación Del Patrimonio*
- Poyatos, F., Morales, F., Nicholson, A.W. and Giordano, A. (2018), "Physiology of biodeterioration on canvas paintings", *Journal of Cellular Physiology*, John Wiley and Sons Inc, Vol. 233 No. 4, pp. 2741–2751, doi: 10.1002/jcp.26088
- Poyatos-Jiménez, F., Morales, F., Morales-Carrera, R., Boffo, S., Giordano, A. and Romero-Noguera, J. (2021), "Fungal and Bacterial Biodeterioration of Outdoor Canvas Paintings: The Case of the Cloisters of Quito, Ecuador", *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, Vol. 31 No. 3, pp. 45–63, doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2021038254

- Sabatini, L., Sisti, M. and Campana, R. (2018), “Evaluation of fungal community involved in the biodeterioration process of wooden artworks and canvases in Montefeltro area (Marche, Italy)”, *Microbiological Research*, Elsevier GmbH, Vol. 207, pp. 203–210, doi: 10.1016/j.micres.2017.12.003.
- Sala-Luis, A., Martín-Rey, S. and Bosch-Roig, P. (2022), *Empleo de Biocidas Naturales Como Alternativas Ecosostenibles, En Procesos de Consolidación de Pintura al Óleo Sobre Lienzo Con Deterioro Fúngico*, Master Thesis, Universitat Politècnica de València.
- Salvador, C., Sandu, I., Sandbakken, E., Candeias, A. and Caldeira, A.T. (2022), “Biodeterioration in art: a case study of Munch’s paintings”, *European Physical Journal Plus*, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, Vol. 137 No. 1, doi: 10.1140/epjp/s13360-021-02187-0.
- Sterflinger, K. (2010), “Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage”, *Fungal Biology Reviews*, Vol. 24 No. 1–2, pp. 47–55, doi: 10.1016/j.fbr.2010.03.003.
- Sterflinger, K. and Piñar, G. (2013), “Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills?”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97 No. 22, pp. 9637–9646, doi: 10.1007/s00253-013-5283-1.
- Trovão, J. and Portugal, A. (2021), “Current knowledge on the fungal degradation abilities profiled through biodeteriorative plate essays”, *Applied Sciences (Switzerland)*, MDPI AG, 1 May, doi: 10.3390/app11094196.
- Trovão, J., Tiago, I., Catarino, L., Gil, F. and Portugal, A. (2020), “In vitro analyses of fungi and dolomitic limestone interactions: Bioreceptivity and biodeterioration assessment”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Elsevier Ltd, Vol. 155, doi: 10.1016/j.ibiod.2020.105107.
- Văcar, C.L., Mircea, C., Pârvu, M. and Podar, D. (2022), “Diversity and Metabolic Activity of Fungi Causing Biodeterioration of Canvas Paintings”, *Journal of Fungi*, MDPI, Vol. 8 No. 6, doi: 10.3390/jof8060589.
- Visagie, C.M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., *et al.* (2014), “Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*)”, *Studies in Mycology*, Vol. 78 No. 1, pp. 1–61, doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.001.