

**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

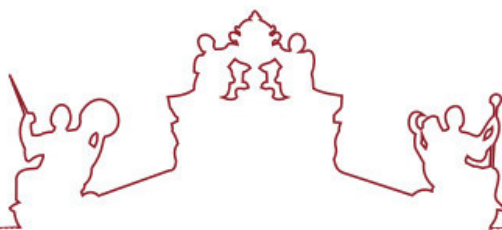
**Desenvolvimento e aplicação de novos polímeros dendríticos derivados de aminoácidos para revestimento antimicrobiano e hidrofóbico em Pedra Natural**

Mariana Craveiro Fernandes Barroso

Orientador(es) | Pedro Miguel Barrulas  
Luís Dias  
Sérgio Miguel Martins

Évora 2026





---

**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

**Desenvolvimento e aplicação de novos polímeros dendríticos derivados de aminoácidos para revestimento antimicrobiano e hidrofóbico em Pedra Natural**

Mariana Craveiro Fernandes Barroso

Orientador(es) | Pedro Miguel Barrulas

Luís Dias

Sérgio Miguel Martins

Évora 2026

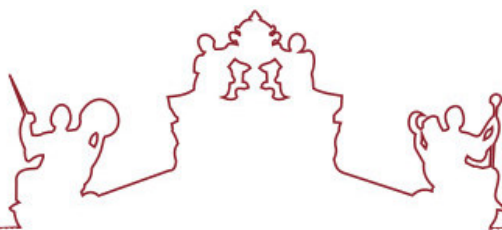
---

---

---

---

---



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ana Teresa Caldeira (Universidade de Évora)

Vogais | António Manuel Pereira (Universidade de Évora) (Arguente)  
Pedro Miguel Barrulas (Universidade de Évora) (Orientador)

*Ao meu maior exemplo de coragem e dedicação,  
pela presença em todos os momentos,  
pela paciência nos dias mais difíceis,  
e pelo apoio que guardo com carinho.*

*Obrigada, mãe.*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, expresso o meu agradecimento à Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora pela oportunidade de formação académica que me proporcionou, sendo que foi nesta casa que iniciei e desenvolvi todo o meu percurso académico desde a licenciatura.

Quero agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor Pedro Barrulas, Doutor Sérgio Martins e Doutor Luís Dias, pela oportunidade que me foi dada para adquirir novos conhecimentos através da participação ativa num projeto de investigação inovador e por me darem a confiança, para que a realização deste trabalho fosse desenvolvida de forma autónoma e ao meu próprio ritmo. Obrigada por todos os conhecimentos partilhados e por todas as críticas construtivas, que foram determinantes para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmão, agradeço profundamente as palavras de motivação, a compreensão demonstrada no tempo que deixámos de partilhar e os simples, mas importantes, gestos que me ajudaram a ver mais claro os momentos mais desafiantes. Bem hajam por todo o apoio incondicional que me transmitiram desde o início do meu percurso na Universidade de Évora, sendo que este só foi possível graças à sua presença.

A todos aqueles que me ajudaram e tornaram mais leve o meu caminho, um sincero obrigada!

Este estudo foi desenvolvido com o apoio financeiro pelo Plano de Recuperação e Resiliência da União Europeia (NextGenerationEU), através do projeto “Sustainable Stone by Portugal — Valorization of natural stone for a digital, sustainable and qualified future”, proposta n.º C644943391-00000051, e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, através do financiamento plurianual UID/04449/2025 (doi: 10.54499/UID/04449/2025), UID/PRR/04449/2025 (doi: 10.54499/UID/PRR/04449/2025) e LA/P/0132/2020 (doi: 10.54499/LA/P/0132/2020).



## RESUMO

A Pedra Natural é um material amplamente utilizado no património histórico e arquitetónico, estando sujeita a processos de deterioração resultantes da ação de fatores ambientais, biológicos e químicos. Entre estes, destacam-se a biodeterioração por microrganismos e presença de água, que favorecem a colonização biológica e promovem alterações físico-químicas e estéticas nos substratos pétreos. Neste contexto, o presente estudo pretende desenvolver novos revestimentos orgânicos com propriedades antimicrobianas e hidrofóbicas, baseados em polímeros dendríticos derivados de L-lisina funcionalizados com diferentes ácidos gordos. Para tal, foram sintetizados dendrões de gerações G0 e G1 através de reações de amidação e hidrólise, sendo posteriormente caracterizados por RMN, FTIR e espetrometria de massa. Adicionalmente, avaliou-se a atividade antimicrobiana contra microrganismos associados à biodeterioração, bem como a eficácia hidrofóbica, compatibilidade estética e durabilidade dos revestimentos aplicados em substratos pétreos. Os resultados obtidos demonstram o potencial destes compostos como alternativa inovadora e sustentável para proteção do património pétreo.

**Palavras-chave:** biodeterioração; dendrímeros; proteção de património; revestimentos hidrofóbicos; sustentabilidade.

*Development of novel dendritic polymers based on natural aminoacids for biocidal and hydrophobic coating application on Natural Stone*

**ABSTRACT**

Natural stone is a material widely used in historical and architectural heritage, and is subject to deterioration processes resulting from environmental, biological, and chemical factors. Among these, biodeterioration by microorganisms and the presence of water stand out, favoring biological colonization and promoting physical-chemical and aesthetic changes in stone substrates. In this context, the present study aims to develop new organic coatings with antimicrobial and hydrophobic properties, based on dendritic polymers derived from L-lysine functionalized with different fatty acids. To this end, G0 and G1 generation dendrons were synthesized through amidation and hydrolysis reactions and subsequently characterized by NMR, FTIR, and mass spectrometry. In addition, the antimicrobial activity against microorganisms associated with biodeterioration was evaluated, as well as the hydrophobic efficacy, aesthetic compatibility, and durability of the coatings applied to stone substrates. The results obtained demonstrate the potential of these compounds as an innovative and sustainable alternative for the protection of stone heritage.

**Keywords:** biodeterioration; dendrimers; heritage protection; hydrophobic coatings; sustainability.

## ÍNDICE GERAL

|   |     |
|---|-----|
| Agradecimentos .....  | i   |
| RESUMO .....  | iii |
| ABSTRACT .....  | iv  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | vii |
| ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS .....                                  | xii |
| CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....  | 1   |
| CAPÍTULO II – FUNDAMENTO TEÓRICO.....                                     | 5   |
| 2.1. A Pedra Natural.....   | 6   |
| 2.2. Deterioração da Pedra Natural.....                                   | 9   |
| 2.2.1. Comunidades Microbianas em Substratos Pétreos.....                 | 10  |
| 2.2.2. Mecanismos de Atividade Microbiana .....                           | 14  |
| 2.2.3. Estratégias de Controlo de Biodeterioração .....                   | 18  |
| 2.2.4. Ação da Água na Pedra Natural.....                                 | 21  |
| 2.2.5. Estratégias de Controlo de Deterioração por Ação da Água .....     | 23  |
| 2.3. Polímeros Dendríticos .....  | 27  |
| 2.3.1. Características e Propriedades dos Dendrímeros e Dendrões .....    | 29  |
| 2.3.2. Estratégias de Síntese Química.....                                | 30  |
| CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL .....                                   | 34  |
| 3.1. Materiais e Métodos .....  | 35  |
| 3.2. Síntese Orgânica de Polímeros Dendríticos Derivados de L-lisina..... | 36  |
| Parte A: Síntese de dendrões derivados de Ácido Palmítico .....           | 38  |
| 3.2.1. Síntese do Composto G0(COOH)-C15 .....                             | 38  |
| 3.2.2. Síntese do Composto G1(COOH)-C15 .....                             | 40  |
| Parte B: Síntese de dendrões derivados de Ácido Octanóico .....           | 41  |
| 3.2.3. Síntese do Composto G0(COOH)-C7 .....                              | 41  |
| 3.2.4. Síntese do Composto G1(COOH)-C7 .....                              | 42  |
| Parte C: Síntese de dendrões derivados de Ácido Araquídico.....           | 43  |
| 3.2.5. Síntese do Composto G0(COOH)-C19 .....                             | 43  |
| 3.2.6. Síntese do Composto G1(COOH)-C19 .....                             | 44  |
| Parte D: Síntese de dendrões derivados de Ácido Behénico .....            | 45  |
| 3.2.7. Síntese do Composto G0(COOH)-C21 .....                             | 45  |
| 3.2.8. Síntese do Composto G1(COOH)-C21 .....                             | 46  |

|   |     |
|---|-----|
| 3.3. Ensaio de Atividade Antimicrobiana.....  | 47  |
| 3.3.1. Preparação dos Meios de Cultura .....  | 47  |
| 3.3.2. Preparação dos Inóculos .....  | 48  |
| 3.3.3. Preparação das Soluções.....   | 48  |
| 3.3.4. Avaliação do Potencial Antimicrobiano .....                                    | 49  |
| 3.4. Estudo da compatibilidade física, química e estética com os substratos pétreos   | 50  |
| 3.4.1. Preparação dos Provetes de Pedra Natural .....                                 | 50  |
| 3.4.2. Aplicação dos Revestimentos nos Provetes de Pedra Natural.....                 | 51  |
| 3.4.3. Estudo da Eficácia Hidrofóbica por Tensiometria Ótica .....                    | 52  |
| 3.4.4. Ensaio de Colorimetria.....  | 53  |
| 3.4.5. Permeabilidade ao Vapor de Água.....   | 54  |
| 3.4.6. Ensaio de Envelhecimento Acelerado.....  | 56  |
| CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 57  |
| 4.1. Análise dos Polímeros Obtidos.....   | 58  |
| 4.2. Estudo da Atividade Antimicrobiana.....  | 65  |
| 4.2.1. Mecanismos de Atividade Antibacteriana .....                                   | 65  |
| 4.2.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana em <i>Bacillus cereus</i> .....          | 67  |
| 4.2.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana em <i>Micrococcus</i> sp. ....           | 68  |
| 4.2.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 70  |
| 4.3. Estudo das Propriedades Hidrofóbicas por Tensiometria Ótica .....                | 72  |
| 4.3.1. Estudo da Eficácia dos Revestimentos .....                                     | 73  |
| 4.3.2. Estudo da Durabilidade dos Revestimentos por Tensiometria Ótica.....           | 74  |
| 4.4. Avaliação de Alteração Cromática nos Litotipos.....                              | 80  |
| 4.4.1. Estudo da Compatibilidade Estética dos Revestimentos.....                      | 80  |
| 4.4.2. Potenciais Efeitos Estéticos provocados pelo Envelhecimento.....               | 84  |
| 4.5. Permeabilidade ao Vapor de Água.....   | 88  |
| 4.5.1. Estudo da Compatibilidade dos Revestimentos .....                              | 89  |
| CAPÍTULO V – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS .....                                    | 92  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 96  |
| ANEXOS.....   | 107 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Amostras representativas dos três litotipos referidos: calcário (a), mármore (b) e granito (c). As amostras encontram-se sobre uma escala métrica e carta de calibração cromática, utilizadas para referência dimensional e análise visual padronizada.....  | 8  |
| <b>Figura 2:</b> Fatores que causam deteriorização da Pedra Natural (adaptado de Stanaszek-Tomal, 2020).....  | 10 |
| <b>Figura 3:</b> Descoloração rosa das paredes e colunas do Mosteiro da Batalha (Portugal) devido à formação de biofilmes microbianos (adaptado de Silva et al., 2024) .....  | 11 |
| <b>Figura 4:</b> Aspeto macroscópico das colónias bacterianas de <i>Bacillus</i> sp. (adaptado de Silva et al., 2024).....  | 12 |
| <b>Figura 5:</b> Aspeto macroscópico das colónias bacterianas de <i>Micrococcus</i> sp. (adaptado de Silva et al., 2024).....   | 13 |
| <b>Figura 6:</b> Janela do Convento de Cristo em Tomar, Portugal, com (a) e sem biocolonização (b) ( Silva et al., 2025).....   | 13 |
| <b>Figura 7:</b> Aspeto macroscópico de colónias bacterianas de <i>Saccharomyces</i> sp. (adaptado de Dias et al., 2023).....   | 14 |
| <b>Figura 8:</b> Estrutura de biofilme maduro na superfície de um substrato pétreo (a) (adaptado de Liu et al., 2020). Micrografia de um biofilme maduro na superfície de uma rocha sob condições húmidas (b) (adaptado de Ding et al., 2020).....  | 15 |
| <b>Figura 9:</b> Esquema de biocorrosão de ácidos na pedra e exemplo de uma coluna de pedra deteriorada por este processo bioquímico (adaptado de Liu et al., 2020) .....   | 16 |
| <b>Figura 10:</b> Mecanismos de biodeterioração da Pedra Natural.....   | 16 |
| <b>Figura 11:</b> Biocolonização (a) e biopitting (b) em superfícies de calcário aplicado no Mosteiro dos Jerónimos, Portugal (adaptado de Rodrigues, 2022).....  | 17 |
| <b>Figura 12:</b> Biofilme a desenvolver-se numa superfície de mármore após limpeza química combinada com um tratamento mecânico (escovagem). A presença de material intracelular (manchas verdes) indica que algumas células mortas não foram totalmente removidas do mármore após o tratamento de limpeza (adaptado de Cappitelli et al., 2020) ..... | 19 |
| <b>Figura 13:</b> Imagens microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de pedra calcário não tratada (a) e pedra calcário tratada com AgCl/ZnO (b) (adaptado de Mu et al., 2021)..  | 20 |
| <b>Figura 14:</b> Imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) da pedra calcário sem revestimento (a) e com revestimento (b) de CHGCA-TPP-a (quitosano-glicerol-ácido cítrico-tripolifosfato de sódio). A seta indica os fragmentos do revestimento aplicado (adaptado de Silva et al., 2024).....   | 21 |
| <b>Figura 15:</b> Eflorescências salinas e efeitos erosivos em pedras graníticas numa estrutura histórica na cidade de Chaves, Portugal (adaptado de Alves et al., 2021) .....  | 22 |
| <b>Figura 16:</b> Gota de água sobre uma folha de lótus e estrutura de superfície correspondente (adaptado de Guo, 2022) .....  | 24 |
| <b>Figura 17:</b> Esquema de superfície hidrofílica (a), hidrofóbica (b) e superhidrofóbica (c) (adaptado de Latthe et al., 2014) .....   | 24 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 18:</b> Representação esquemática do comportamento de uma gota de água numa superfície rugosa em estado de Wenzel (a) e estado de Cassie-Baxter (b) (adaptado de Latthe et al., 2014).....   | 25 |
| <b>Figura 19:</b> Micrografias TEM (microscopia eletrônica de transmissão) de nanocompósitos poliméricos. Dispersão homogênea de nanopartículas de TiO <sub>2</sub> com Paraloid B72 (a) e dispersão homogênea de nanopartículas de ZnO com Paraloid B72 (b) (adaptado de Ibrahim et al., 2021).....   | 26 |
| <b>Figura 20:</b> Esquema de subclasses de polímeros dendríticos (adaptado de Walter & Malkoch, 2012).....   | 28 |
| <b>Figura 21:</b> Representação de um dendrímero composto por um núcleo central, unidades de ramificação repetitivas (gerações) e grupos terminais na superfície (adaptado de Ya-Ting Huang et al., 2023).....   | 29 |
| <b>Figura 22:</b> Ilustração da síntese divergente de dendrões (adaptado de Ya-Ting Huang et al., 2023).....   | 31 |
| <b>Figura 23:</b> Ilustração da síntese convergente de dendrões (adaptado de Ya-Ting Huang et al., 2023).....  | 31 |
| <b>Figura 24:</b> Estrutura química da L-lisina (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....   | 33 |
| <b>Figura 25:</b> Estrutura das moléculas L-lisina (Lys-COOH) e éster metílico da L-lisina (Lys-COOMe·HCl).....  | 36 |
| <b>Figura 26:</b> Estrutura das moléculas G <sub>0</sub> (COOMe)-R e G <sub>0</sub> (COOH)-R.....  | 37 |
| <b>Figura 27:</b> Estrutura das moléculas G <sub>1</sub> (COOMe)-R e G <sub>1</sub> (COOH)-R.....  | 37 |
| <b>Figura 28:</b> Estrutura dos ácidos gordos em estudo.....   | 38 |
| <b>Figura 29:</b> Estrutura do composto G <sub>0</sub> (COOH)-C <sub>15</sub> .....  | 38 |
| <b>Figura 30:</b> Estrutura do composto G <sub>1</sub> (COOH)-C <sub>15</sub> .....  | 40 |
| <b>Figura 31:</b> Estrutura do composto G <sub>0</sub> (COOH)-C <sub>7</sub> .....   | 41 |
| <b>Figura 32:</b> Estrutura do composto G <sub>1</sub> (COOH)-C <sub>7</sub> .....   | 42 |
| <b>Figura 33:</b> Estrutura do composto G <sub>0</sub> (COOH)-C <sub>19</sub> .....  | 43 |
| <b>Figura 34:</b> Estrutura do composto G <sub>1</sub> (COOH)-C <sub>19</sub> .....  | 44 |
| <b>Figura 35:</b> Estrutura do composto G <sub>0</sub> (COOH)-C <sub>21</sub> .....  | 45 |
| <b>Figura 36:</b> Estrutura do composto G <sub>1</sub> (COOH)-C <sub>21</sub> .....  | 46 |
| <b>Figura 37:</b> Meio de nutriente agar (NA) (a) e rampas de crescimento do microrganismo <i>B. cereus</i> (b).....   | 48 |
| <b>Figura 38:</b> Preparação dos provetes em blocos de 3 × 3 × 0.4 cm com recurso a uma serra de corte (a). Amostras obtidas dos três litotipos em estudo (calcário, mármore e granito) após uniformização das superfícies (b) sobre uma escala métrica e carta de calibração cromática, para referência dimensional e análise visual padronizada..... | 50 |
| <b>Figura 39:</b> Revestimento hidrofóbico comercial Protetor Placa de Pedra Natural AXTON (a). Vial de um dos revestimentos sintetizados [G <sub>1</sub> (COOH)-C <sub>15</sub> ] em estado líquido (b). As imagens não estão representadas à escala.....   | 51 |
| <b>Figura 40:</b> Avaliação da eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados por tensiometria ótica com recurso ao tensiómetro Ramé-Hart (a): gota de água depositada na superfície da pedra (b) e medição dos ângulos de contacto formados entre a linha de base e as tangentes ao perfil da gota (c).....   | 52 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 41:</b> Instrumento de análise colorimétrica - Colorímetro portátil Konica Minolta (abertura MAV).....   | 53 |
| <b>Figura 42:</b> Sistema de cores CIELAB representado pelos três parâmetros principais: L*, a* e b* (adaptado de M. G. Silva et al., 2016) .....  | 54 |
| <b>Figura 43:</b> Método do copo com algumas das pedras em estudo prontas as medições diárias (a). Craveira utilizada para a medição da espessura das pedras (b).....  | 55 |
| <b>Figura 44:</b> Câmara climática QUV-Accelerated Weathering Tester utilizada nos ensaios de envelhecimento acelerado para análise do desempenho dos revestimentos sintetizados .....   | 56 |
| <b>Figura 45:</b> Agente de acoplamento HBTU para formação de ligações amida (adaptado de Agudo-Álvarez et al., 2024).....   | 58 |
| <b>Figura 46:</b> Mecanismo da reação de amidação usando HBTU como reagente de acoplamento (adaptado de Agudo-Álvarez et al., 2024).....   | 59 |
| <b>Figura 47:</b> Mapa de reações envolvendo o éster metílico da L-lisina como material de partida .....   | 60 |
| <b>Figura 48:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto G0(COOMe)-C15 realizado em CDCl <sub>3</sub>  | 61 |
| <b>Figura 49:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto G0(COOH)-C15 realizado em CDCl <sub>3</sub> ..  | 62 |
| <b>Figura 50:</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do composto G0(COOH)-C15 realizado em CDCl <sub>3</sub> .  | 63 |
| <b>Figura 51:</b> Espectro FTIR do composto G0(COOH)-C15 .....   | 64 |
| <b>Figura 52:</b> Espectro de ESI-MS do composto G0(COOH)-C15.....   | 65 |
| <b>Figura 53:</b> Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação antibacteriana por ácidos gordos nas membranas celulares bacterianas (adaptado de Yoon et al., 2018) .....  | 66 |
| <b>Figura 54:</b> Representação gráfica da eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados, com base nos ângulos de contato estáticos da água medidos em diferentes litotipos ....  | 73 |
| <b>Figura 55:</b> Representação gráfica da durabilidade da eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados, com base nos ângulos de contato estáticos da água medidos nos diferentes litotipos após ensaio de envelhecimento acelerado .....  | 75 |
| <b>Figura 56:</b> Representação gráfica da variação percentual dos ângulos de contacto estáticos obtidos antes e depois do ensaio de envelhecimento acelerado, para cada revestimento aplicado nos diferentes litotipos em estudo .....  | 76 |
| <b>Figura 57:</b> Imagens de tensiometria ótica obtidas para o substrato de mármore: (a) ângulos de contacto da pedra sem revestimento (branco); (b) ângulos de contacto após aplicação do revestimento G0C21; (c) ângulos de contacto após envelhecimento do revestimento G0C21 ..... | 79 |
| <b>Figura 58:</b> Representação gráfica do ΔE* para os revestimentos aplicados nas amostras pétreas de calcário, mármore e granito .....   | 81 |
| <b>Figura 59:</b> Registo fotográfico dos substratos de pedra calcário e granito antes e após a aplicação dos revestimentos G0C19, G0C15 e G0C21 .....   | 82 |
| <b>Figura 60:</b> Representação gráfica do ΔE* para os revestimentos aplicados nas amostras de pedras em estudo após o ensaio de envelhecimento .....  | 85 |
| <b>Figura 61:</b> Representação gráfica da diferença percentual de diferença de cor (ΔE*) obtida para cada revestimento aplicado nos diferentes litotipos em estudo .....  | 86 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 62:</b> Registo fotográfico dos substratos de pedra calcário e granito antes e depois da aplicação dos revestimentos G0C19, G0C15 e G0C21, bem como após o ensaio de envelhecimento..... | 87 |
| <b>Figura 63:</b> Medições da permeabilidade ao vapor de água das amostras de pedra em estudo.....   | 89 |
| <b>Figura 64:</b> Representação gráfica da diferença percentual de permeabilidade obtida para cada revestimento aplicado nos diferentes litotipos em estudo.....                                   | 90 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Propriedades físico-mecânicas dos litotipos de calcário, mármore e granito (adaptado de Hashim et al., 2024) .....   | 7  |
| <b>Tabela 2:</b> Composição dos meios de cultura selecionados. ....   | 47 |
| <b>Tabela 3:</b> Taxa de inibição do crescimento da bactéria <i>Bacillus cereus</i> , em três concentrações diferentes dos revestimentos aplicados, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm .....   | 67 |
| <b>Tabela 4:</b> Taxa de inibição do crescimento da bactéria <i>Micrococcus sp.</i> , em três concentrações diferentes dos revestimentos aplicados, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm .....   | 69 |
| <b>Tabela 5:</b> Taxa de inibição do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em três concentrações diferentes dos revestimentos aplicados, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm .....  | 71 |
| <b>Tabela 6:</b> Tabela-resumo dos principais resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados, incluindo eficácia antimicrobiana, potencial hidrofóbico, compatibilidade estética e permeabilidade ao vapor de água. Os quadrados a verde indicam resultados positivos, enquanto os quadrados a branco correspondem a resultados não satisfatórios ..... | 95 |

## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b><sup>1</sup>H-RMN</b>  | Ressonância magnética nuclear de próton  |
| <b><sup>13</sup>C-RMN</b> | Ressonância magnética nuclear de carbono   |
| <b>DMF</b>                | <i>N,N</i> -dimetilformamida   |
| <b>eq.</b>                | Equivalente  |
| <b>FTIR</b>               | Espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ) |
| <b>HBTU</b>               | Hexafluorofosfato de O-benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> - tetrametil-urônio  |
| <b>HOBt</b>               | 1-Hidroxibenzotriazol  |
| <b>MS</b>                 | Espetrometria de massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i> )   |
| <b>m/z</b>                | Razão massa/carga  |
| <b>PAMAM</b>              | Poli(amidoamina)   |
| <b>PGP</b>                | Poligliceróis  |
| <b>PPI</b>                | Poli(propilenimina)  |
| <b>ppm</b>                | Parte por milhão   |
| <b>TEA</b>                | Trietilamina   |
| <b>THF</b>                | Tetrahidrofurano   |
| <b>TLC</b>                | Cromatografia em camada fina (do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i> )   |
| <b>UV</b>                 | Ultravioleta   |

## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO**

---

*O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem a sua própria razão de existir.*

*– Albert Einstein*

A Pedra Natural tem sido utilizada em todo o mundo na construção de património arqueológico e histórico, de modo que o desgaste, a conservação e o restauro desta é um problema identificado desde a antiguidade (Hashim *et al.*, 2024). Na época romana, reconhecia-se a necessidade de manutenção regular da pedra ou do edifício, sobretudo se se pretendesse a preservação destes a longo prazo. A deterioração observada em monumentos por todo o mundo resulta de uma combinação de fatores, tanto antropogénicos como a guerra e o vandalismo, como naturais, incluindo a ação climática, biológica e geoquímica (Dias *et al.*, 2023; Fermo *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 2021).

Os edifícios históricos e os seus elementos patrimoniais são na sua maioria construídos por Pedra Natural, que conseqüentemente sofre deterioração ao longo do tempo, provocados por mecanismos de meteorização, poluição das áreas urbanas, deterioração devido a organismos e microrganismos (biodeterioração) e à presença de sais solúveis (Fermo *et al.*, 2014; Hashim *et al.*, 2024; Ilies *et al.*, 2023). Posto isto, o desgaste e a deterioração da Pedra Natural ameaçam a preservação do património arqueológico e histórico construído (Delgado Rodrigues, 2022).

Um dos desafios mais relevantes na conservação de monumentos construídos em Pedra Natural reside na complexa interação entre o substrato pétreo, os microrganismos e os fatores ambientais (Dias *et al.*, 2023). A atividade biológica de diversas comunidades microbianas, como bactérias e fungos, contribui significativamente para a degradação da pedra, resultando frequentemente em alterações visuais indesejáveis (Lewis *et al.*, 1988). Este processo de biodeterioração manifesta-se, sobretudo, através de modificações cromáticas na superfície do material, comprometendo não apenas a sua aparência estética, mas também a sua integridade físico-química (Dias *et al.*, 2020b; Hashim *et al.*, 2024; Warscheid & Braams, 2000).

O processo de biodeterioração e crescimento dos microrganismos são fortemente influenciados pela disponibilidade de água, e estão intimamente relacionados com as propriedades do litotipo incluindo porosidade, distribuição do tamanho dos poros e permeabilidade à água, nas suas diferentes formas físicas (líquida, gasosa e adsorvida) (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018). Para além disto, a água é considerada o fator externo mais prejudicial e comum na deterioração da pedra, provocando alterações químicas, físicas e estéticas nestes materiais através de reações químicas, ciclos de congelação-descongelação e recristalização de sais à superfície (eflorescências salinas),

enfraquecendo assim a estrutura da Pedra Natural (Hashim *et al.*, 2024; Siegesmund *et al.*, 2002).

Neste sentido, existe a necessidade urgente de desenvolver revestimentos antimicrobianos e hidrofóbicos protetores que impeçam a penetração da água na Pedra Natural e limitem o crescimento de populações microbianas (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018; Hashim *et al.*, 2024; Trovão & Portugal, 2023). Assim, o presente estudo visa desenvolver novos materiais orgânicos e aplicar estratégias de proteção e conservação da Pedra Natural através de compostos antimicrobianos e hidrofóbicos de forma a proteger os monumentos por ação de um efeito impermeável, para mitigar a ação da água na pedra. Esta abordagem pretende, simultaneamente, contribuir para a valorização socioeconómica dos recursos nacionais de pedra ornamental portuguesa e para a salvaguarda de bens patrimoniais com elevado valor cultural.

Deste modo, tem-se que o objetivo geral da presente investigação centra-se no desenvolvimento de novos revestimentos orgânicos com propriedades antimicrobianas e hidrofóbicas para proteção de Pedra Natural e testar a sua compatibilidade química, física, estética, assim como a sua durabilidade quando exposta a fatores externos controlados.

O objetivo geral pode ser alcançado pela concretização das seguintes tarefas (T) implementadas:

- T1. Síntese orgânica de polímeros dendríticos de várias classes;
- T2. Caracterização química e estrutural dos compostos;
- T3. Estudo das propriedades antimicrobianas dos revestimentos desenvolvidos;
- T4. Estudo da durabilidade dos revestimentos quando expostos a condições artificiais climáticas desenvolvidas por envelhecimento acelerado em provetes de pedra previamente selecionados;
- T5. Avaliação da performance hidrofóbica e da compatibilidade física, química e estética dos revestimentos com os substratos em estudo.

A presente dissertação encontra-se estruturada em cinco capítulos. Em primeiro, apresenta-se o Capítulo I com uma breve introdução ao estudo e seus principais objetivos, contextualizando a problemática associada à deterioração da Pedra Natural e a relevância do desenvolvimento de estratégias de proteção inovadoras.

De seguida, o Capítulo II é dedicado ao enquadramento teórico, abordando características da Pedra Natural, os principais mecanismos de deterioração física, química e biológica, com especial foco na biodeterioração microbiana e o papel da água, bem como os fundamentos associados aos polímeros dendríticos, incluindo as suas características, propriedades e estratégias de síntese existentes.

No Capítulo III, encontra-se a parte experimental que descreve os métodos utilizados neste estudo, incluindo a síntese orgânica dos polímeros dendríticos derivados de L-lisina, os ensaios de atividade antimicrobiana e o estudo da eficácia hidrofóbica e da compatibilidade física, química e estética dos revestimentos aplicados em substratos pétreos.

No Capítulo IV, são analisados e discutidos os resultados obtidos, relativamente à caracterização dos polímeros, avaliação da atividade antimicrobiana, estudo das propriedades hidrofóbicas, análise de alterações cromáticas e permeabilidade ao vapor de água. Por fim, no Capítulo V apresentam-se as conclusões do estudo realizado e as perspetivas futuras de investigação.

## **CAPÍTULO II – FUNDAMENTO TEÓRICO**

---

*Para ser um bom observador é preciso ser um bom teórico.*

*– Charles Darwin*

A proteção do nosso património arquitetónico, além da clara importância cultural e histórica, tem um valor económico e ecológico substancial (Fermo *et al.*, 2014). Évora, cidade Património Mundial Unesco desde 1986, terá o privilégio de ser Capital Europeia da Cultura em 2027, uma distinção que destaca a riqueza cultural, histórica e patrimonial desta região. O Alentejo, conhecido pelas suas paisagens vastas e tranquilas, é também um território repleto de monumentos de valor arqueológico e histórico como o Templo romano de Évora, a Sé Catedral, a Igreja de São Francisco e a Capela dos Ossos, que testemunham séculos de civilização e diversidade cultural. Este reconhecimento é uma oportunidade única para promover o legado material do Alentejo, reforçando a necessidade de investigações voltadas para a proteção e valorização do património.

A Pedra Natural, um recurso mineral versátil, é essencial na arquitetura e construção sendo apreciada pelas suas propriedades físicas e mecânicas únicas (Strzałkowski, 2021). No entanto, a sua conservação apresenta desafios significativos, especialmente face aos efeitos adversos de fatores externos, que induzem gradualmente a deterioração se não forem tomadas quaisquer intervenções. Assim, é fundamental desenvolver soluções sustentáveis e eficazes para a sua proteção e valorização, considerando que uma parte substancial do património cultural material assenta em substratos pétreos (Hashim *et al.*, 2024).

### **2.1. A Pedra Natural**

A Pedra Natural é considerada um material de construção sustentável e verde devido ao seu baixo consumo de energia durante o processamento, reciclabilidade significativa e aplicações de economia circular. A versatilidade faz da Pedra Natural um excelente recurso para estruturas arquitetónicas interiores e exteriores, sendo utilizada globalmente na construção de património arqueológico, histórico e moderno, representando História, identidade e o legado das sociedades humanas (Strzałkowski, 2021; Tiano, 2016). As propriedades físico-estruturais dos substratos pétreos, como a porosidade e a rugosidade, desempenham um papel importante na interação com os agentes de degradação, refletindo-se tanto nos processos de biodeterioração como na eficácia dos tratamentos de conservação aplicados (Cevheroğlu Çira *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2016).

A porosidade corresponde à presença de espaços vazios na matriz interna da rocha, os quais facilitam a absorção e retenção de água, bem como a infiltração de poluentes e

microrganismos (Gabriele *et al.*, 2023). De forma geral, a porosidade pode ser classificada como baixa quando inferior a 5 %, moderada para valores entre 5 e 15 % e elevada quando superior a 15 %. Um substrato altamente poroso apresenta maior vulnerabilidade à biodeterioração, uma vez que a sua estrutura favorece a retenção de água nos poros, criando microambientes húmidos que facilitam a germinação de esporos e o subsequente desenvolvimento dos microrganismos (Cevheroğlu Çira *et al.*, 2018; Noiriel *et al.*, 2004).

Por sua vez, a rugosidade refere-se à morfologia superficial da rocha, influenciando diretamente a adesão de partículas e microrganismos. A rugosidade está fortemente correlacionada com a porosidade: quanto maior a porosidade, maior a rugosidade e menor o brilho. Estas características influenciam fortemente um processo de ação da água que leva ao enfraquecimento das estruturas, como a absorção de água por capilaridade (Cevheroğlu Çira *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2016).

De acordo com a literatura, os principais litotipos utilizados na construção de monumentos incluem, por exemplo, mármore, calcário, granito, arenitos e xistos (Hashim *et al.*, 2024; Scheerer *et al.*, 2009). De forma a abranger os principais substratos utilizados no património arquitetónico português, o foco desta investigação assentou em Pedras Naturais frequentemente utilizadas desde estruturas megalíticas monumentais pré-históricas até edifícios modernos e contemporâneos (**Tabela 1**).

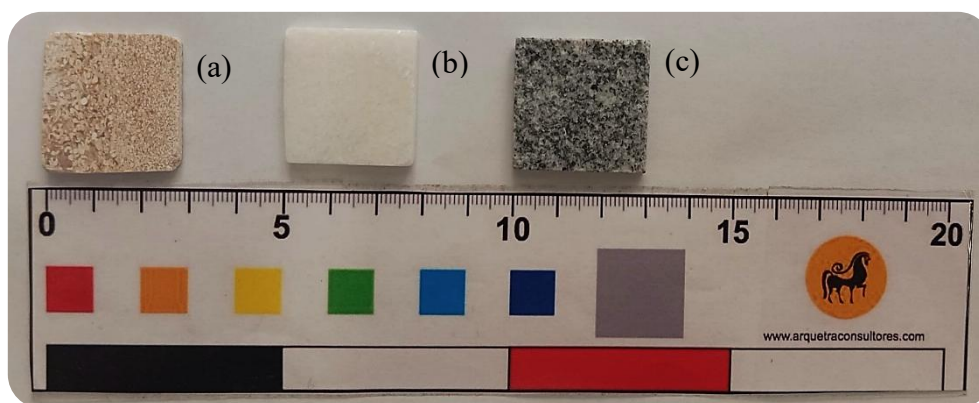
**Tabela 1:** Propriedades físico-mecânicas dos litotipos de calcário, mármore e granito (adaptado de Hashim *et al.*, 2024)

| <b>Propriedade</b>                         | <b>Calcário</b> | <b>Mármore</b> | <b>Granito</b> |
|--|-----------------|----------------|----------------|
| Densidade aparente [kg/m <sup>3</sup> ]    | 2398 ± 7        | 2714 ± 6       | 2722 ± 5       |
| Porosidade aberta [%]                      | 7.80 ± 0.20     | 0.40 ± 0.02    | 0.05 ± 0.01    |
| Absorção de água à pressão atmosférica [%] | 3.00 ± 0.50     | 0.10 ± 0.02    | 0.10 ± 0.01    |

Conforme evidenciado na **Tabela 1**, o calcário apresenta uma porosidade moderada (7.80%), o que indica uma estrutura interna altamente permeável. Esta característica, aliada à absorção de água acentuada, torna este litotipo particularmente suscetível à retenção de humidade e à colonização biológica (Noiriel *et al.*, 2004).

O mármore, por sua vez, apresenta uma porosidade significativamente inferior (0.40%), revelando uma estrutura compacta e pouco permeável. Para além disto, a sua superfície de baixa rugosidade dificulta a adesão microbiana. Apesar deste litotipo apresentar porosidade baixa, possíveis variações texturais e químicas (como maior teor de MgO) podem aumentar a porosidade, reduzindo o brilho e aumentando a rugosidade superficial (Cevheroğlu Çira *et al.*, 2018).

No caso do granito, este possui uma porosidade muito baixa, predominando microfraturas, e com uma porosidade quase nula (0.05%) caracteriza-se por uma elevada densidade e resistência mecânica, sendo o substrato potencialmente menos vulnerável à biodeterioração (Sousa *et al.*, 2005).



**Figura 1:** Amostras representativas dos três litotipos referidos: calcário (a), mármore (b) e granito (c). As amostras encontram-se sobre uma escala métrica e carta de calibração cromática, utilizadas para referência dimensional e análise visual padronizada

As propriedades físico-químicas entre os diferentes substratos pétreos são influenciadas pela composição, microestrutura e processos ambientais. Neste sentido, o mármore e o calcário tendem a ser mais porosos e suscetíveis a alterações ambientais, enquanto o granito é o mais resistente dos três litotipos em estudo. Estas propriedades são essenciais para prever a durabilidade e o desempenho dos substratos pétreos em contextos construtivos e patrimoniais, tal como selecionar os revestimentos protetores mais adequados a cada tipo de material. A compatibilidade entre substrato e *tratamento* é importante, para maximizar a eficácia das intervenções de conservação e garantir a sua estabilidade a longo prazo (Cevheroğlu Çira *et al.*, 2018).

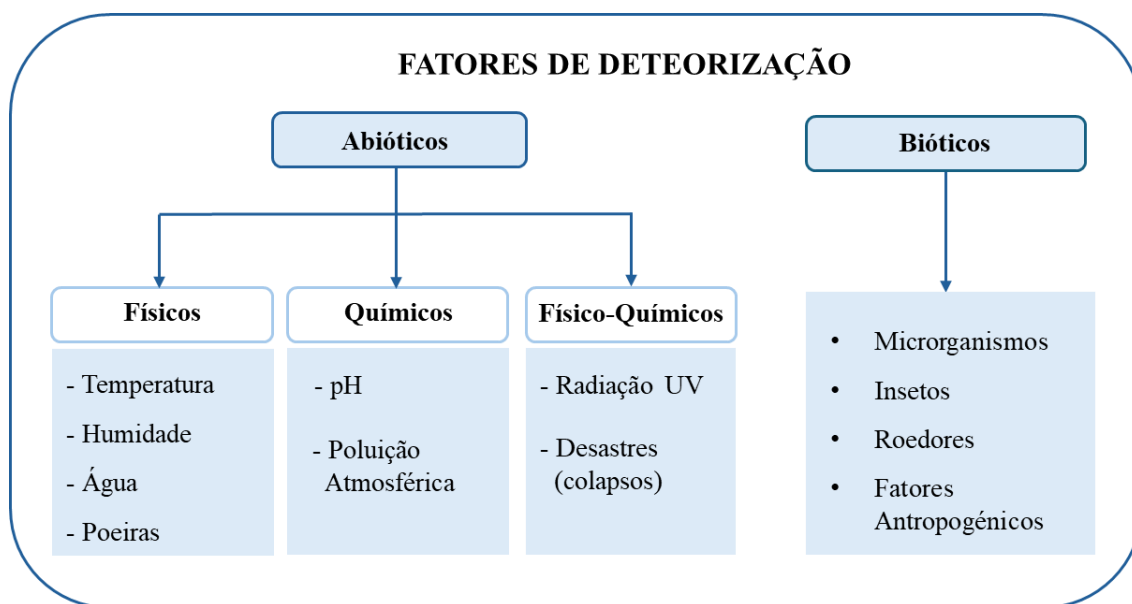
### 2.2. Deterioração da Pedra Natural

A preservação da Pedra Natural constitui uma responsabilidade partilhada no mundo atual uma vez que os fenómenos de meteorização e degradação são persistentes e de grande relevância, com impacto global, afetando significativamente a dimensão estética de materiais pétreos e comprometendo simultaneamente o seu valor económico e cultural (Ding *et al.*, 2020; Hashim *et al.*, 2024; N. C. Silva *et al.*, 2024).

A Pedra Natural pode sofrer danos estruturais adicionais devido a fenómenos de stress térmico, associados a variações bruscas de temperatura, ou pela presença de materiais heterogéneos com diferentes coeficientes de expansão térmica (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018; Gabriele *et al.*, 2023). Estas alterações são fortemente influenciadas pelas propriedades intrínsecas da pedra, nomeadamente a sua composição mineralógica, textura, porosidade e características térmicas e mecânicas (Stanaszek-Tomal, 2020).

A deterioração pode ser classificada em três principais categorias, nomeadamente física, química e estética. A deterioração física ou mecânica corresponde à perda de resistência do substrato, tornando materiais anteriormente duráveis em estruturas frágeis e quebradiças. A deterioração química está associada à perda de massa do material devido à dissolução e transformação mineral mediada por processos metabólicos microbianos. Por outro lado, a degradação estética manifesta-se por alterações visuais, como manchas, descoloração ou depósitos superficiais, diminuindo conseqüentemente, o valor artístico e cultural das obras (Stanaszek-Tomal, 2020).

Os fatores que influenciam a deterioração da pedra podem atuar de forma simultânea e ser mutuamente dependentes. Contudo, um deles pode predominar em relação aos outros, dependendo das características do substrato, da composição da comunidade biótica presente, assim como das condições ambientais. Estes fatores podem ser divididos em grupos, conforme apresentado na **Figura 2** (Ilies *et al.*, 2023; Stanaszek-Tomal, 2020).



**Figura 2:** Fatores que causam deterioração da Pedra Natural (adaptado de Stanaszek-Tomal, 2020)

Deste modo, como a atividade dos microrganismos e a ação da água estão entre os principais agentes responsáveis pela deterioração dos materiais pétreos, serão estes fatores o foco do presente estudo.

### 2.2.1. Comunidades Microbianas em Substratos Pétreos

Os danos na Pedra Natural causados por microrganismos são frequentemente designados por biodeterioração (Sazanova *et al.*, 2022). A colonização por microrganismos é o primeiro passo no processo de biodeterioração da Pedra Natural, e tendo como interesse a durabilidade estética da Pedra Natural, o património pétreo não deve ser tão recetivo à colonização biológica (Gabriele *et al.*, 2023; Ilies *et al.*, 2023; Tomaselli *et al.*, 2000). Os microrganismos toleram uma ampla gama de variações ambientais e, quando expostos a condições favoráveis, como elevados níveis de humidade e/ou exposição à luz, proliferam com grande eficiência infiltrando-se nas fissuras das pedras causando tensões que podem fragilizar e fragmentar o substrato. Este fenómeno aumenta a área de exposição a agentes de degradação potenciando a deterioração estética e estrutural dos monumentos (Ilies *et al.*, 2023; Ding *et al.*, 2020; Rosado *et al.*, 2020).

No contexto do património português, a colonização de edifícios e monumentos históricos por fungos, algas e bactérias é um fenómeno comum, frequentemente associado a processos de deterioração visual e estrutural (Silva *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2025). Neste sentido, nos últimos anos, têm sido realizados diversos estudos nos quais se isolam e identificam uma variedade de microrganismos associados a materiais pétreos, reforçando

a relevância deste problema (Dias *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2025; Joseph *et al.*, 2021; Skipper *et al.*, 2022).

Em Silva *et al.* (2024), investigou-se a colonização biológica do Mosteiro da Batalha, em Portugal, devido à presença de alterações superficiais significativas nos elementos arquitetónicos em pedra, nomeadamente uma coloração cor-de-rosa generalizada nas paredes e colunas. A coloração foi associada à formação de biofilmes por microrganismos produtores de pigmentos, em particular bactérias capazes de sintetizar pigmentos carotenoides. Foram identificados vários géneros de bactérias produtoras de pigmentos rosa-alaranjados, com destaque para *Bacillus*, *Gordonia*, *Serratia* e *Methylobacterium* (Silva *et al.*, 2024).

Segundo Philip J. A. Skipper (2022), algumas espécies de *Bacillus* produzem ácidos capazes de acelerar a degradação de substratos pétreos, como é o caso de *Bacillus cereus*. Esta estirpe bacteriana produz pigmentos rosa-avermelhados (**Figura 3**) e forma biofilmes sobre superfícies de pedra, principalmente calcário, induzindo o fenómeno de bioerosão através da dissolução localizada de carbonato de cálcio (Skipper *et al.*, 2022; Lewis *et al.*, 1988; Z. Li & Li, 2022; Dias, *et al.*, 2024).



**Figura 3:** Descoloração rosa das paredes e colunas do Mosteiro da Batalha (Portugal) devido à formação de biofilmes microbianos (adaptado de Silva *et al.*, 2024)

O género *Bacillus* (**Figura 4**) encontra-se amplamente documentado em diferentes bens do património cultural, incluindo pinturas, frescos, catacumbas e monumentos de pedra (Dias *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2025; Skipper *et al.*, 2022). As bactérias do género *Bacillus* são seres procariontes unicelulares, aeróbias e formadoras de endósporos, com grande versatilidade metabólica e capacidade de colonizar diversos

habitats, como solo, água e rochas. A formação de endósporos resistentes a múltiplos fatores de stresse ambiental proporciona a este género vantagens adaptativas significativas, o que explica a sua sobrevivência e crescimento em ambientes hostis (Silva *et al.*, 2024; Scheerer *et al.*, 2009).



**Figura 4:** Aspeto macroscópico das colónias bacterianas de *Bacillus* sp. (adaptado de Silva *et al.*, 2024)

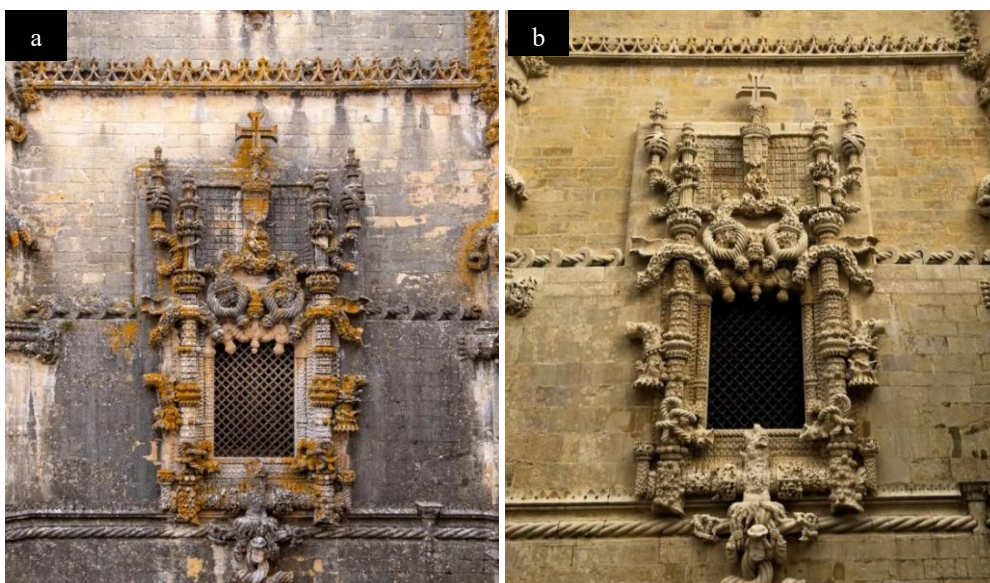
Um estudo realizado por Wonsuh Song (2010) focou-se na erosão de minerais graníticos induzida por bactérias do género *Bacillus*. Os resultados obtidos demonstraram que estas bactérias intensificam a erosão do granito e dos seus minerais constituintes, formando cavidades microscópicas na superfície (microcavidades), particularmente através do ataque ácido a feldspatos, evidenciando assim o papel que a bactéria *Bacillus* apresenta na biodeterioração de rochas silicatadas (Gaylarde & Baptista-Neto, 2021)(Song *et al.*, 2010).

De acordo com Philip J. A. Skipper (2022), as pedras de calcário e mármore são solúveis em soluções de ácidos fracos e, por isso, particularmente vulneráveis à biocorrosão. Neste estudo, foram isoladas e identificadas bactérias do género *Bacillus* e *Micrococcus* como parte do microbioma central as superfícies pétreas analisadas (Skipper *et al.*, 2022). O *Micrococcus* sp. (**Figura 5**) é uma bactéria procarionte unicelular, aeróbia e não esporulada. Ensaio realizados por Philip J. A. Skipper (2022) revelam que espécies como *Bacillus cereus*, *Bacillus safensis*, *Micrococcus luteus* e *Micrococcus roseus* demonstram capacidade de formar biofilmes e induzir bioerosão, associados à dissolução de  $\text{CaCO}_3$ , conduzindo à biodeterioração de substratos pétreos (Silva *et al.*, 2024; Skipper *et al.*, 2022).



**Figura 5:** Aspeto macroscópico das colónias bacterianas de *Micrococcus* sp. (adaptado de Silva *et al.*, 2024)

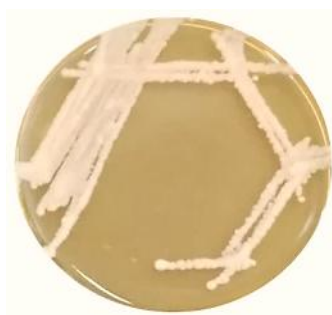
No estudo desenvolvido por Inês Silva em 2025, focado no Convento de Cristo, foram identificadas comunidades microbianas colonizadoras das superfícies pétreas, revelando o predomínio de fungos liquenizados, nomeadamente *Dirina*, *Xanthoria*, *Verrucaria*, *Cystocoleus* e *Purpureocillium* (**Figura 6**) (Silva *et al.*, 2025).



**Figura 6:** Janela do Convento de Cristo em Tomar, Portugal, com (a) e sem biocolonização (b) (Silva *et al.*, 2025)

Relativamente aos fungos, Sterflinger (2010) e Warscheid (2000) referem-se a estes como organismos heterotróficos que dependem de fontes externas de matéria orgânica, de modo que ambientes urbanos e industrializados são particularmente favoráveis ao seu crescimento devido à elevada disponibilidade de compostos orgânicos e poluição atmosférica (Sterflinger, 2010; Warscheid & Braams, 2000).

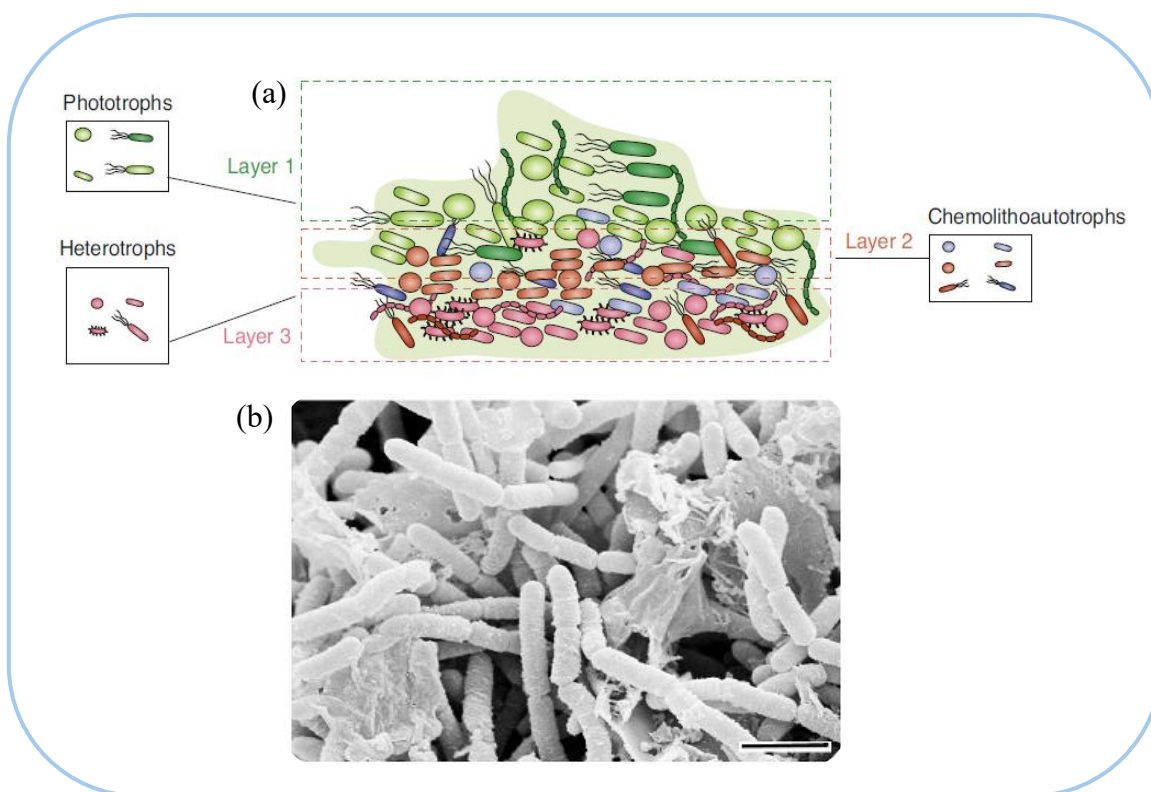
A *Saccharomyces* sp. (**Figura 7**) é uma levedura anaeróbia facultativa, capaz de realizar respiração aeróbia na presença de oxigénio e fermentação alcoólica em condições anaeróbias (Sterflinger, 2010; Warscheid & Braams, 2000). Embora a *Saccharomyces* sp. não seja tipicamente descrita como agente de biodeterioração de materiais pétreos, é selecionada neste estudo como organismo modelo representativo de fungos unicelulares. Esta levedura encontra-se amplamente caracterizada do ponto de vista genético, fisiológico e metabólico, sendo que a sua utilização permite estudar, de forma controlada e reprodutível, mecanismos celulares relevantes, nomeadamente respostas ao stress e interações com superfícies, que podem ser extrapoláveis para outros microrganismos com potencial impacto na degradação de pedra (Padilla-Garfias & Peña, 2026; Vanderwaeren et al., 2022).



**Figura 7:** Aspeto macroscópico de colónias bacterianas de *Saccharomyces* sp. (adaptado de Dias *et al.*, 2023)

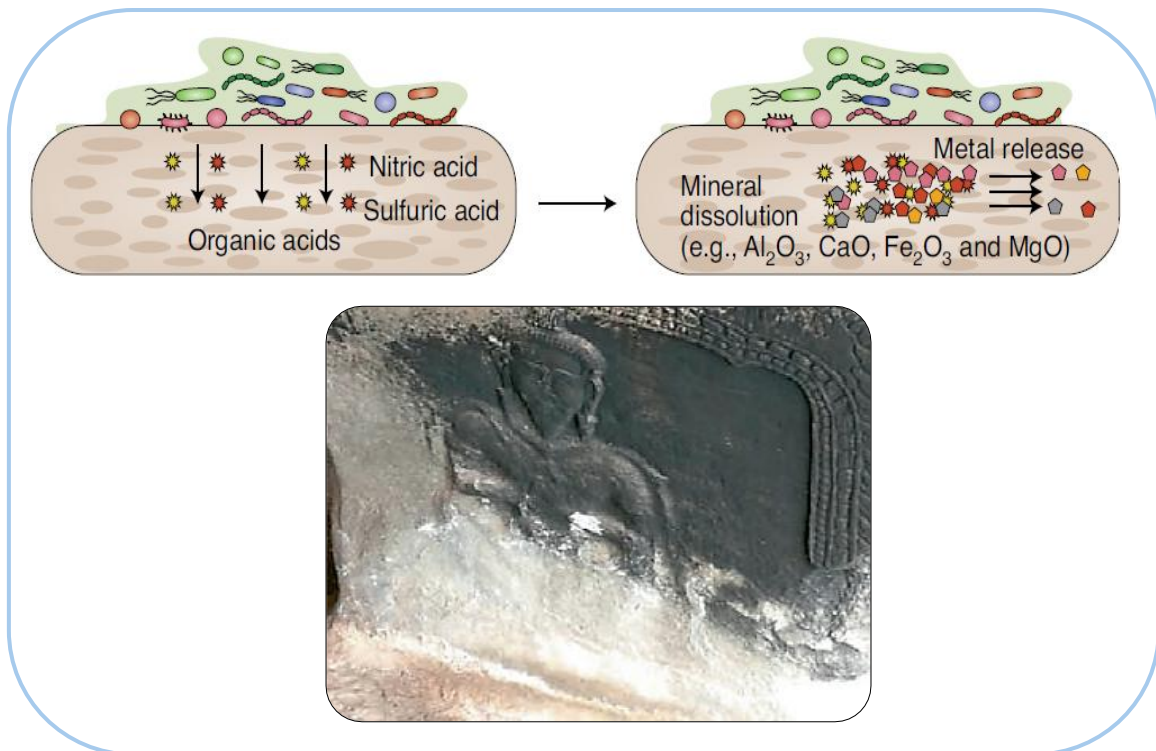
### 2.2.2. Mecanismos de Atividade Microbiana

É fundamental uma compreensão dos mecanismos envolvidos na biodeterioração microbiana, de modo a desenvolver métodos apropriados para a sua mitigação (Scheerer *et al.*, 2009). Um dos mecanismos centrais na biodeterioração da pedra, consiste no desenvolvimento de comunidades de células microbianas na superfície da pedra, os designados, biofilmes microbianos (**Figura 8**) (Ding *et al.*, 2020; X. Liu *et al.*, 2020). Estes promovem uma evidente alteração estética por descoloração da superfície da pedra devido a pigmentos orgânicos – como clorofilas e carotenoides, que por sua vez aumentam a absorção de radiação solar e promovem ciclos térmicos agressivos – denegrindo eventuais detalhes esculpidos e padrões naturais da própria pedra, como a sua cor e textura (Dias *et al.*, 2020a; Romani *et al.*, 2022; Vázquez-Nion *et al.*, 2018).



**Figura 8:** Estrutura de biofilme maduro na superfície de um substrato pétreo (a) (adaptado de Liu *et al.*, 2020). Micrografia de um biofilme maduro na superfície de uma rocha sob condições húmidas (b) (adaptado de Ding *et al.*, 2020)

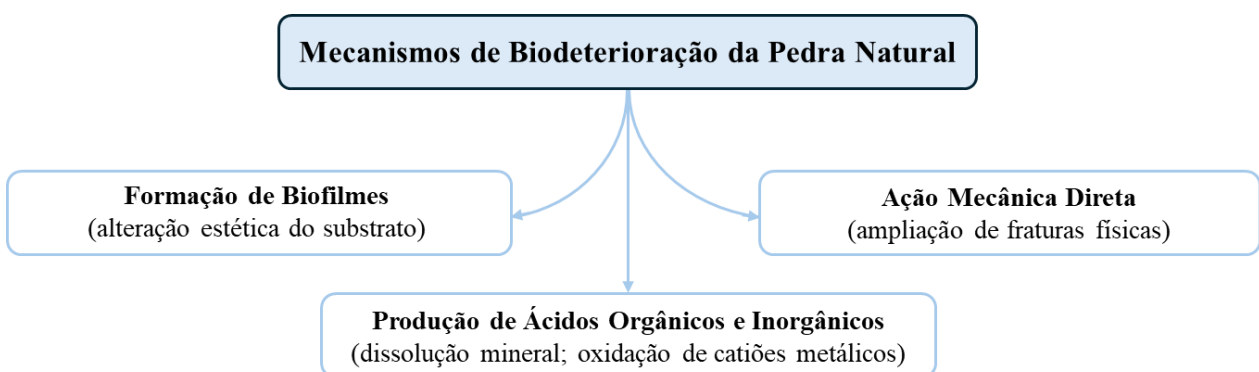
Com a formação de biofilmes, os microrganismos atacam o substrato como uma fonte de nutrição, onde este produz uma variedade de metabolitos que reagem quimicamente com a superfície da pedra estando diretamente ligados a processos bioquímicos, nomeadamente à produção de ácidos orgânicos (oxálico, cítrico, láctico, entre outros) e ácidos inorgânicos (sulfúrico, nítrico e carbónico) que dissolvem minerais, oxidam catiões metálicos (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) e desestabilizam a matriz pétreo contribuindo para a biocorrosão (**Figura 9**). A quantidade e o tipo de ácidos produzidos variam de acordo com as espécies (Celi *et al.*, 2025; Ilies *et al.*, 2023; X. Liu *et al.*, 2020).



**Figura 9:** Esquema de biocorrosão de ácidos na pedra e exemplo de uma coluna de pedra deteriorada por este processo bioquímico (adaptado de Liu *et al.*, 2020)

Outro mecanismo metabólico relevante é a ação mecânica direta dos microrganismos associada à penetração de hifas fúngicas e líquenes, por exemplo, que conduzem à ampliação de fraturas e aceleram a fragmentação física e erosão superficial (Ding *et al.*, 2020; X. Liu *et al.*, 2020).

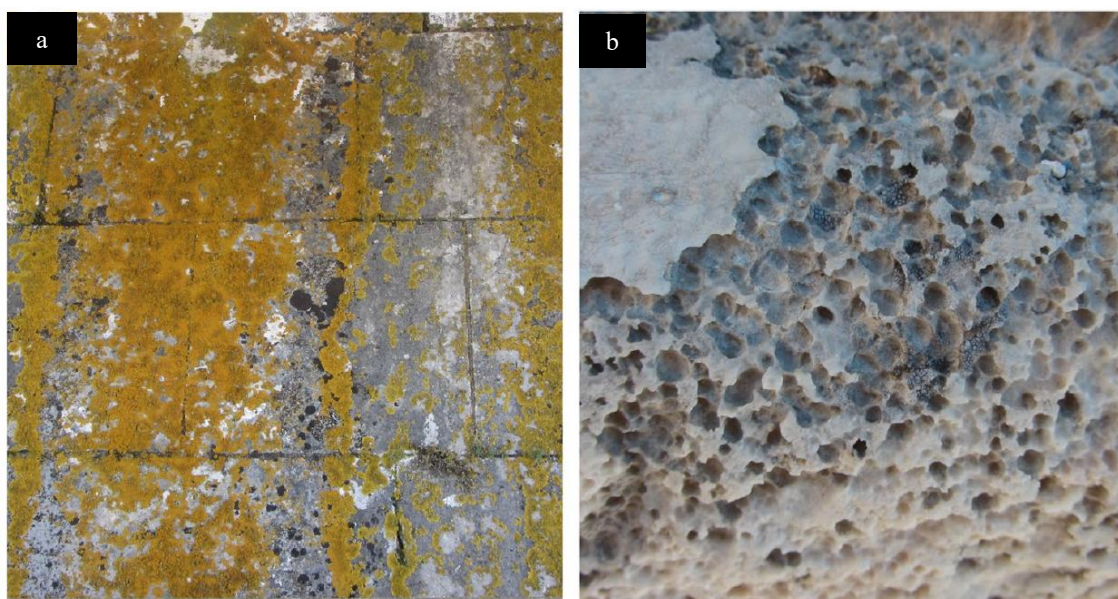
O esquema apresentado na **Figura 10** resume, de forma simplificada, os mecanismos de biodeterioração da Pedra Natural descritos anteriormente.



**Figura 10:** Mecanismos de biodeterioração da Pedra Natural

A suscetibilidade da pedra à colonização biológica, também designada por biorecetividade, depende de propriedades intrínsecas como a composição mineralógica, porosidade, rugosidade da superfície, características térmicas e mecânicas bem como de fatores ambientais externos, incluindo água, vento, temperatura, radiação ultravioleta e poluentes atmosféricos (Dias *et al.*, 2020b; Lee *et al.*, 2022; Stanaszek-Tomal, 2020). Áreas com maiores níveis de poluição atmosférica revelam-se particularmente propícias à colonização de superfícies pétreas, devido aos poluentes presentes no ar, como óxidos de azoto, hidrocarbonetos e outros provenientes de fontes naturais ou antropogénicas, funcionando como fonte de nutrientes e favorecendo o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (Gabriele *et al.*, 2023; Tiano, 2016).

Embora as manifestações visíveis da biodeterioração possam variar desde uma simples descoloração da superfície e formação de manchas escuras, também podem alcançar fenómenos mais severos como *biopitting*, que consiste na formação de pequenos poços rocha como resultado da bioerosão induzida por microrganismos e desintegração mineral (**Figura 11**) (Rodrigues, 2022; Guo, 2022; Ilies *et al.*, 2023).



**Figura 11:** Biocolonização (a) e *biopitting* (b) em superfícies de calcário aplicado no Mosteiro dos Jerónimos, Portugal (adaptado de Rodrigues, 2022)

Embora, até à data, os processos de biodeterioração não possam ser totalmente interrompidos, estes podem ser retardados com uma combinação de ações de prevenção, controlo e intervenção (Ilies *et al.*, 2023; Alves *et al.*, 2021; (Ledin *et al.*, 2011); X. Liu *et al.*, 2020). Uma das estratégias para alcançar esta prevenção envolve a aplicação de uma

camada protetora na superfície da pedra, que dificulte a adesão e o crescimento dos primeiros microrganismos colonizadores, minimizando simultaneamente a deposição de fonte de nutrição e a presença de água nestes materiais (Gaylarde & Baptista-Neto, 2021). Deste modo, prevenir a biocolonização constitui uma medida eficaz para evitar o início da biodeterioração.

### 2.2.3. Estratégias de Controlo de Biodeterioração

Perante a preocupação com os efeitos da colonização biológica em substratos pétreos históricos, têm sido desenvolvidos estudos sobre os principais agentes microbiológicos envolvidos, nomeadamente bactérias e fungos (Campostrini *et al.*, 2025; Celi *et al.*, 2025; Sterflinger & Piñar, 2013). Estes microrganismos tendem a formar biofilmes estruturados que, pela sua elevada capacidade de adaptação às condições ambientais, constituem fatores determinantes na degradação de materiais pétreos de valor histórico (Cappitelli *et al.*, 2020). Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias preventivas, sustentáveis e eficazes, orientadas para a mitigação da biodeterioração, é fundamental para a conservação do património cultural (Celi *et al.*, 2025; Joseph *et al.*, 2021).

A conservação do património cultural face à ação microbiana requer a aplicação de técnicas para a remoção e prevenção de microrganismos indesejados. Para esse fim, atualmente existem diversas estratégias de controlo da biodeterioração em materiais pétreos, as quais se agrupam em três grandes categorias: métodos biológicos, físicos e químicos. Cada abordagem apresenta características distintas quanto à eficácia, compatibilidade com os materiais e impacto ambiental, sendo selecionada em função das condições específicas de cada intervenção (Cappitelli *et al.*, 2020; Celi *et al.*, 2025).

Nesta secção, as estratégias de controlo de biodeterioração serão abordadas segundo três principais métodos: biológicos, físicos e químicos.

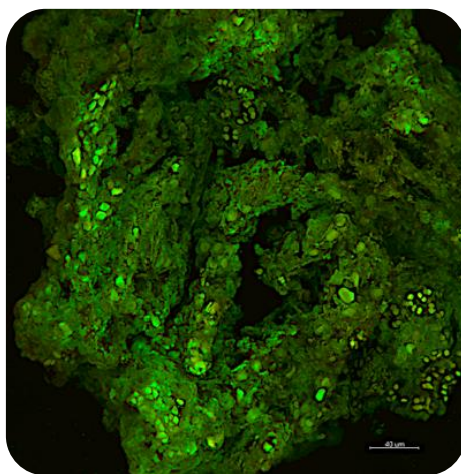
#### **Métodos Biológicos**

- Compostos naturais com ação biocida: baseiam-se na utilização de óleos essenciais e extratos vegetais, como *Ocimum basilicum* (manjeriço), reconhecido pelas suas propriedades antimicrobianas e baixo impacto ambiental. A encapsulação destes extratos em suportes como sílica mesoporosa permite uma libertação controlada e prolongada. Apesar do seu carácter ecológico e biocompatível, é um método dispendioso,

a composição varia consoante fatores ambientais e a interação com materiais patrimoniais ainda é pouco estudada (Trovão & Portugal, 2023).

### Métodos Físicos

- Remoção mecânica: realizada com recurso a escovas, espátulas ou jatos de água; é um método rápido e não tóxico, permitindo a rutura mecânica do biofilme, levando à dispersão dos microrganismos. Contudo pode comprometer a integridade de superfícies mais frágeis e favorecer a migração destes para o interior da pedra (Cappitelli *et al.*, 2020).



**Figura 12:** Biofilme a desenvolver-se numa superfície de mármore após limpeza química combinada com um tratamento mecânico (escovagem). A presença de material intracelular (manchas verdes) indica que algumas células mortas não foram totalmente removidas do mármore após o tratamento de limpeza (adaptado de Cappitelli *et al.*, 2020)

- Radiação UV-C: utilizada para eliminar organismos fototróficos; é considerada segura e não deixa resíduos. No entanto, apresenta baixa capacidade de penetração, requer aplicações repetidas e pode ocorrer resistência microbiana (Cappitelli *et al.*, 2020).

- Limpeza a laser (Nd:YAG, Er:YAG, UV 355–532 nm): técnica sem contacto direto, que altera a estrutura celular dos microrganismos por aquecimento, e é ambientalmente segura. Apesar das suas vantagens, ao provocar aquecimento localizado pode aumentar a porosidade do substrato, favorecer alterações cromáticas quando mal calibrada, é uma técnica dispendiosa e surgem dificuldades em eliminar partes incrustadas do biofilme (Cappitelli *et al.*, 2020).

- Choque térmico, micro-ondas e gelo seco: métodos que promovem a inativação microbiana por desnaturação proteica. Apesar da sua eficácia, apresentam limitações em termos de portabilidade e podem provocar microfissuras nos materiais tratados (Cappitelli *et al.*, 2020).

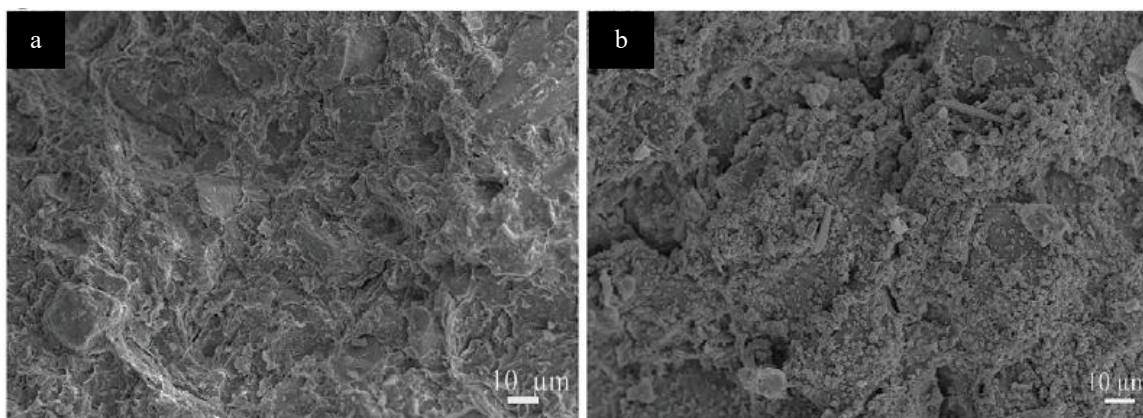
### Métodos Químicos

Os revestimentos antimicrobianos apresentam-se como estratégia na conservação preventiva de materiais patrimoniais, atuando diretamente na inibição da proliferação microbiana e na mitigação dos efeitos da biodeterioração (Zand *et al.*, 2022). A sua aplicação sobre os substratos visa não só prevenir a adesão microbiana, como também reduzir a carga biológica existente, contribuindo para a preservação da integridade estética e estrutural dos materiais pétreos (Mu *et al.*, 2021; Trovão & Portugal, 2023).

De acordo com a literatura consultada e publicada em revistas da área, atualmente podem encontrar-se as seguintes classes de revestimentos antimicrobianos tradicionalmente utilizados para proteção pátrea:

- Biocidas tradicionais: como *Biotin R* e *Preventol R80* apresentam eficácia variável consoante a espécie microbiana e das características do local de aplicação. Estes contêm sais de amónio quaternário, que destroem as membranas celulares dos microrganismos, levando à morte microbiana. Têm a vantagem de ser de fácil aplicação, baixo custo e ação antimicrobiana eficaz. Todavia, apresentam elevada toxicidade ambiental, curto efeito exigindo reaplicações frequentes e podem ter impacto negativo sobre os materiais patrimoniais (Trovão & Portugal, 2023).

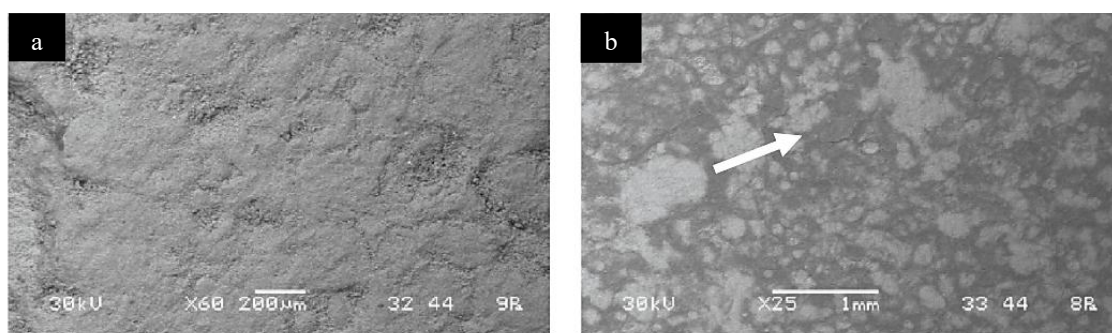
- Revestimentos à base de nanopartículas metálicas (Ag, Cu, ZnO, TiO<sub>2</sub>, MgO) e nanocompósitos (AgCl/ZnO): revestimentos protetores altamente eficientes na inibição de bactérias e fungos, atuando por rutura das membranas celulares e interferência nos processos metabólicos, induzindo a morte microbiana. Contudo, existem preocupações quanto ao custo, toxicidade ambiental e escassez de estudos que comprovem a sua durabilidade em contexto patrimonial (Mu *et al.*, 2021; Valenzuela *et al.*, 2020).



**Figura 13:** Imagens microscopia eletrónica de varrimento (SEM) de pedra calcário não tratada (a) e pedra calcário tratada com AgCl/ZnO (b) (adaptado de Mu *et al.*, 2021)

Por observação da **Figura 13**, o revestimento dos nanocompósitos AgCl/ZnO estão densamente dispersos na superfície da pedra de calcário, formando uma camada protetora que impede a colonização microbiana invasiva.

- Biopolímeros: como o quitosano, são soluções mais sustentáveis e economicamente viáveis para o controlo microbiano. Este biopolímero rompe as membranas microbianas em contato direto, promove a libertação do conteúdo intracelular, levando à lise microbiana. No entanto, apesar do seu potencial ecológico, apresentam limitações quanto à durabilidade em condições ambientais adversas, como exposição à radiação UV, humidade e variações térmicas, podendo por vezes causar descoloração em substratos pétreos, conforme ilustrado na **Figura 14** (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2024).



**Figura 14:** Imagens de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) da pedra calcário sem revestimento (a) e com revestimento (b) de CHGCA-TPP-a (quitosano-glicerol-ácido cítrico-tripolifosfato de sódio). A seta indica os fragmentos do revestimento aplicado (adaptado de Silva *et al.*, 2024)

#### 2.2.4. Ação da Água na Pedra Natural

As condições necessárias para ocorrer colonização biológica variam consoante a espécie do organismo envolvido e da porosidade dos substratos, porém a água é reconhecida como o agente externo mais prejudicial e comum na deterioração de monumentos pétreos, sendo também o principal fator que favorece o crescimento microbiano (Fermo *et al.*, 2014). A quantidade e disponibilidade de água, determinam a velocidade à qual uma superfície é colonizada, sendo por isso que a maioria dos tratamentos para a prevenção da biodeterioração tem por fim reduzir este fator (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018; Gabriele *et al.*, 2023).

Em ambientes com elevada humidade, precipitação atmosférica, condensação superficial, ascensão por capilaridade e exposição à luz, os microrganismos proliferam com facilidade nas superfícies pétreas, intensificando os processos de biodegradação

(Gabriele *et al.*, 2023). Devido à sua estrutura porosa, a pedra permite a penetração de água, a qual desencadeia alterações físicas, químicas e estéticas, através de reações químicas, ciclos de congelamento-descongelamento e recristalização de sais à superfície (eflorescência) como se observa na **Figura 15** (Alves *et al.*, 2021; Benavente *et al.*, 2021).



**Figura 15:** Eflorescências salinas e efeitos erosivos em pedras graníticas numa estrutura histórica na cidade de Chaves, Portugal (adaptado de Alves *et al.*, 2021)

A água também atua como veículo para a dissolução e transporte de sais solúveis no interior da matriz pétreo. Estes sais, ao cristalizarem nos poros, provocam tensões internas provocando reações corrosivas localizadas, contribuindo para a sua fratura e fragmentação (Ding *et al.*, 2020). Este fenómeno é agravado pela presença de fontes de humidade como a chuva, a humidade relativa do ar e a ascensão capilar a partir do solo, que potenciam a lixiviação de elementos minerais e promovem o inchaço e posterior erosão das superfícies, limitando assim a durabilidade ao longo do tempo (Alves *et al.*, 2021; Gabriele *et al.*, 2023).

Os processos de deterioração da pedra induzidos pela água são ainda intensificados pela poluição atmosférica e pela atividade microbiológica, levando a alterações estéticas visíveis, como a perda de cor e o escurecimento da superfície, conforme mencionado anteriormente (Ilies *et al.*, 2023). Assim, como na ausência de água o crescimento microbiano é dificultado, desenvolver revestimentos antimicrobianos e hidrofóbicos representa uma estratégia promissora para mitigar os efeitos da degradação e salvaguardar a integridade da Pedra Natural (Hashim *et al.*, 2024; Romani *et al.*, 2022).

### 2.2.5. Estratégias de Controlo de Deterioração por Ação da Água

Desde a Antiguidade, têm sido aplicados diversos compostos hidrofóbicos de origem natural, como óleos (azeite), resinas, ceras e claras de ovo, com o intuito de proteger superfícies pétreas da ação da água (Pamplona *et al.*, 2007). Contudo, estes materiais revelaram limitações consideráveis, sobretudo ao nível da durabilidade, estabilidade química e reversibilidade dos tratamentos, o que impulsionou o desenvolvimento de formulações mais eficazes baseadas em polímeros naturais e sintéticos com propriedades adicionais, como a autolimpeza e a proteção UV (Gabriele *et al.*, 2023).

Os revestimentos hidrofóbicos atuam como barreiras protetoras aplicadas sobre os materiais pétreos, impedindo a infiltração da água e de substâncias nela dissolvidas, não eliminando microrganismos, mas prevenindo a sua adesão (Gabriele *et al.*, 2023). Estes revestimentos ao reduzirem a hidrofobicidade e a retenção de água nas superfícies, diminuem significativamente a biorecetividade e, conseqüentemente, a adesão microbiana e a formação de biofilmes (Guo, 2022).

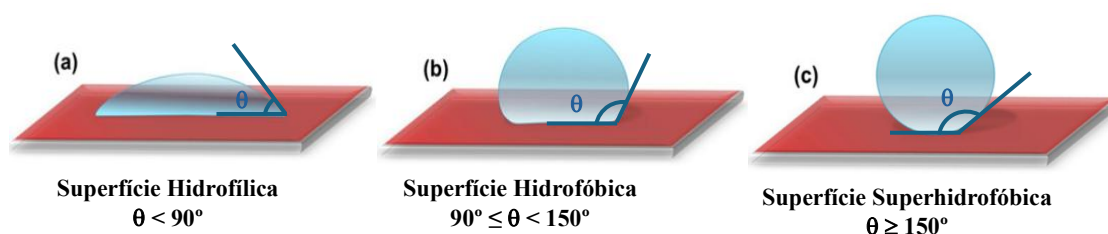
O fenómeno de hidrofobicidade está associado à baixa energia livre de superfície do sólido, a qual não é suficiente para romper as ligações intermoleculares entre as moléculas de água, nomeadamente as ligações de hidrogénio, responsáveis pela elevada tensão superficial da água. Conseqüentemente, a interação água-sólido é energeticamente desfavorável, prevalecendo as forças de coesão no interior da gota, o que resulta em ângulos de contacto elevados e no escoamento da água sobre a superfície. A presença de rugosidade superficial pode intensificar este comportamento hidrofóbico, ao reduzir a área efetiva de contacto entre a gota de água e o substrato sólido (Romani *et al.*, 2022).

Este princípio, inspirado pela natureza, deu origem ao conceito de superfícies hidrofóbicas e superhidrofóbicas (Jafari *et al.*, 2013; Latthe *et al.*, 2014). As folhas de lótus são um dos exemplos mais famosos de superfícies superhidrofóbicas naturais, e as suas propriedades repelentes à água são conhecidas como "efeito lótus". A elevada hidrofobicidade da superfície desta planta é atribuída aos efeitos combinados dos micro e nanorelevos superficiais das suas folhas (**Figura 16**) (Collins & Safiuddin, 2022; Guo, 2022; Karapanagiotis & Manoudis, 2022).



**Figura 16:** Gota de água sobre uma folha de lótus e estrutura de superfície correspondente (adaptado de Guo, 2022)

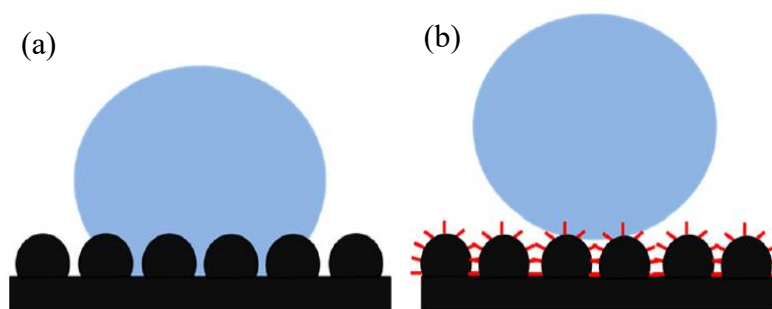
Com base na forma como a gota de água interage com uma superfície sólida, a superfície pode ser categorizada como hidrofílica, hidrofóbica ou superhidrofóbica, de acordo com o ângulo de contacto ( $\theta$ ) estático que se verifica entre uma gota de água e a superfície (Collins & Safiuddin, 2022; Latthe *et al.*, 2014). Uma superfície é considerada hidrofílica quando o  $\theta$  com a água é inferior a  $90^\circ$  (**Figura 17a**), hidrofóbica quando o  $\theta$  se compreende entre  $90^\circ$  e  $150^\circ$  (**Figura 17b**) e superhidrofóbica, quando o ângulo de contacto é superior a  $150^\circ$  (**Figura 17c**).



**Figura 17:** Esquema de superfície hidrofílica (a), hidrofóbica (b) e superhidrofóbica (c) (adaptado de Latthe *et al.*, 2014)

Para aplicações de revestimentos hidrofóbicos na pedra, pretende-se atingir valores de ângulos de contacto superiores a  $90^\circ$ , e idealmente superiores a  $150^\circ$  na superfície tratada. Ao aumentar a tensão interfacial sólido-líquido, as substâncias hidrofóbicas limitam a permeabilidade e reduzem a penetração de água líquida na matriz mineral (Karapanagiotis & Manoudis, 2022; Latthe *et al.*, 2014).

Os modelos de Wenzel e Cassie–Baxter, ilustrados na **Figura 18**, são referidos na literatura para explicar a relação entre a rugosidade superficial e o comportamento hidrofóbico das superfícies (Cao *et al.*, 2020; Latthe *et al.*, 2014).



**Figura 18:** Representação esquemática do comportamento de uma gota de água numa superfície rugosa em estado de Wenzel (a) e estado de Cassie-Baxter (b) (adaptado de Latthe *et al.*, 2014)

A **Figura 18a** corresponde ao modelo proposto por Wenzel, em que a gota de água permanece em contacto total com a estrutura rugosa da superfície e assume que o aumento da rugosidade intensifica o comportamento da superfície, isto é, superfícies hidrofóbicas tornam-se mais hidrofóbicas, enquanto superfícies hidrofílicas se tornam mais hidrofílicas. Contudo, este modelo revela limitações na descrição de superfícies com estruturas de dupla escala e, portanto, o modelo de Cassie-Baxter foi proposto (Cao *et al.*, 2020; Latthe *et al.*, 2014).

Por observação da **Figura 18b**, verifica-se que no modelo de Cassie-Baxter, a gota de água assenta sobre as irregularidades de uma superfície rugosa, ficando ar retido nos espaços vazios entre essas irregularidades. A presença destas bolsas de ar reduz o contacto direto entre a água e o sólido, originando uma interface composta por sólido, líquido e ar. Esta diminuição da área de contacto torna a adesão da água à superfície energeticamente menos favorável, conduzindo a ângulos de contacto mais elevados e, conseqüentemente, a um comportamento hidrofóbico mais pronunciado (Cao *et al.*, 2020; Latthe *et al.*, 2014).

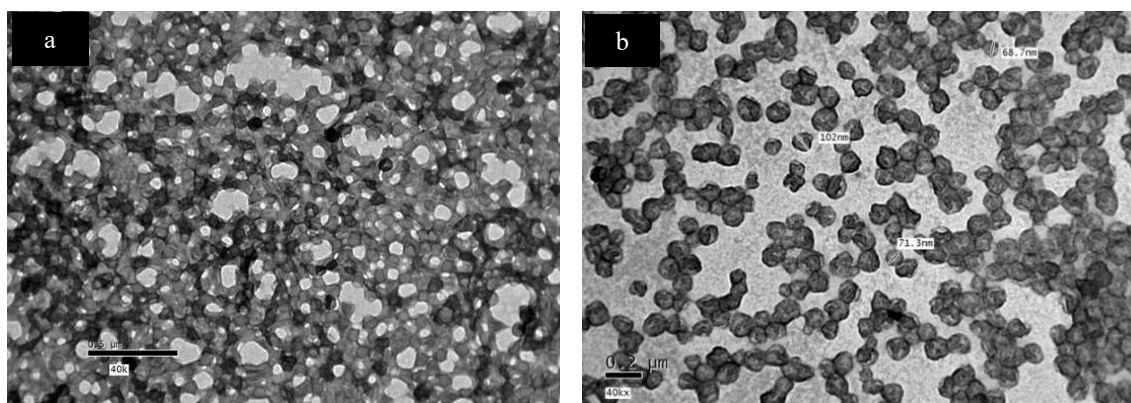
Neste sentido, um revestimento hidrofóbico ideal para ser eficaz deve combinar repelência à água, boa adesão ao substrato, resistência ao desgaste e reduzir a permeabilidade da pedra, mas sem comprometer a sua permeabilidade original ao vapor de água, permitindo o reequilíbrio do teor de humidade de acordo com as condições ambientais (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018). Os revestimentos devem assim aderir aos materiais porosos, mas evitar a formação de uma fina camada depositada nas suas superfícies que dificultem as trocas naturais de vapor de água entre a pedra e o ambiente (Gabriele *et al.*, 2023).

De acordo com a literatura consultada e publicada em revistas da área, podem encontrar-se as seguintes classes de revestimentos hidrofóbicos tradicionalmente utilizados para proteção pétrea:

- Alcoxissiloxanos: polímeros à base de silício que possuem boa estabilidade química devido à elevada resistência da ligação Si-O, baixa energia superficial e boa resistência ao stress térmico. Contudo, podem induzir alterações cromáticas, apresentar durabilidade limitada e não são suficientemente eficientes se não forem combinados com outros tipos de tratamentos (Gabriele *et al.*, 2023).

- Acrílicos: polímeros como o Paraloid B72 e B44 empregues há muito tempo como revestimentos protetores para obras de arte em pedra ao ar livre. No entanto, a sua vulnerabilidade à foto-oxidação leva à diminuição da eficácia hidrofóbica e conseqüentemente ao envelhecimento prematuro (Ibrahim *et al.*, 2021; Vinçotte *et al.*, 2019).

- Materiais híbridos: sistemas que combinam nanoóxidos inorgânicos (como SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) com polímeros orgânicos, proporcionando elevada adesão, propriedades fotocatalíticas e comportamento superhidrofóbico. Apesar do seu desempenho inicial promissor, tendem a sofrer perda de eficácia com o envelhecimento (Costa *et al.*, 2016; Ibrahim *et al.*, 2021).



**Figura 19:** Micrografias TEM (microscopia eletrônica de transmissão) de nanocompósitos poliméricos. Dispersão homogênea de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> com Paraloid B72 (a) e dispersão homogênea de nanopartículas de ZnO com Paraloid B72 (b) (adaptado de Ibrahim *et al.*, 2021)

- Fluoropolímeros: apresentam elevada repelência à água, mas são dispendiosos e prejudiciais para o ambiente devido à sua toxicidade, bioacumulação e persistência no ambiente, sendo classificados como *forever chemicals* devido à presença de flúor (substâncias perfluoroalquiladas, PFAS) (Takayanagi & Yamabe, 2000).

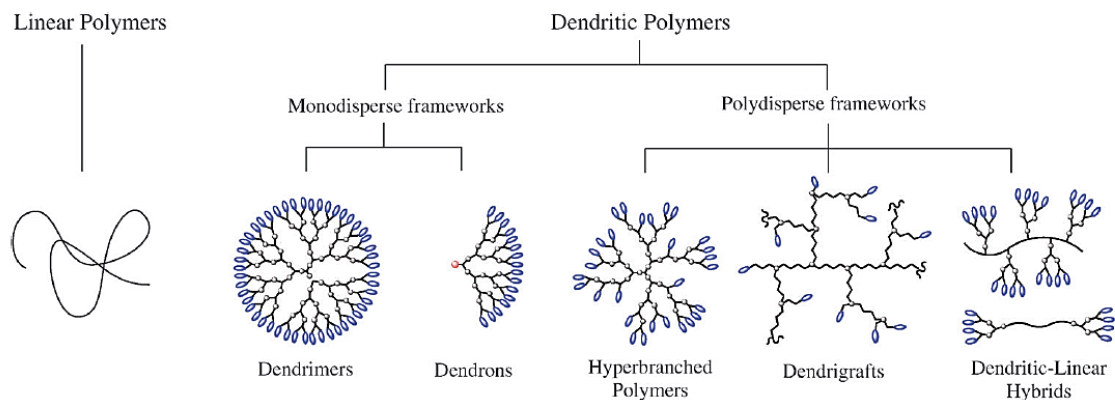
É possível verificar que apesar dos revestimentos antimicrobianos e hidrofóbicos que existem atualmente, serem eficazes, apresentam desafios e desvantagens, expondo riscos significativos para a saúde humana e para o meio ambiente (toxicidade e bioacumulação), bem como para a integridade da Pedra Natural (Fidanza & Caneva, 2019). Estas limitações têm impulsionado a comunidade científica a desenvolver alternativas aos tratamentos tradicionais, que sejam simultaneamente eficazes, duráveis e compatíveis com os substratos pétreos, assegurando mitigar os efeitos da degradação induzida pelos microrganismos, sem comprometer as propriedades estéticas, físico-químicas e estruturais da Pedra Natural. (Cappitelli *et al.*, 2020; Fidanza & Caneva, 2019).

O desenvolvimento de novos produtos que possam constituir uma alternativa aos revestimentos atuais têm de atender a um conjunto de características relevantes. De acordo com as Normas Europeias de Conservação (EN 16581:2014), os revestimentos destinados à pedra devem cumprir requisitos fundamentais, tais como: reduzir a absorção de água líquida, manter a permeabilidade do substrato ao vapor de água, preservar a aparência original (cor e o brilho) e assegurar as propriedades físicas e químicas da pedra (Hashim *et al.*, 2024). Adicionalmente, estes revestimentos devem ser económicos e ambientalmente sustentáveis, evitando produzir subprodutos nocivos prejudiciais para os seres humanos e para o meio ambiente (Fermo *et al.*, 2014; Gabriele *et al.*, 2023) (Silva *et al.*, 2024).

### 2.3. Polímeros Dendríticos

Neste sentido, surge uma tecnologia de revestimento e proteção inovadora: sistemas supramoleculares dendríticos. Esta nova abordagem procura aliar eficácia antimicrobiana, hidrofóbica, durabilidade, compatibilidade e sustentabilidade ambiental (*eco-friendly coatings*), apresentando-se como uma alternativa promissora para a conservação preventiva de superfícies pétreas (Hashim *et al.*, 2024; Romani *et al.*, 2022).

As estruturas dendríticas podem ser classificadas em dendrímeros monodispersos e polidispersos, sendo o presente estudo centrado nos polímeros monodispersos, especificamente nos dendrões (**Figura 20**) (Walter & Malkoch, 2012).

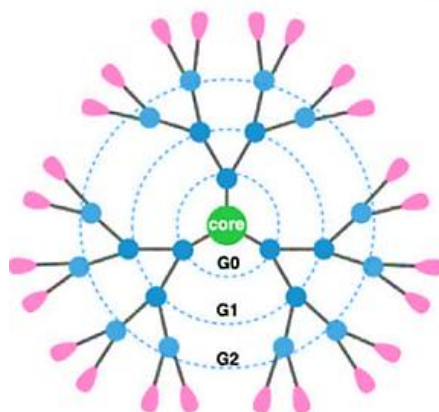


**Figura 20:** Esquema de subclasses de polímeros dendríticos (adaptado de Walter & Malkoch, 2012)

O termo “dendrímero” tem origem nas palavras gregas *dendron* e *mer*, que significa semelhante a uma árvore e parte ou unidade, respetivamente. Este termo foi aplicado por químicos para descrever moléculas com características semelhantes a árvores em estrutura e aparência, apresentando também uma simetria estrutural tridimensional (Căta *et al.*, 2023; Lyu *et al.*, 2019; Patel & Patel, 2013).

Deste modo, os dendrímeros são macromoléculas sintéticas esféricas, monodispersas, altamente ramificadas e polifuncionais, constituídas por unidades repetitivas de ramificações designadas gerações, quimicamente ligadas entre si por um processo arborescente em torno de um núcleo central multifuncional. Estas ramificações proporcionam uma vasta área superficial e um grande número de grupos funcionais na periferia ( Căta *et al.*, 2023; Lyu *et al.*, 2019).

Estes polímeros possuem uma estrutura ramificada regular e definida constituída por três partes distintas: um núcleo central onde se inicia o crescimento do dendrímero, corresponde à geração 0 (G0); unidades de ramificação repetitivas, que permitem o crescimento do dendrímero em camadas radiais geometricamente organizadas; e numerosas funcionalidades terminais expostas na superfície anexadas às gerações mais externas (**Figura 21**) (Lyu *et al.*, 2019; Ya-Ting Huang *et al.*, 2023).



**Figura 21:** Representação de um dendrímero composto por um núcleo central, unidades de ramificação repetitivas (gerações) e grupos terminais na superfície (adaptado de Ya-Ting Huang *et al.*, 2023)

### 2.3.1. Características e Propriedades dos Dendrímeros e Dendrões

Os dendrímeros, em virtude da sua estrutura globular e multifuncional, constituem blocos de construção moleculares promissores para o desenvolvimento de revestimentos inovadores aplicados à conservação do património pétreo. Por sua vez, os dendrões correspondem a *fragmentos* de dendrímeros, ou seja, a unidades ramificadas incompletas, que crescem a partir de um ponto focal único, de modo que possuem uma arquitetura ramificada em gerações sucessivas, mas não formam uma estrutura tridimensional fechada (**Figura 20**) (Walter & Malkoch, 2012). As propriedades estruturais facilmente controláveis, como o tamanho, forma, grau de ramificação e funcionalização da superfície, permitem adaptar os polímeros às necessidades específicas de substratos distintos, assegurando compatibilidade química e eficácia hidrofóbica (Lyu *et al.*, 2019; Patel & Patel, 2013; Ya-Ting Huang *et al.*, 2023).

As características estruturais dos dendrões são únicas, pois incluem o seu tamanho nanoscópico e uniforme, superfície esférica, elevado grau de ramificação, cavidades internas disponíveis, para além de propriedades físico-químicas interessantes, como baixa viscosidade, elevada reatividade e multiplicidade de grupos finais que podem ser funcionalizados quimicamente, provando serem polímeros muito versáteis e aplicáveis (Chabre & Roy, 2010; Moura *et al.*, 2017).

Posto isto, como resultado da periferia multifuncional, os dendrões apresentam uma ampla gama de aplicações em diferentes campos de estudo, desde materiais interfaciais formados a partir de dendrões anfipáticos, aplicações biomédicas (membranas responsivas a estímulos externos e sistemas de encapsulação de medicamentos),

revestimentos (*coatings*) e retardantes de chama (Căta *et al.*, 2023; Lyu *et al.*, 2019; Patel & Patel, 2013; Ya-Ting Huang *et al.*, 2023). Os polímeros dendríticos também podem fornecer propriedades repelentes à água e melhorar a adesão na superfície. A multifuncionalidade da periferia molecular possibilita ainda a introdução de propriedades, como capacidade antimicrobiana e autolimpeza, aspetos essenciais na proteção de superfícies expostas a ambientes agressivos (Ledin *et al.*, 2011; Sarode & Mahajan, 2024; Walter & Malkoch, 2012).

Os dendrões, assim como os dendrímeros, são a classe de polímeros dendríticos que podem ser construídos com uma estrutura molecular bem definida, isto é, serem monodispersos, ao contrário dos polímeros lineares. Esta monodispersidade oferece aos investigadores a possibilidade de trabalhar com uma ferramenta para tamanhos escaláveis bem definidos (Nanjwade *et al.*, 2009; Walter & Malkoch, 2012). A arquitetura dendrítica altamente ramificada faz com que as moléculas adotem conformações globulares tridimensionais para minimizar a sua energia livre, com um efeito imediato nas propriedades macromoleculares (Sarode & Mahajan, 2024).

Entre os dendrímeros mais comuns e estudados destacam-se os poli(amidoamina) (PAMAM), amplamente aplicados em sistemas de libertação controlada e atividade antimicrobiana; os poli(propilenimina) (PPI), conhecidos pela sua elevada densidade de grupos amina superficiais; e os poligliceróis (PGP), que apresentam elevada biocompatibilidade e estabilidade química (Abbasi *et al.*, 2014; Svenson & Tomalia, 2005). Estes sistemas têm sido extensivamente investigados devido à sua versatilidade estrutural e à possibilidade de modificação química dos seus grupos terminais, permitindo a sua adaptação a diferentes aplicações (Abbasi *et al.*, 2014; Svenson & Tomalia, 2005).

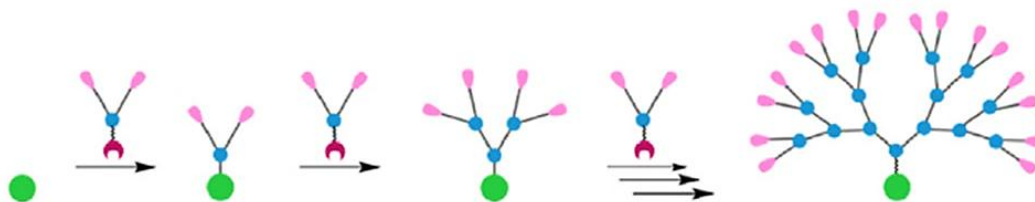
### 2.3.2. Estratégias de Síntese Química

Os dendrões são construídos por meio de síntese gradual, o que os dota de estruturas bem controladas (Lyu *et al.*, 2019). A síntese de dendrões pode ser alcançada usando abordagens divergentes, convergentes ou uma combinação de ambas (Lyu *et al.*, 2019; Walter & Malkoch, 2012).

#### - Síntese Divergente

Na síntese divergente (**Figura 22**), o dendrão é construído a partir do núcleo e desenvolve-se para a periferia, envolvendo duas etapas: ativação dos grupos funcionais terminais e a adição de unidades monoméricas ramificadas, resultando na formação de

uma primeira camada de estrutura dendrítica. No processo de extensão do núcleo, essa camada é ativada (desprotegida), resultando na primeira geração de dendrões. A segunda geração é produzida pela adição de um monômero a uma molécula sintetizada na etapa anterior (Ya-Ting Huang *et al.*, 2023). A repetição destas reações resulta numa estrutura tridimensional densa com um grande número de grupos funcionais nas extremidades, podendo ser sintetizados até à geração 10 ou superiores (Sarode & Mahajan, 2024; Sowinska & Urbanczyk-Lipkowska, 2014).

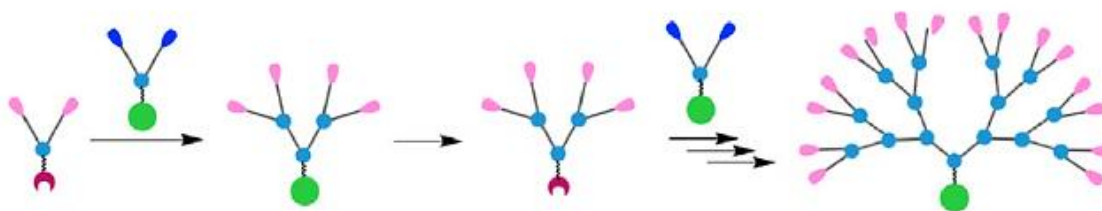


**Figura 22:** Ilustração da síntese divergente de dendrões (adaptado de Ya-Ting Huang *et al.*, 2023)

No entanto, defeitos estruturais são uma preocupação crítica para a síntese de dendrões de elevada geração, uma vez que surgem inevitavelmente de reações incompletas ou reações secundárias que ocorrem devido ao número crescente de reações à medida que a complexidade do dendrão aumenta (Ya-Ting Huang *et al.*, 2023).

### - Síntese Convergente

Na síntese de dendrões pelo método convergente (**Figura 23**), a reação tem início no grupo funcional terminal e desenrola-se até ao núcleo central do dendrão, envolvendo duas etapas: ligação dos grupos funcionais mais externos a uma geração interna e a ligação das gerações internas ao núcleo (Ya-Ting Huang *et al.*, 2023). Como o método convergente permite construir o polímero da periferia para o núcleo, então o número de reações de acoplamento necessárias para adicionar uma nova geração, usualmente 2 ou 3, é constante, reduzindo drasticamente a quantidade de produtos indesejáveis (Sowinska & Urbanczyk-Lipkowska, 2014).



**Figura 23:** Ilustração da síntese convergente de dendrões (adaptado de Ya-Ting Huang *et al.*, 2023)

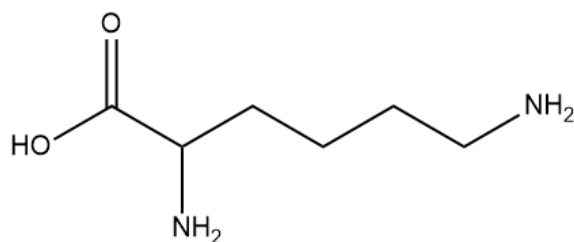
Os polímeros preparados pelo método convergente são mais homogêneos em comparação com os obtidos pelo método divergente, dado que este último tende a acumular defeitos estruturais em gerações superiores. A síntese convergente, por sua vez, oferece um controle mais preciso sobre as ramificações e grupos funcionais, reduzindo ou suprimindo tais defeitos (Chabre & Roy, 2010).

Para além disto, esta abordagem facilita a purificação, uma vez que as impurezas ou ramos de cadeias incompletas podem ser eliminados ao longo das diferentes etapas do processo, resultando em dendrões finais mais monodispersos (Lyu *et al.*, 2019; Sarode & Mahajan, 2024). A possibilidade de proceder à purificação em cada etapa da síntese constitui assim uma das principais vantagens do processo convergente, originando produtos mais homogêneos e com propriedades físico-químicas bem definidas (Lyu *et al.*, 2019).

Contudo, a síntese de grandes gerações de dendrões é limitada por este método, devido ao impedimento estereoquímico durante as reações do núcleo com as periferias, à medida que a geração de dendrões aumenta. Consequentemente os rendimentos e eficiência das reações caem abruptamente (Sarode & Mahajan, 2024; Walter & Malkoch, 2012). Portanto, apenas dendrões de baixa ordem de geração podem ser preparados com sucesso usando o método convergente pelo que no presente estudo aplicar-se-á o método convergente.

Na síntese de dendrões, a seleção de um núcleo inicial é muito importante, uma vez que é a unidade básica da qual o tamanho, a forma e a multiplicidade do dendrão dependerão. As funções químicas presentes no núcleo influenciam todo o processo de construção da molécula e a sua funcionalidade final (Sarode & Mahajan, 2024).

Uma estratégia promissora em bioquímica e química orgânica consiste na utilização de aminoácidos e ácidos gordos como blocos de construção, dada a sua abundância, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Entre estes, destaca-se a L-lisina (**Figura 24**) por possuir dois grupos amina reativos – um na cadeia lateral e outro no carbono alfa – permitindo a síntese de estruturas ramificadas pela ligação de várias camadas de monómeros, sendo esta uma característica essencial na síntese convergente de dendrões.



**Figura 24:** Estrutura química da L-lisina (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Esta molécula, em conjunto com ácidos gordos, pode facilitar a introdução de funcionalidades específicas, como a hidrofobicidade. Nesse contexto, podem ser sintetizados dendrões baseados em L-lisina e ácidos gordos, permitindo potencialmente a combinação de propriedades hidrofílicas com as características hidrofóbicas dos ácidos gordos.

Este tipo de sistemas pode revelar-se particularmente interessante para aplicações em revestimentos de Pedra Natural, uma vez que poderá permitir o ajuste das propriedades superficiais e melhorar o desempenho dos revestimentos protetores, nomeadamente ao nível da aderência, durabilidade e resistência.

### **CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL**

---

*Dividir cada dificuldade em tantas partes quantas forem necessárias para melhor a resolver.*

*– René Descartes*

### 3.1. Materiais e Métodos

No presente trabalho de investigação, todos os reagentes e solventes foram utilizados conforme recebidos, sem recurso a processos adicionais de purificação ou de secagem.

A cromatografia em camada fina (TLC) foi realizada em placas de alumínio revestidas com Kieselgel 60 F254 (Merck). As eluições foram efetuadas com os eluentes adequados, e a deteção dos compostos decorreu numa câmara de radiação ultravioleta (254 e 365 nm), que permite observar a fluorescência de compostos contendo ligações duplas, triplas e anéis aromático, com o auxílio de uma solução de ácido fosfomolibdico (revelador universal).

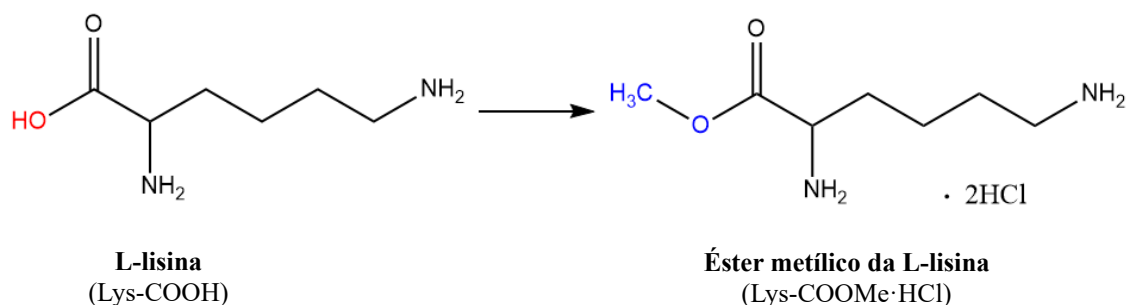
Os compostos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectrometria de massa (MS), sendo que o RMN permitiu a determinação da estrutura molecular, o FTIR forneceu informação sobre os grupos funcionais presentes, e a MS confirmou a massa molecular exata dos compostos sintetizados.

Na análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), todos os desvios químicos ( $\delta$ ) são apresentados em ppm. As análises das estruturas por  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN foram realizadas num espectrómetro Bruker Advance III, utilizando-se  $\text{CDCl}_3$  como solvente.

A análise por FTIR foi conduzida num espectrómetro Bruker Alpha Platinum-ATR, na região de  $3500\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros de massa ESI-MS foram obtidos através de um equipamento de HPLC Thermo Vanquish acoplado a um detetor DAD e a um espectrómetro de massa Thermo Orbitrap QExactive Focus. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises do Serviço de Análise Elementar, Cromatografia e Massas da Universidade de Salamanca (Espanha).

### 3.2. Síntese Orgânica de Polímeros Dendríticos Derivados de L-lisina

No presente estudo, tem-se como objetivo sintetizar e avaliar o potencial antimicrobiano e hidrofóbico de polímeros dendríticos derivados do aminoácido L-lisina, funcionalizados com ácidos gordos. Contudo, para viabilizar ataques nucleófilos e acoplamentos subsequentes, recorreu-se à forma esterificada da L-lisina, designadamente, éster metílico da L-lisina (Lys-COOMe·HCl) (J. Li & Sha, 2008).

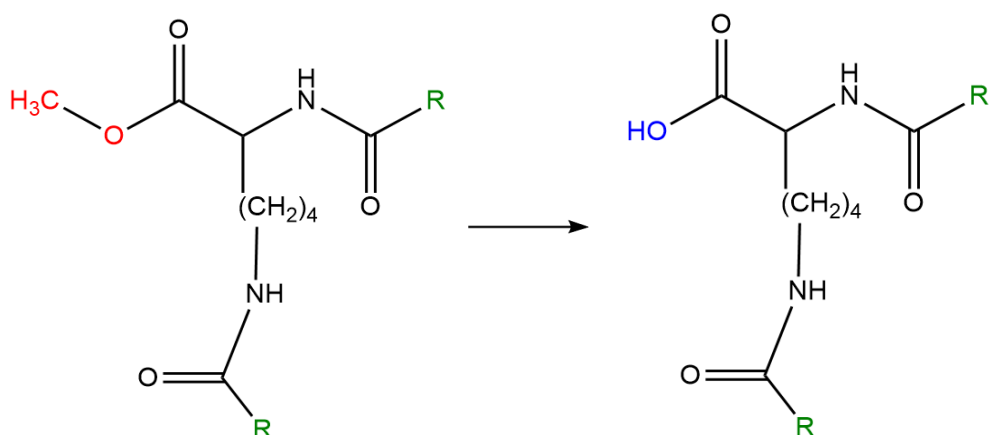


**Figura 25:** Estrutura das moléculas L-lisina (Lys-COOH) e éster metílico da L-lisina (Lys-COOMe·HCl)

A metodologia adotada para as sínteses de polímeros dendríticos, tendo como ponto de partida o éster metílico da L-lisina (Lys-COOMe), é descrita nas Partes A, B, C e D consistindo essencialmente em duas etapas de síntese fundamentais: reação de amidação por meio de acoplamento e reação de hidrólise (Agudo-Álvarez *et al.*, 2024; Theodorou *et al.*, 2007).

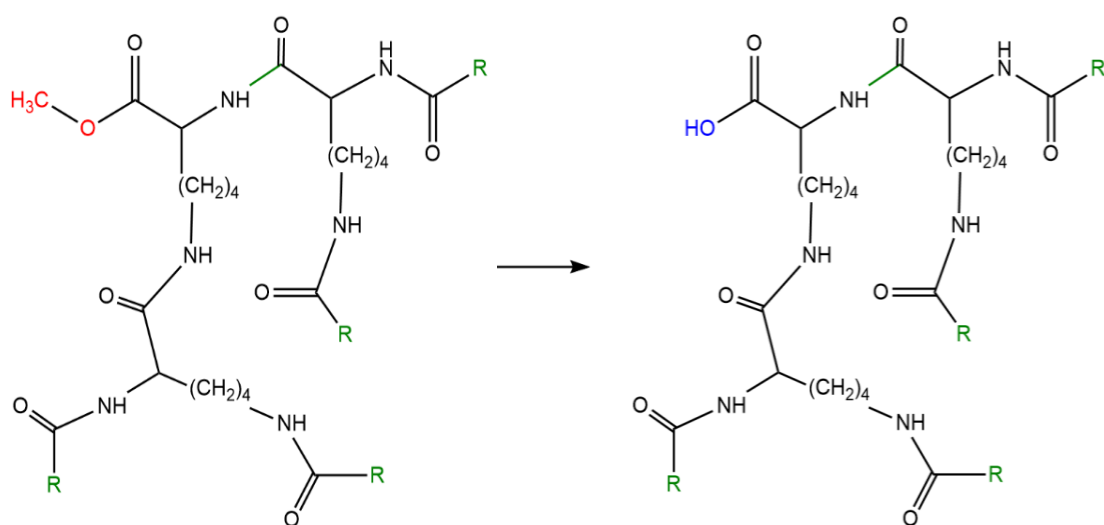
A amidação por meio de acoplamento é o primeiro passo de síntese, e consiste na funcionalização das aminas da L-lisina (NH<sub>2</sub>) com um ácido gordo, permitindo a criação de novos grupos periféricos. Uma vez que o produto obtido na reação de amidação se encontra sob a forma de éster (–COOMe), realiza-se a reação de hidrólise com o objetivo de o transformar em ácido (–COOH), sendo nesta forma que se pretende obter os produtos finais desejados.

A **Figura 26** apresenta os produtos obtidos nas reações de amidação e de hidrólise, sendo considerados de Geração 0 e tendo como designações G0(COOMe)-R e G0(COOH)-R, respetivamente.



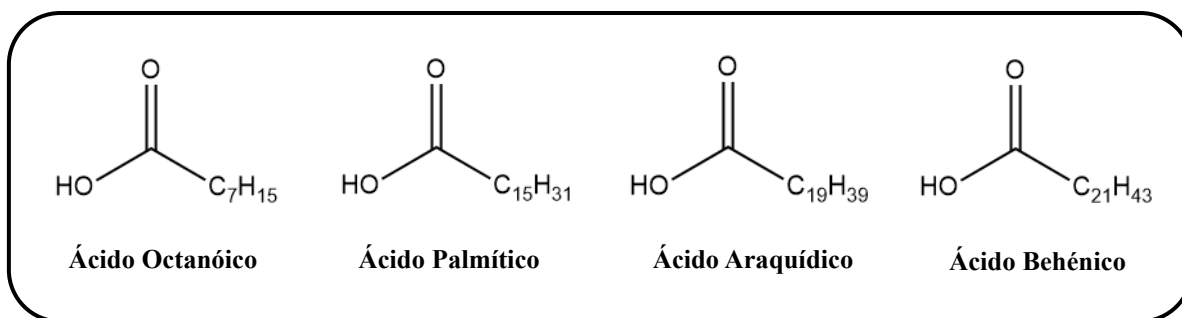
**Figura 26:** Estrutura das moléculas G0(COOMe)-R e G0(COOH)-R

A partir do produto final obtido na Geração G0, nomeadamente G0(COOH)-R, e tendo como ponto de partida do éster metílico da L-lisina (Lys-COOMe), repetem-se novamente as duas etapas de síntese descritas, amidação e hidrólise, de modo a sintetizar os polímeros de Geração 1 (**Figura 27**), tendo como designações G1(COOMe)-R e G1(COOH)-R.



**Figura 27:** Estrutura das moléculas G1(COOMe)-R e G1(COOH)-R

Na síntese dos produtos de Gerações G0 e G1 pretende-se variar o comprimento das cadeias laterais (R), por meio de diferentes ácidos gordos, particularmente: ácido octanóico, ácido hexadecanóico (também designado por ácido palmítico), ácido eicosanóico (também designado por ácido araquídico) e ácido docosanóico (também designado por ácido behénico) (**Figura 28**).

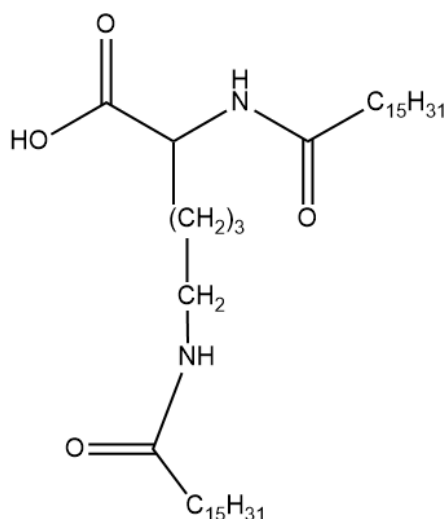


**Figura 28:** Estrutura dos ácidos gordos em estudo

Na secção seguinte (Parte A) é descrito o Procedimento Geral para a síntese de dendrões de Geração 0 e Geração 1, exemplificado para o ácido palmítico, composto por uma cadeia alifática de 15 carbonos ( $\text{C}_{15}$ ).

### Parte A: Síntese de dendrões derivados de Ácido Palmítico

#### 3.2.1. Síntese do Composto $\text{G}_0(\text{COOH})-\text{C}_{15}$



**Figura 29:** Estrutura do composto  $\text{G}_0(\text{COOH})-\text{C}_{15}$

#### - Reação de Amidação

De acordo com Álvarez *et al.* (2024), num balão em banho de água aquecida a 50 °C, dissolveu-se ácido palmítico (1.115 g, 4.5 mmol, 2.1eq.) em 10 mL de THF e 10 mL de DMF, adicionando em seguida TEA (0.627 mL, 4.5 mmol, 2.1eq.). Após 20 minutos, adicionou-se HBTU (1.706 g, 4.5 mmol, 2.1eq.). Permitiu-se que a mistura reagisse durante 1 hora, monitorizando a formação do intermediário reativo (HOBt) por análise TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1). Num outro balão, à temperatura ambiente, dissolveu-se éster metílico da L-lisina (500 mg, 2.14 mmol, 1eq.) em 10 mL de DMF, adicionando

posteriormente TEA (0.627 mL, 4.5 mmol, 2.1eq.). Deixou-se a mistura reagir durante uns minutos, adicionando-a em seguida à mistura do primeiro balão. Obteve-se uma solução sob a forma de precipitado branco, onde reagiu durante 1 hora à temperatura ambiente. No final da reação, extraiu-se o THF no evaporador rotativo e obteve-se uma pasta sólida. Esta foi filtrada a vácuo e lavada com água fria para retirar a DMF presente, e posteriormente com éter etílico frio de forma a remover possíveis vestígios de água. Por fim, colocou-se o produto obtido na bomba a vácuo durante 60 a 90 minutos. Obteve-se o produto G0(COOMe)-C<sub>15</sub> sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 92.4 %.

#### - Reação de Hidrólise

Segundo Theodorou *et al.* (2007), num balão em banho de água aquecida a 50 °C, dissolveu-se G0(COOMe)-C<sub>15</sub> (1.2 g, 1.88 mmol, 1eq.), em 40 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1). Após solubilização total, adicionou-se 5 mL de NaOH/MeOH (2M, 5eq.), onde a reação foi mantida em agitação e monitorizada por TLC. A mistura reagiu durante 1 hora e 30 minutos, e verificado o consumo total do éster acidificou-se a solução com HCl 0.4 M (pH 2-3). Sendo notória a formação de 2 fases imiscíveis, procedeu-se à filtração a vácuo, lavando a pasta obtida com água e éter etílico frios. Para finalizar, colocou-se o produto resultante na bomba a vácuo durante 60 a 90 minutos. Obteve-se o produto alvo da reação G0(COOH)-C<sub>15</sub> sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 99.7 %.

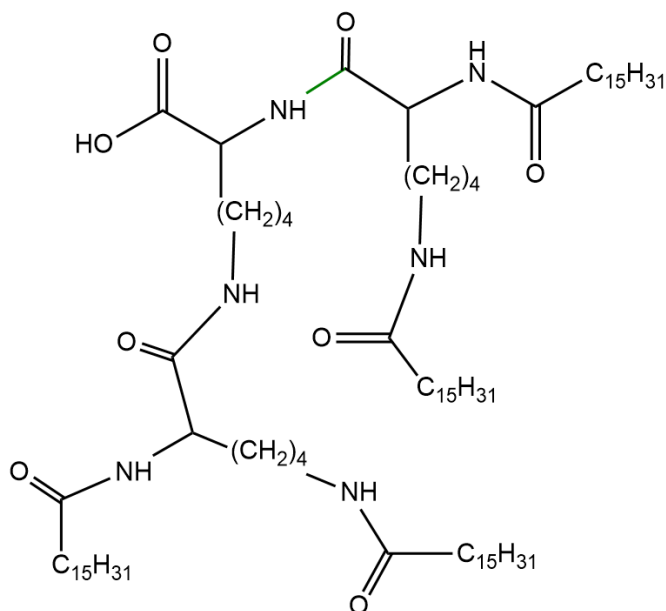
**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 6.91 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.47 (s, 1H), 3.35-3.18 (m, 2H), 2.29-2.18 (m, 4H), 1.66-1.53 (m, 6H), 1.27 (s, 52H), 0.90 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 178.10 (3 x C=O), 61.60 (1 x CH), 53.21-26.46 (32 x CH<sub>2</sub>), 17.71 (2 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3293, 2953, 2914, 2847, 1711, 1641, 1556, 1469, 1422, 1385, 1289, 1270, 1248, 1228, 1209, 1190, 1115, 941, 769, 718, 688 cm<sup>-1</sup>.

**ESI MS (m/z):** 623.5718 [M+H]<sup>+</sup>.

## 3.2.2. Síntese do Composto G1(COOH)-C15

Figura 30: Estrutura do composto G1(COOH)-C<sub>15</sub>**- Reação de Amidação**

Num balão, em banho de água aquecida a 50 °C, dissolveu-se G0(COOH)-C<sub>15</sub> (1.0 g, 1.605 mmol, 2eq.) em 30 mL de THF e 15 mL de DMF, adicionando em seguida TEA (0.235 mL, 1.686 mmol, 2.1eq.). Após 20 minutos, adicionou-se HBTU (640 mg, 1.686 mmol, 2.1eq.). Permitiu-se que a mistura reagisse durante 1 hora, monitorizando a formação do intermediário reativo (HOBt) por análise TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1). Num outro balão, à temperatura ambiente, dissolveu-se éster metílico da L-lisina (187 mg, 0.803 mmol, 1eq.) em 15 mL de DMF, adicionando posteriormente TEA (0.235 mL, 1.686 mmol, 2.1eq.). Deixou-se a mistura reagir durante uns minutos, adicionando-a em seguida à mistura do primeiro balão. Obteve-se uma solução sob a forma de precipitado branco, onde reagiu durante 1 hora à temperatura ambiente. No final da reação, extraiu-se o THF no evaporador rotativo e obteve-se uma pasta sólida. Esta foi filtrada a vácuo e lavada com água fria para retirar a DMF presente, e posteriormente com éter etílico frio de forma a remover possíveis vestígios de água. Por fim, colocou-se o produto obtido na bomba a vácuo durante 60 a 90 minutos. Obteve-se o produto G1(COOMe)-C<sub>15</sub> sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 90 %.

**- Reação de Hidrólise**

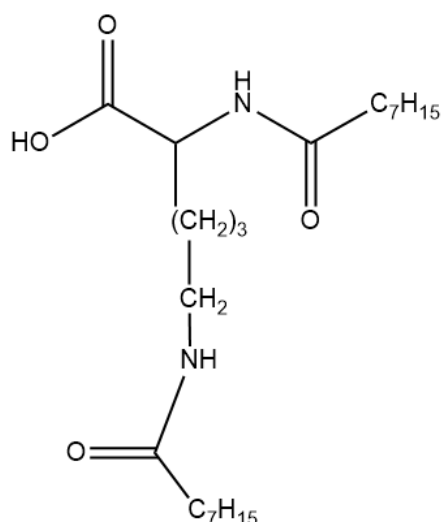
Num balão, em banho de água aquecida a 50 °C, dissolveu-se G1(COOMe)-C<sub>15</sub> (930 mg, 0.679 mmol, 1eq.), em 30 mL de CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1). Após solubilização total, adicionou-se 1.7 mL de NaOH/MeOH (2 M, 5eq.), onde a reação foi mantida em agitação e monitorizada por TLC. A mistura reagiu durante 3 horas, e verificado o consumo total do éster acidificou-se a solução com HCl 0.4 M (pH 2-3). Sendo notória a formação de 2 fases imiscíveis, procedeu-se à filtração a vácuo, lavando a pasta obtida com água e éter etílico frios. Para finalizar, colocou-se o produto resultante na bomba a vácuo durante 60 a 90 minutos. Obteve-se o produto alvo da reação G1(COOH)-C<sub>15</sub> sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 87 %.

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 11.55 (s, 3H), 11.03 (s, 3H), 8.30-8.23 (m, 3H), 7.08-7.03 (m, 6H), 6.04 (s, 8H), 5.41-5.17 (m, 27H), 5.12 (s, 95H), 4.79 (s, 12H).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 178.16 (7 x C=O), 61.55 (3 x CH), 53.37-26.43 (68 x CH<sub>2</sub>), 17.10 (4 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3299, 2915, 2848, 1737, 1635, 1546, 1465, 1377, 1267, 1247, 1225, 1207, 1187, 1127, 1001, 947, 719 cm<sup>-1</sup>.

**ESI MS (m/z):** 1378.2030 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Parte B: Síntese de dendrões derivados de Ácido Octanóico****3.2.3. Síntese do Composto G0(COOH)-C7**

**Figura 31:** Estrutura do composto G0(COOH)-C<sub>7</sub>

Utilizando o método descrito na Parte A secção 4.2.1., obteve-se o produto desejado sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 97 %.

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 6.83 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 3.34-3.18 (m, 2H), 2.29-2.19 (m, 4H), 1.66-1.56 (m, 8H), 1.29 (s, 18H), 0.91 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 174.34 (3 x C=O), 52.04 (1 x CH), 38.87-22.63 (16 x CH<sub>2</sub>), 14.09 (2 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3349, 3304, 2953, 2919, 2851, 1722, 1639, 1587, 1540, 1465, 1416, 1378, 1244, 1203, 1180, 1138, 1033, 1006, 968, 949, 859, 794, 770, 722, 679, 646, 624 cm<sup>-1</sup>.

**ESI MS (m/z):** 421.3037 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 3.2.4. Síntese do Composto G1(COOH)-C7

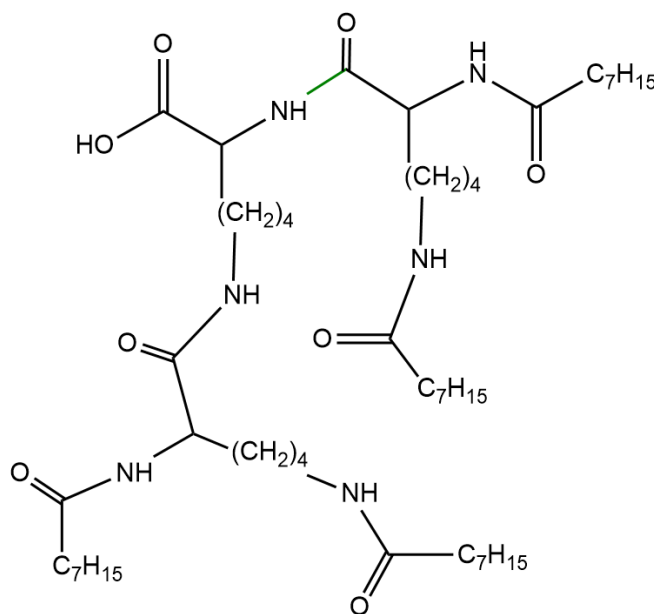


Figura 32: Estrutura do composto G1(COOH)-C7

Utilizando o método descrito na Parte A secção 4.2.2., obteve-se o produto desejado sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 91 %.

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 7.4 (s, 3H), 6.21 (s, 3H), 4.56 (s, 3H), 3.51-3.33 (m, 6H), 2.38-2.17 (m, 8H), 1.92-1.80 (m, 23H), 1.30 (s, 33H), 0.90 (s, 12H).

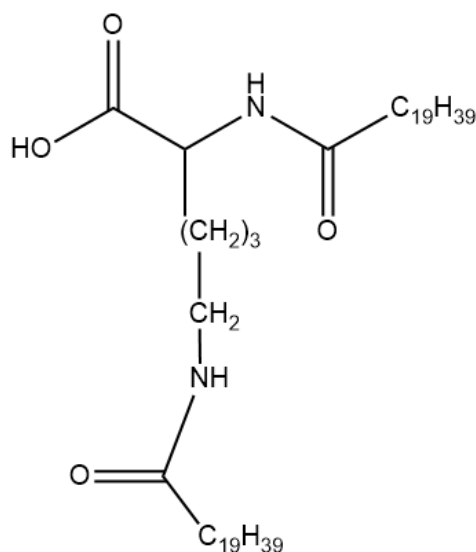
**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 173.90 (7 x C=O), 52.67 (3 x CH), 39.12-25.80 (36 x CH<sub>2</sub>), 13.92 (4 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3290, 2923, 2854, 1733, 1634, 1589, 1538, 1461, 1377, 1231, 1207, 1180, 1142, 721, 681, 615  $\text{cm}^{-1}$ .

**ESI MS (m/z):** 929.7011  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### Parte C: Síntese de dendrões derivados de Ácido Araquídico

#### 3.2.5. Síntese do Composto G0(COOH)-C19



**Figura 33:** Estrutura do composto G0(COOH)-C<sub>19</sub>

Utilizando o método descrito na Parte A secção 4.2.1., obteve-se o produto desejado sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 94 %.

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 6.88 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.41 (s, 1H), 3.26-3.18 (m, 2H), 2.26-2.17 (m, 4H), 1.66-1.49 (m, 8H), 1.28 (s, 67H), 0.91 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 173.99 (3 x C=O), 36.77 (1 x CH), 31.91-25.81 (40 x CH<sub>2</sub>), 14.03 (2 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3293, 2952, 2913, 2847, 1710, 1639, 1557, 1470, 1422, 1387, 1314, 1282, 1265, 1249, 1233, 1215, 1202, 1137, 1117, 942, 769, 718, 688  $\text{cm}^{-1}$ .

**ESI MS (m/z):** 735.6968  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

## 3.2.6. Síntese do Composto G1(COOH)-C19

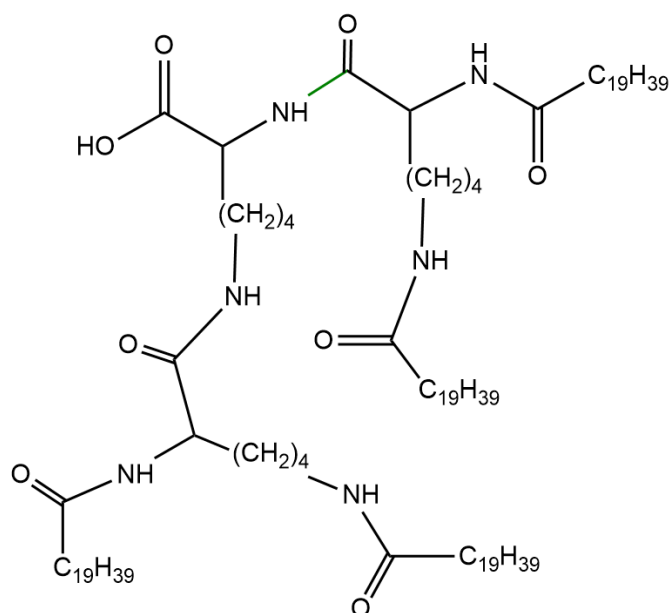


Figura 34: Estrutura do composto G1(COOH)-C<sub>19</sub>

Utilizando o método descrito na Parte A seção 4.2.2., obteve-se o produto desejado sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 82 %.

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 7.67 (s, 3H), 7.15 (s, 3H), 4.38 (s, 3H), 3.34-3.13 (m, 6H), 2.22-2.11 (m, 8H), 1.62-1.47 (m, 21H), 1.25 (s, 134H), 0.86 (s, 12H).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 174.54 (7 x C=O), 57.49 (3 x CH), 49.25-22.48 (84 x CH<sub>2</sub>), 13.70 (4 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3303, 3088, 2915, 2848, 1735, 1636, 1543, 1466, 1377, 1278, 1263, 1248, 1232, 1214, 1200, 1183, 1140, 947, 719, 611 cm<sup>-1</sup>.

**ESI MS (m/z):** 1579.4595 [M-H]<sup>-</sup>.

## Parte D: Síntese de dendrões derivados de Ácido Behénico

## 3.2.7. Síntese do Composto G0(COOH)-C21

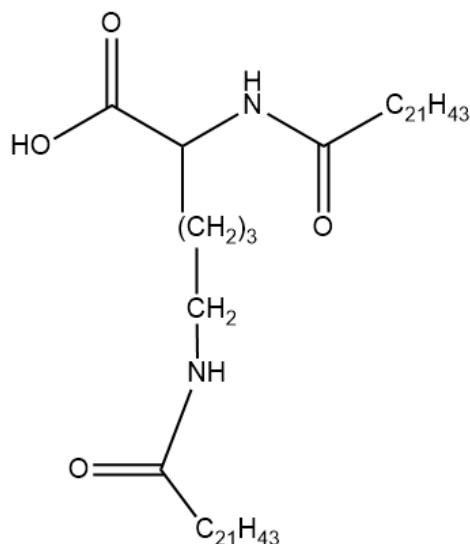


Figura 35: Estrutura do composto G0(COOH)-C21

Utilizando o método descrito na Parte A secção 4.2.1., obteve-se o produto desejado sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 99.7 %.

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 6.63 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 3.30-3.24 (m, 2H), 2.38-2.17 (m, 5H), 1.66-1.62 (m, 9H), 1.30 (s, 73H), 0.91 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  (ppm) = 104.60 (3 x C=O), 51.24 (1 x CH), 34.10-24.75 (44 x CH<sub>2</sub>), 13.96 (2 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3295, 2952, 2914, 2847, 1710, 1641, 1558, 1470, 1420, 1385, 1287, 1256, 1242, 1226, 1212, 1057, 942, 805, 767, 718, 688 cm<sup>-1</sup>.

**MS (m/z):** 791.7592 [M+H]<sup>+</sup>.

## 3.2.8. Síntese do Composto G1(COOH)-C21

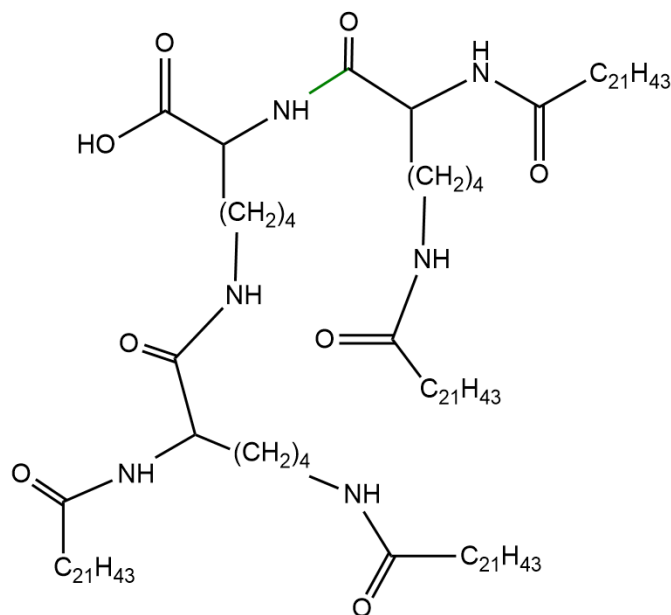


Figura 36: Estrutura do composto G1(COOH)-C<sub>21</sub>

Utilizando o método descrito na Parte A seção 4.2.2., obteve-se o produto desejado sob a forma de um sólido branco “solto” com rendimento de 88 %.

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 7.68 (s, 2H), 7.14 (s, 3H), 4.38 (s, 2H), 3.91-3.85 (m, 6H), 2.22-2.12 (m, 8H), 1.60-1.47 (m, 23H), 1.25 (s, 149H), 0.86 (s, 12H).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 174.54 (7 x C=O), 57.50 (3 x CH), 48.83-22.48 (92 x CH<sub>2</sub>), 13.70 (4 x CH<sub>3</sub>).

**FTIR (ATR):** 3302, 2915, 2849, 1733, 1635, 1549, 1468, 1377, 1211, 1131, 719, 608 cm<sup>-1</sup>.

**MS (m/z):** 1690.5800 [M-H]<sup>-</sup>.

### 3.3. Ensaio de Atividade Antimicrobiana

Procedeu-se ao estudo dos revestimentos sintetizados com o objetivo de avaliar o seu potencial biocida contra microrganismos (MO) frequentemente associados à biodeterioração de material pétreo (Dias *et al.*, 2020a; Dias *et al.*, 2020b). Para tal, foram selecionados três microrganismos obtidos em contexto de contaminação pétreo, previamente isolados de Pedras Naturais expostas ao ar livre e apresentando alterações estéticas, nomeadamente duas bactérias (*Bacillus cereus* e *Microbacterium* sp.) e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

#### 3.3.1. Preparação dos Meios de Cultura

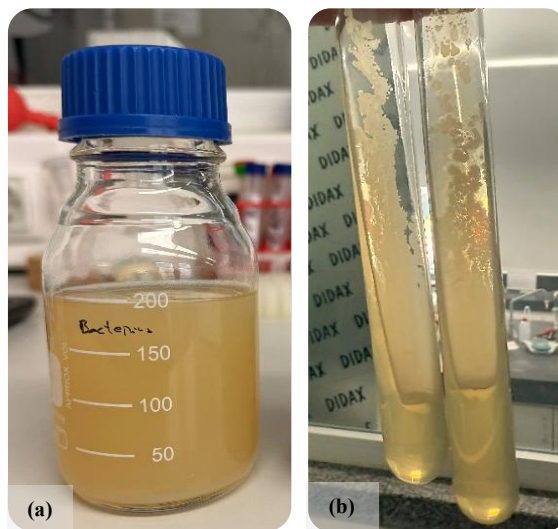
Os meios de cultura utilizados para o crescimento das estirpes ao longo do trabalho experimental foram *Nutrient Agar* (NA) da HiMedia® e *Nutrient Broth* (NB) da Oxoid®. A preparação destes meios foi executada de acordo com a **Tabela 2**, sendo que em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 120 °C, assegurando a eliminação de contaminantes microbiológicos antes da sua utilização.

**Tabela 2:** Composição dos meios de cultura selecionados.

| Meio de Cultura            | Composição          | Valores (g/L) |
|----------------------------|---------------------|---------------|
| <i>Nutrient Agar</i> (NA)  | Peptona             | 5.0           |
|                            | Extrato de levedura | 1.5           |
|                            | Extrato proteico    | 1.5           |
|                            | Agar                | 15.0          |
|                            | Cloreto de sódio    | 5.0           |
| <i>Nutrient Broth</i> (NB) | Peptona             | 5.0           |
|                            | Extrato de levedura | 2.0           |
|                            | Extrato proteico    | 1.0           |
|                            | Cloreto de sódio    | 5.0           |

### 3.3.2. Preparação dos Inóculos

Colocou-se em tubos de ensaio, previamente esterilizados, o meio de nutriente agar (NA) à chama e deixou-se solidificar, com o objetivo de formar rampas de crescimento (**Figura 37**). Em seguida, repicaram-se os microrganismos em estudo, com ansas descartáveis, para os tubos de ensaio contendo o meio NA solidificado. Os tubos foram posteriormente incubados na estufa a 30 °C durante 48 horas. Após este período, as rampas foram armazenadas a 4 °C até sua utilização.



**Figura 37:** Meio de nutriente agar (NA) (a) e rampas de crescimento do microrganismo *B. cereus* (b)

O meio de nutriente agar (NA) utilizado para o crescimento dos microrganismos, é um meio de cultura comercialmente disponível e geralmente indicado para a cultura de microrganismos unicelulares e algumas leveduras, sendo constituído por extrato de levedura, extrato de carne, peptona, cloreto de sódio e agar. Estes componentes fornecem todos os nutrientes necessários para o crescimento das bactérias e da levedura em estudo.

É de realçar que os tubos de ensaio foram tapados com algodão nas suas extremidades, sendo que este serve como “rolha” para conservar o meio NA impede que haja contaminação promovendo a esterilidade e permite a passagem de ar, funcionando também como um filtro.

### 3.3.3. Preparação das Soluções

A solução Tween 20 (polissorbato) é um detergente não iónico que permite solubilizar polímeros dendríticos orgânicos. Deste modo, preparou-se uma solução Tween a 0.5% através de diluições sucessivas.

Relativamente aos revestimentos orgânicos sintetizados, foram preparadas soluções com três concentrações distintas, nomeadamente 1000, 2000 e 5000 ppm, todas em triplicado. Pesou-se 10 mg de cada revestimento para microtubos, aos quais se adicionou 2 mL de solução Tween 0.5%. As suspensões resultantes foram submetidas a agitação no vórtex e ultrassons, obtendo-se soluções-mãe com concentração de 5000 ppm. A partir destas, prepararam-se soluções de 2000 e 1000 ppm por diluições sucessivas. Para além disto, um revestimento comercial selecionado foi diluído para obtenção de soluções com as mesmas concentrações dos revestimentos orgânicos em estudo.

### 3.3.4. Avaliação do Potencial Antimicrobiano

A avaliação do potencial antimicrobiano realizou-se em microplacas de 96 poços estéreis, sendo que se recorreu a uma microplaca distinta para o crescimento de cada estirpe em estudo. Neste sentido, em cada poço, pipetou-se 80 µL de meio de cultura líquido NB e adicionou-se 10 µL da solução correspondente a cada revestimento orgânico (5000, 2000 e 1000 ppm). Para a realização do controlo negativo (branco), ao invés dos revestimentos orgânicos pipetou-se 10 µL de água mili-Q estéril, de forma a averiguar o crescimento microbiano na ausência de qualquer influência dos revestimentos. De seguida, ressuspenderam-se os microrganismos em água mili-Q estéril e adicionou-se 10 µL da suspensão microbiana para todos os poços, incluindo o branco. É de ressaltar que todo o procedimento de preparação da atividade antimicrobiana foi efetuado num ambiente de assepsia. As placas foram incubadas a 37 °C num espectrofotómetro UV-VIS Thermo Scientific Multiskan GO, com agitação a cada 5 minutos, até que o controlo (estirpe + água mili-Q estéril) atingisse a fase estacionária de crescimento microbiano.

O cloridrato de vancomicina da Sigma-Aldrich® foi utilizado como controlo positivo para o estudo de crescimento das estirpes *Micrococcus* sp. e *Bacillus* sp., e a anfotericina B 80% da TCI®, foi utilizada como controlo positivo para o estudo de crescimento da estirpe *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.4. Estudo da compatibilidade física, química e estética com os substratos pétreos

#### 3.4.1. Preparação dos Provetes de Pedra Natural

Para o presente estudo, foram selecionados três tipos de Pedra Natural provenientes de pedreiras localizadas em território português, comumente empregadas em monumentos, nomeadamente calcário, mármore e granito (Fermo *et al.*, 2014) (Hashim *et al.*, 2024). O calcário foi extraído do Maciço Calcário Estremenho, tendo sido cedido pela empresa SOLANCIS; o mármore é de Vila Viçosa e foi fornecido pela DIMPOMAR; por sua vez o granito foi extraído de Alpalhão sendo cedido pela empresa FILSTONE.

A escolha destes litotipos justificou-se pela sua ampla utilização no património construído nacional e pelas diferenças nas suas propriedades físico-químicas (**Tabela 1**), permitindo avaliar o desempenho dos revestimentos em contextos distintos e de forma a obter resultados comparativos e abrangentes (Dias *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).

Os provetes dos litotipos foram cortados a húmido em pequenos blocos *standard* de dimensões  $3 \times 3 \times 0.4$  cm com recurso a uma serra de corte (DISCOPLAN-TS, Struers) (**Figura 38**). Em seguida, as superfícies foram polidas com pano de polimento carborundum (SiC P320, granulometria  $46 \mu\text{m}$ ) de forma a uniformizar a textura e obter superfícies uniformes, eliminando imperfeições de corte. Após o polimento, os provetes foram lavados com água destilada, secos na estufa a  $40^\circ\text{C}$  durante 24 h e deixados arrefecer.



**Figura 38:** Preparação dos provetes em blocos de  $3 \times 3 \times 0.4$  cm com recurso a uma serra de corte (a).

Amostras obtidas dos três litotipos em estudo (calcário, mármore e granito) após uniformização das superfícies (b) sobre uma escala métrica e carta de calibração cromática, para referência dimensional e análise visual padronizada

### 3.4.2. Aplicação dos Revestimentos nos Provetes de Pedra Natural

Os provetes de cada litotipo foram submetidos a três condições experimentais:

- 1) sem aplicação de revestimento (teste em branco);
- 2) aplicação dos polímeros sintetizados descritos na Secção 4.2.;

3) e aplicação do revestimento hidrofóbico comercial *Protetor Placa de Pedra Natural AXTON* (AXTON, 0.5 L), produto líquido incolor impermeável, para fins de comparação.



**Figura 39:** Revestimento hidrofóbico comercial Protetor Placa de Pedra Natural AXTON (a). Vial de um dos revestimentos sintetizados [G1(COOH)-C15] em estado líquido (b). As imagens não estão representadas à escala

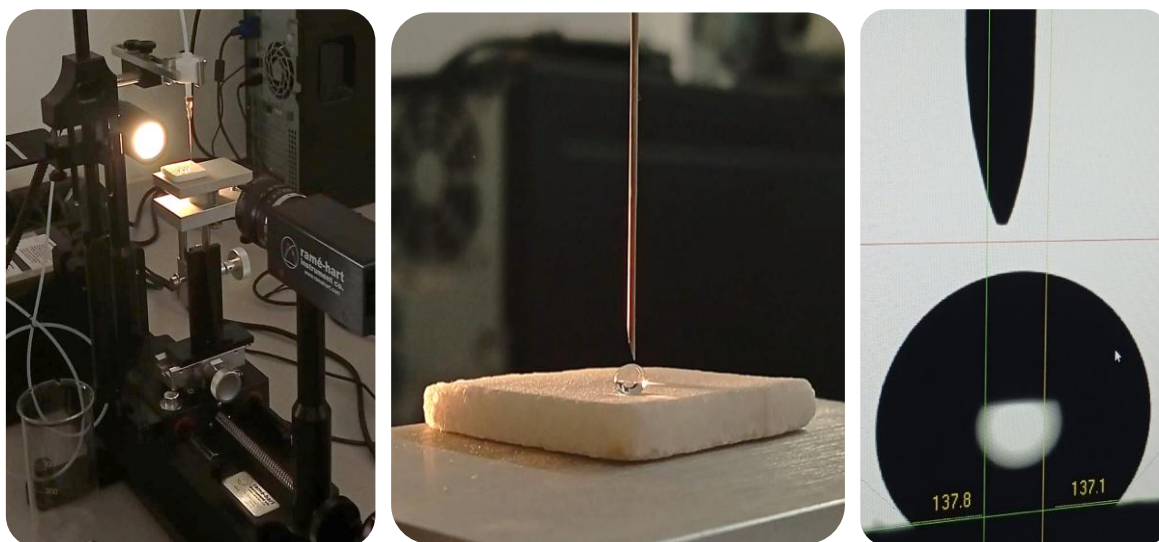
Para a preparação das soluções dos polímeros sintetizados, pesou-se 50 mg de cada produto, aos quais se adicionou 7 mL de isopropanol e 3 mL de água destilada. As misturas foram sujeitas a agitação no vórtex, seguida de ultrassons, de forma a obter soluções homogêneas. No caso do revestimento comercial, não foi necessária qualquer preparação adicional com isopropanol e água, tendo-se aplicado diretamente 10 mL do produto de origem. A aplicação dos revestimentos nas superfícies das pedras foi realizada por pulverização, durante 3 segundos a uma distância de aproximadamente 50 cm, para garantir uma distribuição homogênea nas superfícies das pedras. Após este processo, os provetes com os revestimentos aplicados foram deixados secar à temperatura ambiente durante 24 h.

Após aplicação dos revestimentos aplicados nas superfícies das pedras, procedeu-se aos ensaios de tensiometria ótica com o objetivo de avaliar a eficácia hidrofóbica dos produtos, bem como aos ensaios de colorimetria para averiguar se os revestimentos preservam as características visuais originais dos litotipos, nomeadamente a cor e o brilho, garantindo a manutenção da sua aparência estética.

### 3.4.3. Estudo da Eficácia Hidrofóbica por Tensiometria Ótica

A eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados nos provetes em estudo foi avaliada por tensiometria ótica, através da medição dos ângulos de contacto estáticos ( $\theta$ ) de gotas de água depositadas sobre a superfície das pedras (Gabriele *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024). As medições foram executadas com recurso ao tensiómetro Ramé-Hart à temperatura ambiente (**Figura 40a**), sendo que os ângulos ( $\theta$ ) são calculados por análise computacional do software DROPimage, a partir de imagens digitais da gota na superfície pétrea.

Para cada medição, aplicou-se uma gota de água desionizada (12  $\mu\text{L}$ ) sobre a superfície da pedra (**Figura 40b**), medindo-se os ângulos formados entre a linha de base e as linhas tangentes à superfície da gota de água (**Figura 40c**) (Silva *et al.*, 2024). Para cada provete, o ângulo de contacto médio foi determinado a partir de, pelo menos, cinco medições realizadas em diferentes partes da superfície pétrea.



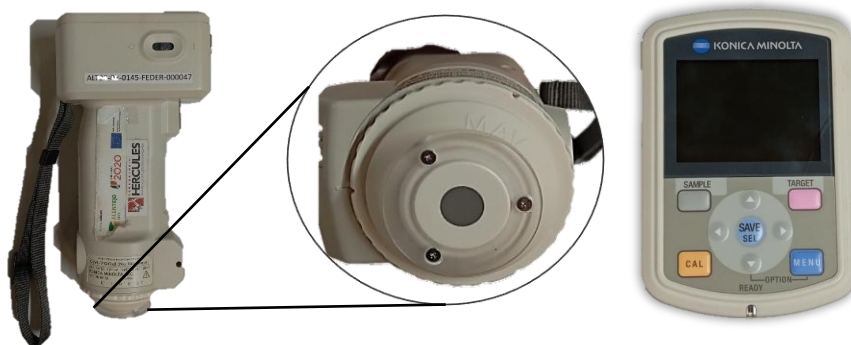
**Figura 40:** Avaliação da eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados por tensiometria ótica com recurso ao tensiómetro Ramé-Hart (a): gota de água depositada na superfície da pedra (b) e medição dos ângulos de contacto formados entre a linha de base e as tangentes ao perfil da gota (c)

As medições dos ângulos de contacto por tensiometria ótica, permitem avaliar a eficácia hidrofóbica dos revestimentos na superfície de cada provete, antes e depois da aplicação destes nas pedras, bem como após os ensaios de envelhecimento acelerado de forma a aferir a durabilidade funcional dos produtos.

### 3.4.4. Ensaio de Colorimetria

Pretende-se determinar se os revestimentos protetores aplicados nas pedras preservam as características visuais originais dos litotipos, nomeadamente a cor, de forma a garantir a manutenção da sua aparência estética. Para tal, realizou-se uma análise colorimétrica, antes e depois da aplicação dos compostos, bem como após o processo de envelhecimento acelerado.

Recorreu-se a um colorímetro portátil Konica Minolta (abertura MAV), tendo sido avaliada a cor dos provetes em triplicado (medição realizada em três pontos distintos da sua superfície) para a reduzir o impacto da heterogeneidade do material.



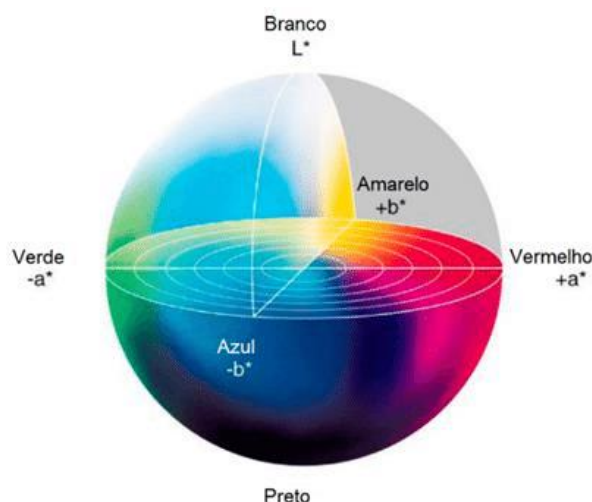
**Figura 41:** Instrumento de análise colorimétrica - Colorímetro portátil Konica Minolta (abertura MAV)

O colorímetro portátil mede a luz refletida pelas pedras em diferentes comprimentos de onda e converte os dados espectrais obtidos em coordenadas numéricas no sistema de cores CIELAB (**Figura 42**) (Dias *et al.*, 2020b). Este sistema representa a cor através de três parâmetros principais:

$L^*$  que indica a luminosidade (0 = preto absoluto; 100 = branco absoluto);

$a^*$  que corresponde ao eixo vermelho-verde (valores positivos = vermelho; valores negativos = verde);

e  $b^*$  correspondente ao eixo amarelo-azul (valores positivos = amarelo; valores negativos = azul)



**Figura 42:** Sistema de cores CIELAB representado pelos três parâmetros principais: L\*, a\* e b\* (adaptado de M. G. Silva *et al.*, 2016)

A variação cromática total é expressa pela diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) que integra os três parâmetros segundo a **Equação 1**, em que  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  e  $\Delta b^*$  correspondem às diferenças entre os valores medidos antes e depois da aplicação dos revestimentos nos provetes de pedra (Silva *et al.*, 2024).

$$\text{Equação 1} \quad \Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

A **Equação 1** pode ser reescrita na **Equação 2**, em que nesta formulação, “0” representa a cor inicial da pedra e “t” indica a cor medida após a aplicação dos revestimentos, ou após os ensaios de envelhecimento acelerado (Silva *et al.*, 2024).

$$\text{Equação 2} \quad \Delta E^* = [(L_t^* - L_0^*)^2 + (a_t^* - a_0^*)^2 + (b_t^* - b_0^*)^2]^{1/2}$$

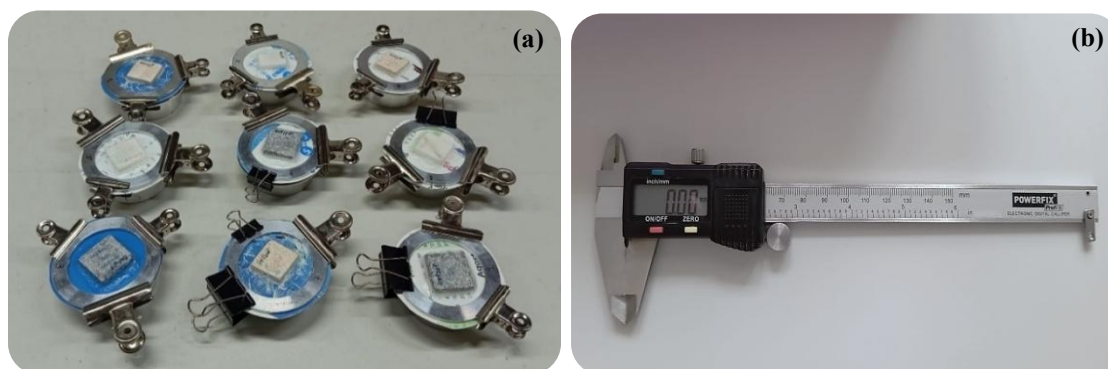
De acordo com o sistema CIELAB e no contexto de conservação do património, considera-se que variações de cor são impercetíveis a *olho nu* quando o valor de  $\Delta E^*$  é inferior a 5 (Armal *et al.*, 2023).

### 3.4.5. Permeabilidade ao Vapor de Água

A difusão do vapor de água através da Pedra Natural é uma propriedade fundamental a ser avaliada na eficácia dos revestimentos hidrofóbicos (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018). Estes revestimentos protetores devem permitir a permeabilidade ao vapor, de modo a preservar a “respirabilidade” do substrato pétreo, pois a sua obstrução pode originar a acumulação de humidade interna, induzindo tensões mecânicas que, a longo prazo, podem comprometer a integridade estrutural da pedra, conduzindo a fissuras ou até fraturas (Armal *et al.*, 2023).

Neste sentido, foram conduzidos testes de permeabilidade ao vapor de água nas pedras em estudo após aplicação dos revestimentos hidrofóbicos. Aplicou-se o método do copo para medir a transmissão do vapor de água (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024). Foram preparados recipientes, preenchidos com algodão e 1 cm de água destilada para criar um ambiente totalmente húmido. Posteriormente, cada amostra de pedra foi colocada na superfície do recipiente e recorreu-se a silicone para vedar potenciais pontos de entrada de ar.

Cada conjunto composto por recipiente-água-litotipo foi pesado em gramas e mantidos a uma temperatura de 23 °C. Os conjuntos foram pesados periodicamente a cada 24 h durante 10 dias até apresentarem uma diferença de massa inferior a 0.1%, momento em que o ensaio foi concluído (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).



**Figura 43:** Método do copo com algumas das pedras em estudo prontas as medições diárias (a). Craveira utilizada para a medição da espessura das pedras (b)

A permeabilidade ao vapor de água ( $K$ ) foi calculada através da **Equação 3** (Armal *et al.*, 2023), onde:

“G” corresponde à variação da massa em função do tempo (fluxo do vapor de água); “e” indica a espessura das pedras em estudo;

“A” corresponde à área por onde o vapor de água atravessa as amostras;

e  $\Delta P$  corresponde à variação da pressão do vapor de água dentro e fora do recipiente.

$$\text{Equação 3} \quad K = \frac{G}{A \cdot \Delta P} \cdot e \text{ (g} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}\text{), sendo } G = \Delta m / \Delta t \text{ (g} \cdot \text{s}^{-1}\text{)}$$

A permeabilidade ao vapor de água ( $K$ ) está diretamente relacionada com a porosidade das pedras, sendo que a porosidade pode influenciar a compatibilidade dos revestimentos hidrofóbicos aplicados nas pedras (Armal *et al.*, 2023).

### 3.4.6. Ensaio de Envelhecimento Acelerado

Um aspecto essencial a avaliar nos revestimentos aplicados em materiais pétreos, é a sua durabilidade, quando submetidos a condições atmosféricas controladas. A durabilidade corresponde à capacidade de o revestimento manter a sua funcionalidade mesmo sob diferentes condições ambientais variáveis, ao longo do tempo (Collins & Safiuddin, 2022). Assim, procedeu-se à análise do desempenho dos revestimentos sintetizados, aplicados nos litotipos em estudo, quando expostos a condições climáticas simuladas em ensaios de envelhecimento acelerado.

As amostras foram submetidas ao envelhecimento artificial numa câmara climática QUV-Accelerated Weathering Tester seguindo o método padrão ASTM G154-C7 (**Figura 44**). Este método envolve 15 min de aspersão de água, 3 h 45 min de condensação a 50 °C e 8 h de radiação UVA com um comprimento de onda de 340 nm, a 60 °C (irradiância de 0.75 W/m<sup>2</sup>). Aplicou-se um total de 28 ciclos, sendo que cada ciclo durou 12 h, correspondendo a 14 dias de ensaio. O programa de envelhecimento seguiu a norma ASTM G154, sendo o modelo globalmente adotado para avaliar o desgaste deste tipo de materiais (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).

Para avaliar a durabilidade dos revestimentos aplicados nas amostras de pedra, os ângulos de contato estáticos (ensaios de tensiometria ótica) e alterações de cor (ensaios de colorimetria) foram medidos após o ensaio, de forma a comparar a eficácia da hidrofobicidade após as condições submetidas e averiguar se as pedras conservaram as suas propriedades estéticas (cor).



**Figura 44:** Câmara climática QUV-Accelerated Weathering Tester utilizada nos ensaios de envelhecimento acelerado para análise do desempenho dos revestimentos sintetizados

## **CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

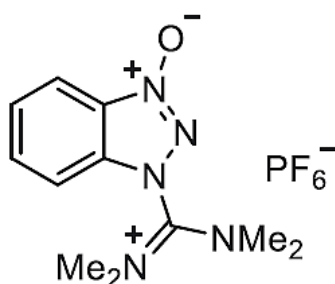
*Todas as verdades são fáceis de perceber depois de terem sido descobertas;  
o problema é descobri-las.*

*– Galileu Galilei*

#### 4.1. Análise dos Polímeros Obtidos

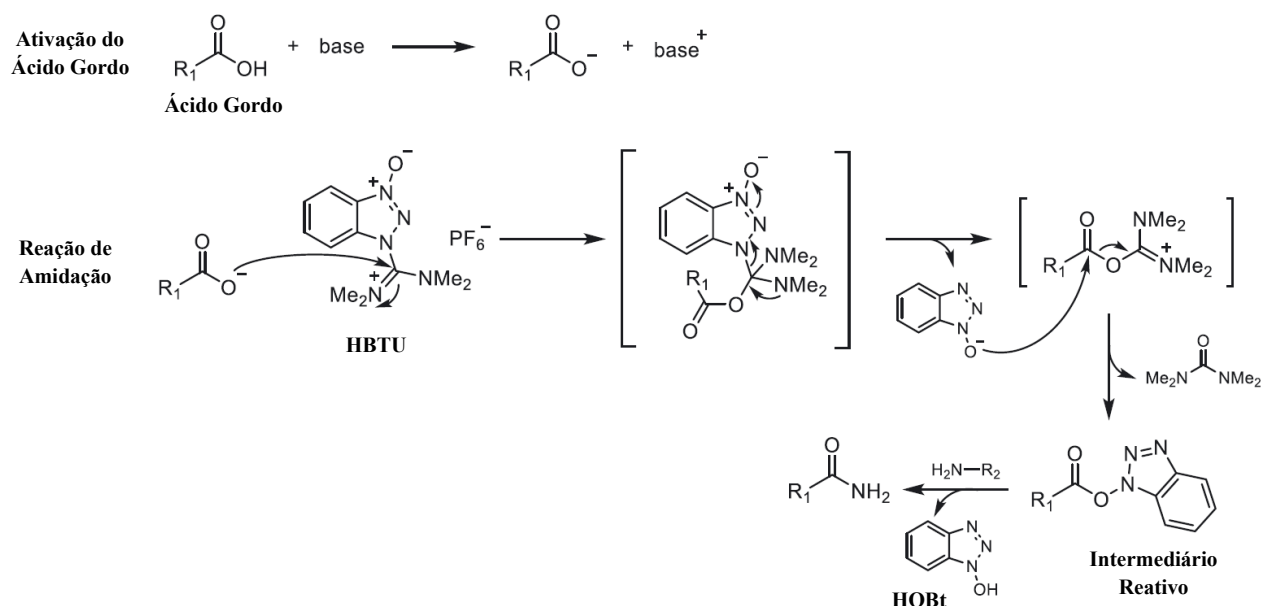
Tendo como principal objetivo o desenvolvimento e aplicação de novos polímeros dendríticos, realizou-se uma sequência de sínteses convergentes tendo como material de partida lisina metil éster. O primeiro passo desta estratégia sintética, consistiu em converter o éster metílico da L-lisina numa amida através de uma reação de amidação.

A formação de ligações amida, pode ser realizada pelo acoplamento de aminas e ácidos carboxílicos, sendo que este processo envolve a ativação prévia do ácido carboxílico tornando-o mais suscetível ao ataque nucleofílico da amina (Agudo-Álvarez *et al.*, 2024). Para esta metodologia, utilizam-se frequentemente agentes de acoplamento, como o HBTU (**Figura 45**), que promove a formação de um intermediário ativado do ácido carboxílico e facilitando assim o ataque nucleofílico da amina e a consequente formação da ligação amida (Agudo-Álvarez *et al.*, 2024).



**Figura 45:** Agente de acoplamento HBTU para formação de ligações amida (adaptado de Agudo-Álvarez *et al.*, 2024)

Na **Figura 46**, é apresentado o mecanismo da reação de amidação utilizando o agente de acoplamento HBTU como reagente. Neste mecanismo, o ácido na presença de uma base terciária, forma o anião carboxilato, que promove um ataque nucleofílico no centro eletrofílico do grupo guanidínio. Isto conduz à ativação de um éster benzotriazolílico (intermediário reativo) que consequentemente sofre um ataque nucleofílico pela amina correspondente, resultando na amida desejada. Como produto secundário desta reação, é obtido HOBt (Agudo-Álvarez *et al.*, 2024).

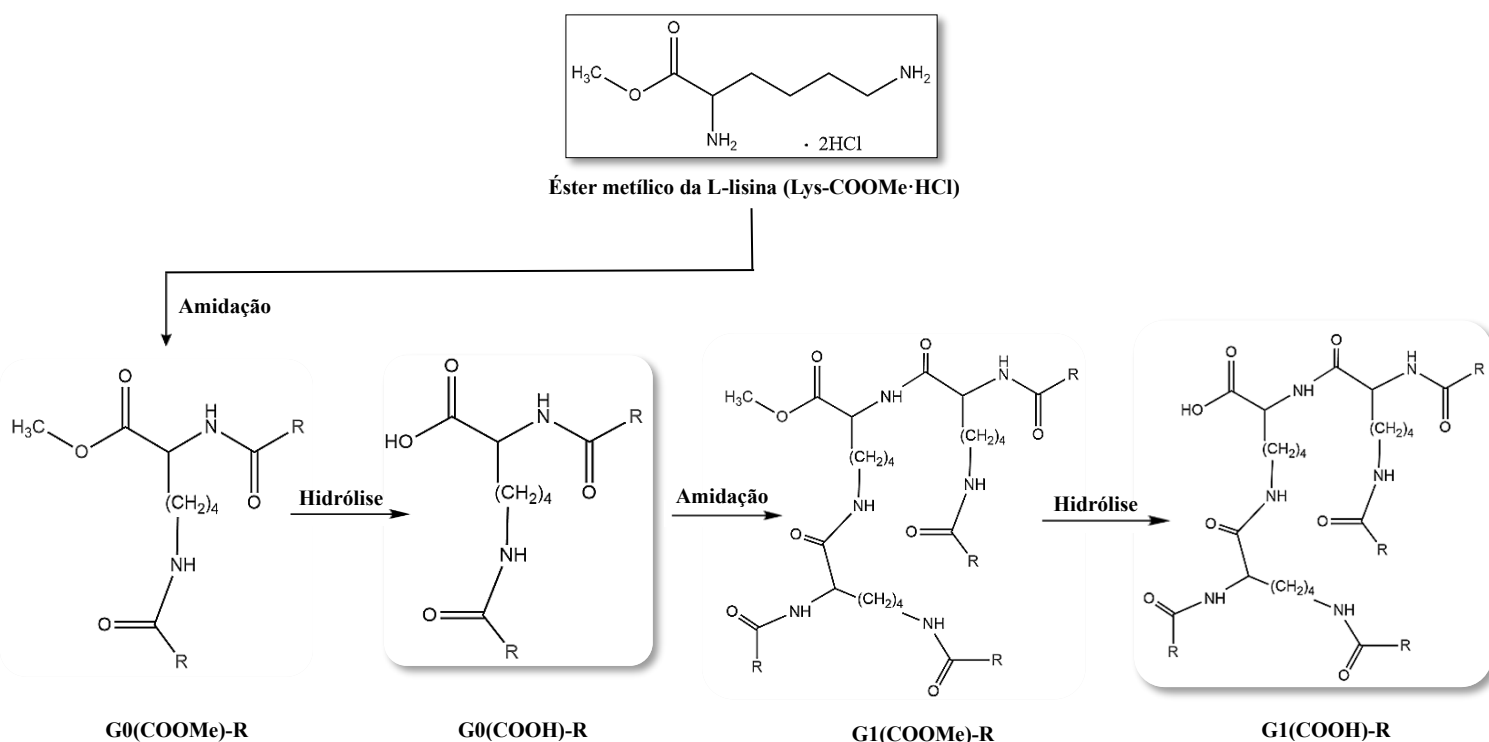


**Figura 46:** Mecanismo da reação de amidação usando HBTU como reagente de acoplamento (adaptado de Agudo-Álvarez *et al.*, 2024)

Através do método de acoplamento por HBTU, os produtos secundários são facilmente separáveis do produto desejado, facilitando o processo de purificação. O uso de bases terciárias como a trietilamina (TEA) é fundamental neste tipo de reação, uma vez que desprotona o ácido carboxílico, promovendo a formação da espécie carboxilato mais reativa. Assim, a aplicação deste método permite a obtenção de amidas com bons rendimentos e em condições reacionais controladas.

A hidrólise de ésteres em ácidos carboxílicos é uma transformação orgânica muito comum em química, pois fornece ácidos carboxílicos a partir dos ésteres correspondentes. De acordo com a literatura, utilizando esta abordagem, são expectáveis rendimentos na ordem dos 80 a 90%. Os rendimentos obtidos na presente investigação encontram-se dentro ou acima deste intervalo, estando, portanto, em concordância com os valores descritos (Theodorou *et al.*, 2007).

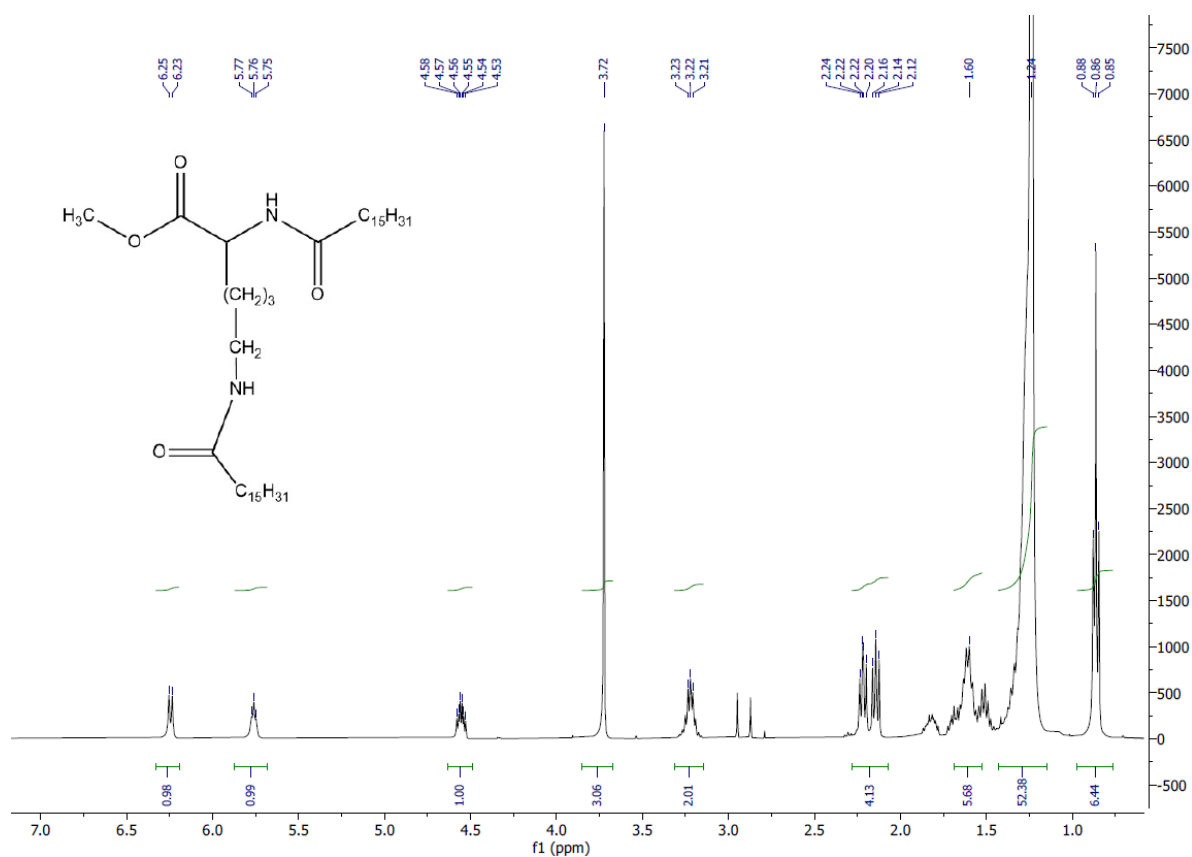
Na **Figura 47** encontra-se esquematizada a sequência de síntese adotada para a obtenção dos compostos alvo, tendo como material de partida a lisina metil éster. A estratégia desenvolvida envolveu a realização de sucessivas reações de amidação e hidrólise, permitindo a modificação controlada da molécula inicial e a obtenção dos derivados pretendidos.



**Figura 47:** Mapa de reações envolvendo o éster metílico da L-lisina como material de partida

Após realização das reações de amidação e hidrólise, a obtenção dos compostos sintetizados foi confirmada através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, nomeadamente por ressonância magnética nuclear de protão ( $^1\text{H}$ -RMN) e de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectrometria de massa (MS). Tendo em conta a semelhança espectral entre os diferentes ácidos gordos estudados, procede-se à análise dos espectros do composto à base de ácido palmítico (G0C15), selecionado como composto representativo. Os espectros dos restantes compostos encontram-se incluídos em Anexo.

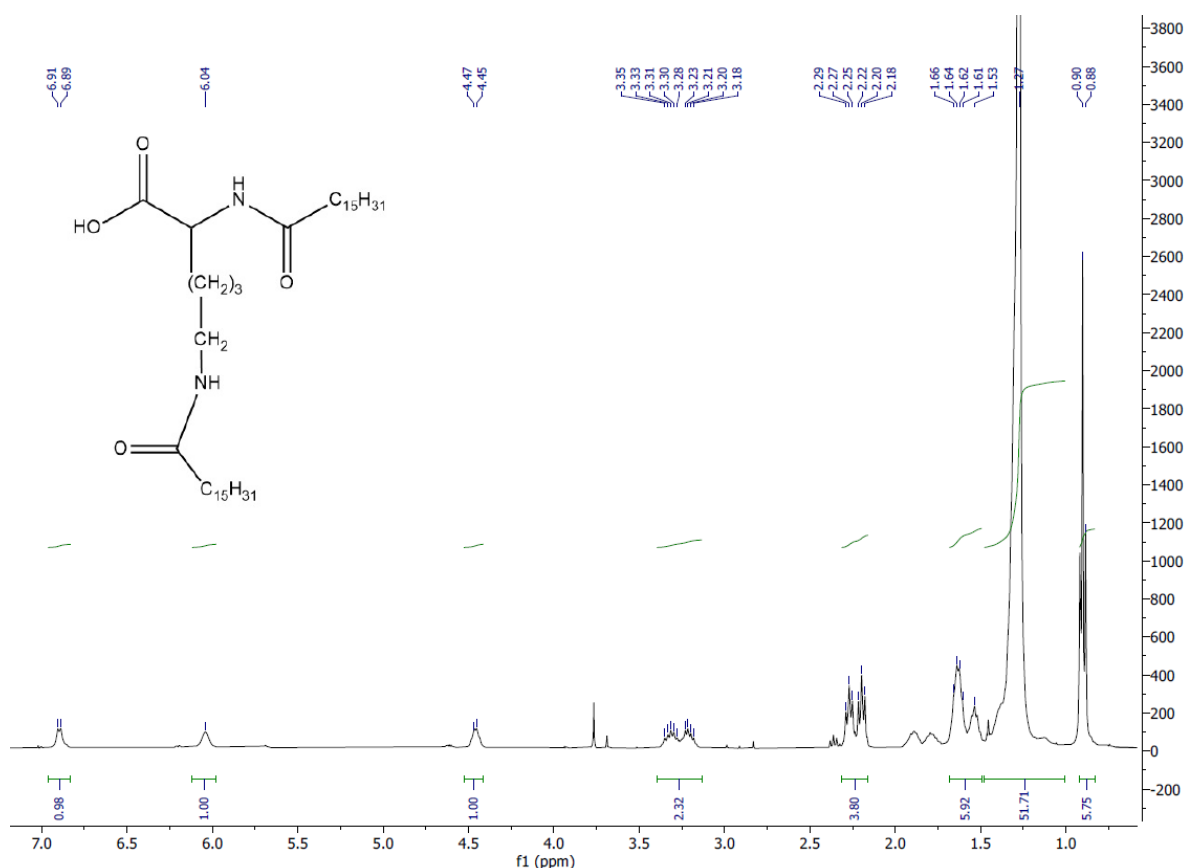
Relativamente à reação de amidação, obteve-se o seguinte espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto G0(COOMe)-C15 (**Figura 48**).



**Figura 48:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto  $\text{G0}(\text{COOMe})\text{-C15}$  realizado em  $\text{CDCl}_3$

A análise do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 48**), confirma o sinal intenso do grupo metílico do éster ( $-\text{COOCH}_3$ ) a  $\delta$  3.06 ppm e evidencia a inserção dos grupos amida através de dois singletos a campo baixo, nomeadamente  $\delta$  5.76 e 6.25 ppm ( $-\text{NH}_2$ ). Os restantes sinais, bem como as respetivas integrações e multiplicidades, encontram-se de acordo com o esperado para o composto sintetizado, comprovando o sucesso da reação de amidação.

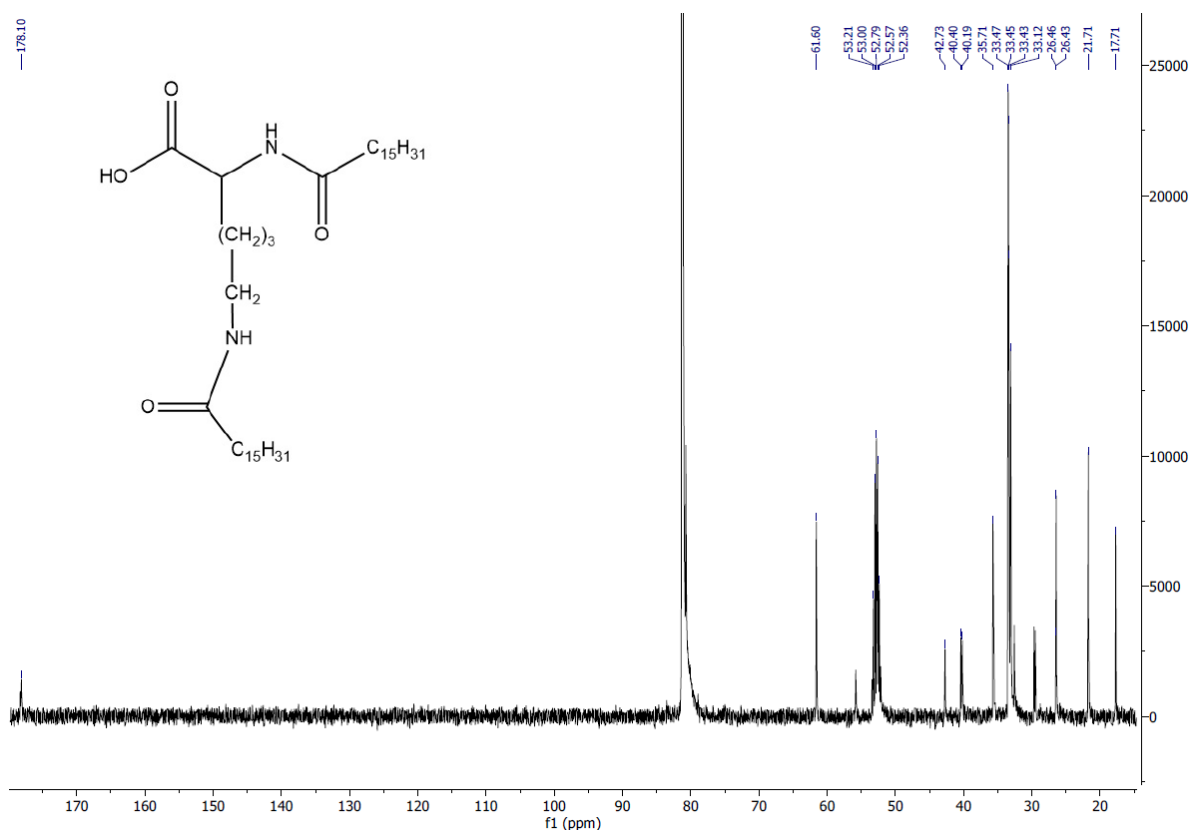
Em seguida, após a reação de hidrólise, obteve-se o seguinte espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para o composto  $\text{G0}(\text{COOH})\text{-C15}$  (**Figura 49**).



**Figura 49:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto G0(COOH)-C15 realizado em CDCl<sub>3</sub>

Por análise do espectro de <sup>1</sup>H-RMN (**Figura 49**), verifica-se o desaparecimento do sinal anteriormente atribuído ao grupo metílico do éster (-COOCH<sub>3</sub>), evidenciando a sua conversão no correspondente ácido carboxílico. Para além disto, permaneceram presentes dois singletos a campo baixo ( $\delta$  6.04 e 6.91 ppm), confirmando que os grupos amidas mantiveram-se estruturalmente intactos durante o processo. Deste modo, a comparação dos espectros <sup>1</sup>H-RMN obtidos (**Figura 48** e **Figura 49**), demonstra que a reação de hidrólise ocorreu seletivamente ao nível do grupo éster, sem comprometer a integridade das restantes funcionalidades da molécula.

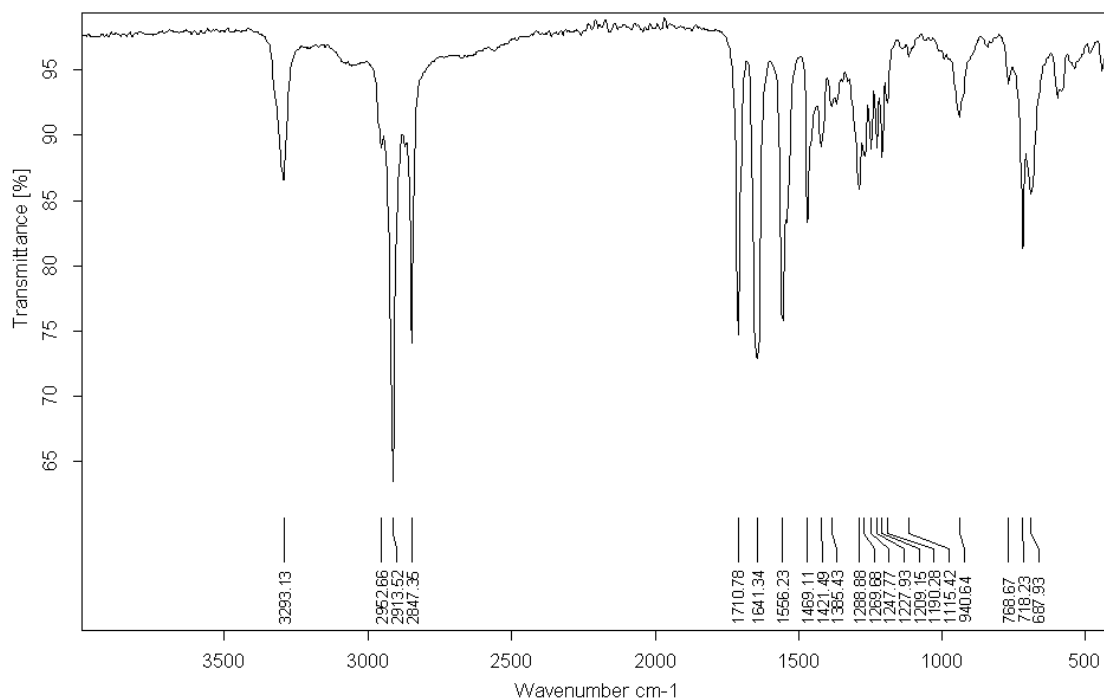
Tendo em conta que a análise por <sup>1</sup>H-RMN evidencia o desaparecimento do sinal característico do CH<sub>3</sub> do grupo éster, procedeu-se à caracterização por <sup>13</sup>C-RMN com o objetivo de confirmar a conversão do grupo éster no correspondente ácido carboxílico. Em seguida, apresenta-se na **Figura 50** o espectro <sup>13</sup>C-RMN do composto G0(COOH)-C15).



**Figura 50:** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do composto G0(COOH)-C15 realizado em  $\text{CDCl}_3$

A análise do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN evidencia a presença de um sinal na região  $\delta$  170–180 ppm, correspondente ao carbono do grupo carboxílico e aos carbonilos das amidas, confirmando que o composto foi hidrolisado. O intenso sinal observado a  $\delta$  80 ppm corresponde ao carbono do solvente deuterado utilizado, clorofórmio-d ( $\text{CDCl}_3$ ), não estando relacionado com a estrutura do composto em estudo. Os restantes sinais do espectro, encontram-se de acordo com a estrutura da molécula, comprovando o sucesso da reação de hidrólise.

A caracterização por FTIR dos compostos, foi realizada com recurso a um espectrômetro equipado com um acessório de refletância total atenuada (ATR), utilizando uma placa de cristal de diamante. A **Figura 51** apresenta o espectro FTIR obtido para o composto G0(COOH)-C15.

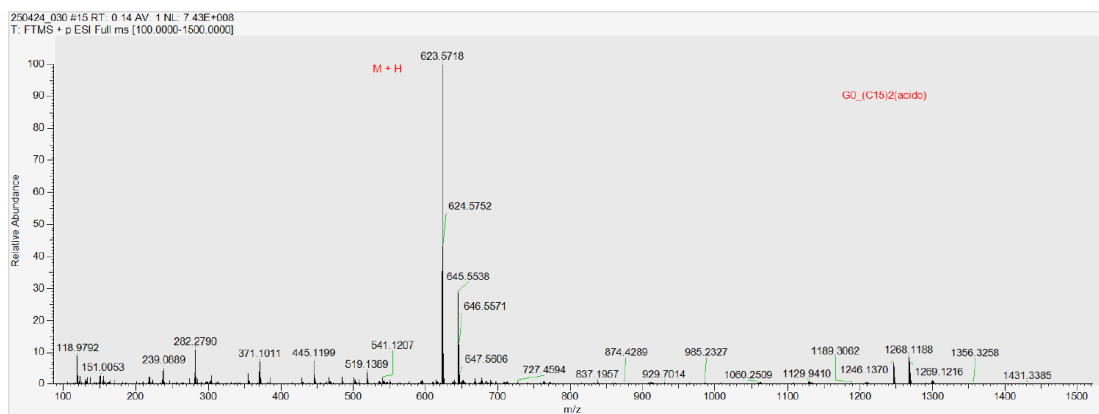


**Figura 51:** Espectro FTIR do composto G0(COOH)-C15

A análise do espectro FTIR confirmou a presença de grupos funcionais característicos do composto em estudo. Em primeiro lugar, detetou-se a presença do grupo carbonilo (C=O), na região 1820–1640  $\text{cm}^{-1}$ . Considerando a presença desta ligação, procedeu-se à identificação dos possíveis grupos funcionais associados.

A banda observada a 2913  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento do grupo hidroxilo (O–H), característica de ácidos carboxílicos. Estes resultados confirmam que o composto é constituído pelo grupo ácido carboxílico. Adicionalmente, verificou-se a presença de uma banda a 3293  $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento N–H, comprovando a presença de grupos amida na estrutura molecular do composto.

Em seguida, a caracterização por espectrometria de massa dos compostos foi realizada utilizando a técnica de ionização por *electrospray* (ESI). A **Figura 52** apresenta o espectro de ESI-MS obtido para o composto G0(COOH)-C15.



**Figura 52:** Espetro de ESI-MS do composto G0(COOH)-C15

A partir da análise do espectro de ESI-MS obtido, é possível identificar um sinal bem definido correspondente ao ião molecular protonado  $[M+H]^+$ , observado a  $m/z$  623.5718. Este valor encontra-se de acordo com a massa molecular teórica calculada para o composto sintetizado, nomeadamente  $m/z$  623.57, evidenciando uma excelente correspondência entre os dados experimentais e os valores previstos. Deste modo, a deteção do ião  $[M+H]^+$  a  $m/z$  623.5718 confirma a obtenção do composto pretendido.

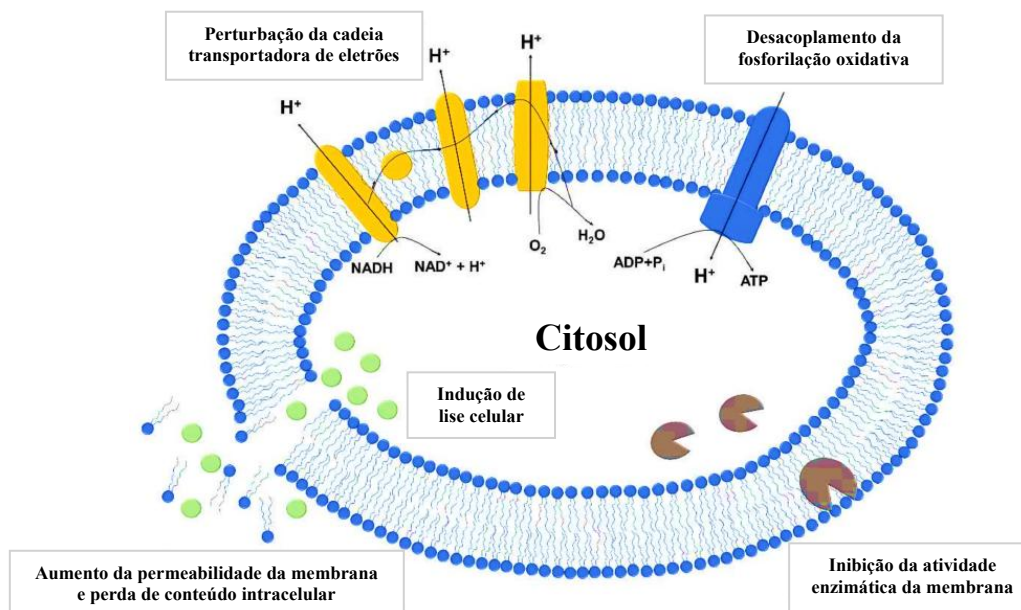
#### 4.2. Estudo da Atividade Antimicrobiana

O presente estudo tem como objetivo avaliar a influência dos revestimentos no crescimento microbiológico, analisando a sua atividade antimicrobiana face a diferentes microrganismos. Os três microrganismos selecionados para o estudo são designadamente *Bacillus cereus*, *Micrococcus* sp. e *Saccharomyces cerevisiae*.

##### 4.2.1. Mecanismos de Atividade Antibacteriana

Os revestimentos em estudo apresentam na sua composição ácidos gordos, que consistem numa cadeia longa de átomos de carbono saturados. Numa extremidade da cadeia encontra-se um grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), de carácter hidrofílico, e a outra extremidade composta pela cadeia hidrocarbonada, possui propriedades hidrofóbicas que confere aos ácidos gordos um carácter global anfipático (Desbois & Smith, 2010).

A **Figura 53** ilustra uma representação dos principais mecanismos de atividade antibacteriana por ácidos gordos ao nível das membranas celulares bacterianas. Para melhor visualização, é apenas ilustrada a membrana celular interna bacteriana.



**Figura 53:** Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação antibacteriana por ácidos gordos nas membranas celulares bacterianas (adaptado de Yoon *et al.*, 2018)

Como representado na **Figura 53**, os ácidos gordos podem afetar a atividade bacteriana, tendo como principal alvo as membranas celulares das bactérias, comprometendo a sua integridade e interferindo em processos essenciais de função celular (Desbois & Smith, 2010; Yoon *et al.*, 2018). Entre os principais processos, destacam-se a cadeia transportadora de elétrões e a fosforilação oxidativa, pois são essenciais para a produção de energia das células. Os dois processos estão interligados, de modo que os ácidos gordos têm a capacidade de interromper o processo da cadeia de transporte de elétrões, ligando-se aos transportadores de elétrões ou alterando a integridade da membrana, bem como interferindo na fosforilação oxidativa, diminuindo o potencial de membrana e o gradiente de prótons (Yoon *et al.*, 2018).

Para além disto, os ácidos gordos podem prejudicar a absorção ativa de nutrientes pelas bactérias, atuando diretamente sobre as proteínas transportadoras, ou indiretamente por redução da disponibilidade de ATP (Setlow, 2016). Adicionalmente, a ação dos ácidos gordos pode envolver a inibição da atividade enzimática, nomeadamente desidrogenases da cadeia respiratória; formação de produtos tóxicos resultantes de peroxidação e auto-oxidação lipídica; e desorganização de proteínas associadas à membrana (Setlow, 2016).

Deste modo, a desestabilização da membrana celular pode causar o aumento da permeabilidade celular e lise celular, levando à inibição do crescimento celular bacteriano (ação bacteriostática) ou à morte celular (ação bactericida) (Yoon *et al.*, 2018).

4.2.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana em *Bacillus cereus*

A avaliação da atividade antimicrobiana para a bactéria *Bacillus cereus*, foi realizada em meio de cultura líquido (NB), sendo testado cada revestimento em três concentrações diferentes, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm. Os resultados relativos à taxa de inibição do crescimento (%) desta estirpe apresentam-se na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Taxa de inibição do crescimento da bactéria *Bacillus cereus*, em três concentrações diferentes dos revestimentos aplicados, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm (a: solução pura; b: solução diluída 2.5x; c: solução diluída 5x)

| Revestimento           | Taxa de Inibição (%) |                   |                   |
|------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
|                        | 100 ppm              | 200 ppm           | 500 ppm           |
| G0C7                   | 0                    | 0                 | 0                 |
| G1C7                   | 11,0                 | 37,2              | 48,7              |
| G0C15                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| G1C15                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| G0C19                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| G1C19                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| G0C21                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| G1C21                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| Revestimento Comercial | 43,4 <sup>c</sup>    | 63,4 <sup>b</sup> | 83,5 <sup>a</sup> |
| Vancomicina            | 27,7                 | 31,9              | 38,0              |

De acordo com a **Tabela 3**, verifica-se que G1C7 foi o único composto que induziu inibição ao crescimento desta estirpe, e que um aumento da concentração do composto se reflete numa maior inibição. Também se observa potencial antimicrobiano para o composto comercial nesta estirpe, e que o aumento da sua concentração também se reflete numa maior inibição. Assim, podemos considerar que apenas um revestimento foi eficaz na redução da taxa de crescimento de *B. cereus*.

O modo de ação dos compostos anfipáticos em estudo baseia-se na perturbação da membrana celular bacteriana, conduzindo à perda da sua integridade estrutural e, conseqüentemente, à inibição do crescimento microbiano (Setlow, 2016). Os resultados sugerem que, existe um comprimento ótimo de cadeia alifática que perturba a integridade membranar bacteriana, nomeadamente o ácido gordo de cadeia mais curta (C7), e que cadeias alifáticas mais longas (C15, C19 e C21) não evidenciam qualquer atividade antimicrobiana para a presente estirpe.

Tal pode estar relacionado com os aumentos do comprimento das cadeias hidrocarbonadas que conferem maior carácter hidrofóbico à molécula, reduzindo a sua polaridade. Consequentemente, a sua solubilidade diminui, o que limita a capacidade do composto para interagir com a membrana plasmática do microrganismo. Adicionalmente, o maior carácter hidrofóbico dos compostos pode dificultar o acesso dos grupos lisina à superfície bacteriana, comprometendo a sua interação com os constituintes da membrana de *Bacillus cereus*, pois sendo a lisina a fração polar responsável pela interação com a membrana dos microrganismos, a sua menor disponibilidade funcional traduz-se numa redução do efeito antimicrobiano.

Para além disto, o facto de apenas a geração 1 do composto G1C7 apresentar atividade (contendo quatro grupos lisina e quatro caudas hidrofóbicas), enquanto a geração 0 do composto G0C7 não evidencia efeito (contendo apenas dois grupos lisina e duas caudas hidrofóbicas), sugere que um maior número de grupos lisina e caudas hidrofóbicas potencia a interação com a membrana celular bacteriana. Este aumento da densidade de carga positiva da molécula favorece as interações com os fosfolípidos aniónicos da membrana, intensificando a desorganização estrutural e, consequentemente, o efeito antimicrobiano.

### 4.2.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana em *Micrococcus* sp.

A avaliação da atividade antimicrobiana para a bactéria *Micrococcus* sp., foi realizada em meio de cultura líquido (NB), testando cada revestimento em três concentrações diferentes, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm. Os resultados relativos à taxa de inibição do crescimento (%) desta estirpe apresentam-se na **Tabela 4**.

De entre os compostos estudados, verifica-se que o composto G1C7 inibiu o crescimento da estirpe para uma concentração mínima de 200 ppm, e que um aumento da concentração do composto implicou uma maior inibição. Alguns compostos induziram inibição ao crescimento da bactéria para a menor concentração estudada (100 ppm), não se verificando uma correlação entre o aumento da concentração do composto e o seu efeito inibidor. Observou-se também potencial antimicrobiano no composto comercial para esta estirpe, e que o aumento da sua concentração se reflete numa maior inibição.

**Tabela 4:** Taxa de inibição do crescimento da bactéria *Micrococcus* sp., em três concentrações diferentes dos revestimentos aplicados, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm (a: solução pura; b: solução diluída 2.5x; c: solução diluída 5x)

| Revestimento                  | Taxa de Inibição (%) |                   |                   |
|-------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
|                               | 100 ppm              | 200 ppm           | 500 ppm           |
| <b>G0C7</b>                   | 0                    | 0                 | 0                 |
| <b>G1C7</b>                   | 0                    | 22.5              | 43.4              |
| <b>G0C15</b>                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| <b>G1C15</b>                  | 10.6                 | 0                 | 0                 |
| <b>G0C19</b>                  | 0                    | 0                 | 0                 |
| <b>G1C19</b>                  | 2.4                  | 0                 | 0                 |
| <b>G0C21</b>                  | 0,6                  | 0                 | 0                 |
| <b>G1C21</b>                  | 15.1                 | 0                 | 0                 |
| <b>Revestimento Comercial</b> | 24.1 <sup>c</sup>    | 37.4 <sup>b</sup> | 67.5 <sup>a</sup> |
| <b>Vancomicina</b>            | 90.8                 | 88.3              | 94.5              |

Tendo em conta que o mecanismo de ação dos compostos anfipáticos está associado à sua capacidade de interagir com a membrana celular bacteriana, levando à perda da sua integridade estrutural e à consequente inibição do crescimento microbiano (Setlow, 2016), os resultados obtidos na **Tabela 4**, podem estar associados à ação do grupo polar lisina, cuja carga positiva favorece interações com os fosfolípidos aniónicos da membrana, promovendo a sua desorganização. Assim, uma maior disponibilidade funcional dos grupos lisina traduz-se num aumento do efeito antimicrobiano. Neste sentido, apenas os compostos de geração 1 (G1), que possuem quatro grupos lisina e quatro caudas hidrofóbicas, demonstram atividade, sugerindo que a presença de um maior número de grupos lisina e caudas hidrofóbicas potencia a interação com a membrana bacteriana. Em contraste, os compostos de geração 0 (G0) com apenas dois grupos lisina, não evidenciam atividade relevante para a estirpe em estudo, com exceção do G0C21, cuja inibição inferior a 1% é pouco significativa.

Os resultados indicam que todos os ácidos gordos incluídos no composto G1, com diferentes comprimentos de cadeia alifática (C7, C15, C19 e C21), apresentam capacidade de interação com a membrana bacteriana, sendo os melhores resultados obtidos pelo ácido gordo de cadeia mais curta (G1C7). O facto de o efeito se verificar apesar do maior comprimento das cadeias hidrocarbonadas, sugere que, relativamente ao mecanismo de ação contra esta estirpe, o aumento do carácter hidrofóbico não

compromete o acesso dos grupos lisina à superfície celular, nem a sua interação com os constituintes da membrana bacteriana de *Micrococcus* sp..

Verifica-se ainda que o ácido gordo de cadeia mais curta (C7) não apresenta efeito inibitório na menor concentração testada (100 ppm), indicando a necessidade de concentrações superiores (200 e 500 ppm) para exercer atividade antimicrobiana. Por outro lado, os compostos com cadeias alifáticas mais longas (C15, C19 e C21) demonstram inibição a 100 ppm, sendo que a atividade antimicrobiana é alcançada na concentração mínima testada.

Neste sentido, os resultados obtidos evidenciam uma resposta distinta entre as duas bactérias, *Bacillus cereus* e *Micrococcus* sp. aos revestimentos aplicados, verificando-se maior suscetibilidade da *Micrococcus* sp. a perturbações hidrofóbicas, e conseqüentemente à inibição do crescimento.

A bactéria *Micrococcus* sp., na presença de ácidos gordos de cadeia longa, apresenta elevada permeabilização da membrana e rápida perda de viabilidade devido à facilidade de adsorção destes compostos à superfície celular e à penetração da fração hidrofóbica na bicamada lipídica (Desbois & Smith, 2010; Yoon *et al.*, 2018). Esta interação conduz à desorganização da membrana, perda de integridade celular e conseqüente inibição do crescimento bacteriano, explicando assim a maior eficácia das formulações testadas contra este microrganismo (Skipper *et al.*, 2022).

Por outro lado, *B. cereus* apresenta menor suscetibilidade aos compostos testados, sendo ativa apenas a formulação com cadeia C7 na geração 1. Tal pode refletir diferenças na fluidez membranar, composição lipídica e organização estrutural da membrana desta estirpe, que condicionam a interação dos compostos anfifílicos com a membrana microbiana.

#### **4.2.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana em *Saccharomyces cerevisiae***

A avaliação da atividade antimicrobiana para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada em meio de cultura líquido (NB), testando cada revestimento em três concentrações diferentes, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm. Os resultados relativos à taxa de inibição do crescimento (%) desta estirpe encontram-se na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Taxa de inibição do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em três concentrações diferentes dos revestimentos aplicados, nomeadamente 100, 200 e 500 ppm (a: solução pura; b: solução diluída 2.5x; c: solução diluída 5x)

| Revestimento                  | Taxa de Inibição (%) |                   |                   |
|-------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
|                               | 100 ppm              | 200 ppm           | 500 ppm           |
| <b>G0C7</b>                   | 0                    | 0                 | 46.0              |
| <b>G1C7</b>                   | 23.0                 | 69.9              | 93.4              |
| <b>G0C15</b>                  | 40.0                 | 0                 | 0                 |
| <b>G1C15</b>                  | 0                    | 36.7              | 25.4              |
| <b>G0C19</b>                  | 22.9                 | 0                 | 0                 |
| <b>G1C19</b>                  | 56.1                 | 43.1              | 0                 |
| <b>G0C21</b>                  | 52.6                 | 29.5              | 0                 |
| <b>G1C21</b>                  | 56.8                 | 41.9              | 0                 |
| <b>Revestimento Comercial</b> | 98.0 <sup>c</sup>    | 96.7 <sup>b</sup> | 80.6 <sup>a</sup> |
| <b>Anfotericina B</b>         | 100.0                | 100.0             | 100.0             |

Por análise da **Tabela 5**, verifica-se que o composto G1C7 induziu inibição no crescimento da estirpe, e que um aumento da concentração do composto se reflete numa maior inibição, estando de acordo com os resultados obtidos para os microrganismos *Bacillus cereus* e *Micrococcus* sp. O composto G0C7 revelou inibição ao crescimento da estirpe, mas apenas para a concentração mais elevada (500 ppm). Em contraste, a maioria dos compostos induziram inibição ao crescimento da estirpe para as menores concentrações estudadas (100 ppm e 200 ppm). Adicionalmente, verifica-se uma maior taxa de inibição para a menor concentração (100 ppm), não demonstrando uma correlação entre o aumento da concentração do composto e o seu efeito inibidor. Relativamente ao composto comercial face a esta estirpe, verifica-se potencial antimicrobiano, no entanto não é verificada correlação entre a sua concentração e o seu efeito inibitório.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariótico cuja membrana plasmática rica em ergosterol (essencial para a viabilidade celular), constitui o principal alvo da ação dos ácidos gordos. A maior complexidade estrutural da levedura implica alvos moleculares adicionais, aumentando a suscetibilidade a compostos anfipáticos, que por sua vez conduzem à desorganização da membrana plasmática e comprometem funções celulares vitais (Desbois & Smith, 2010).

Os resultados obtidos para *Saccharomyces cerevisiae* demonstram que todos os compostos sintetizados apresentam efeito antimicrobiano contra esta estirpe, salientando que os compostos contendo ácidos gordos de cadeia mais curta (C7) exibiram um maior potencial inibitório. Este padrão é consistente com o observado para os microrganismos analisados anteriormente, reforçando a influência do comprimento da cadeia alifática na atividade biológica dos compostos anfifílicos.

Contudo, para os compostos G1C15, G1C19, G0C21 e G1C21, apesar de se observar atividade antimicrobiana, não se verifica uma correlação direta entre a concentração e o efeito inibitório, registando-se perda de atividade em concentrações mais elevadas. Este comportamento pode estar associado à natureza anfifílica dos compostos, que induz a formação de agregados moleculares com o aumento da concentração, reduzindo a fração ativa disponível para interação com a membrana celular. Deste modo, diminui a dispersão dos compostos no meio e limita a sua biodisponibilidade, comprometendo a eficácia antimicrobiana (Loffredo *et al.*, 2020; Vazquez-Muñoz *et al.*, 2019).

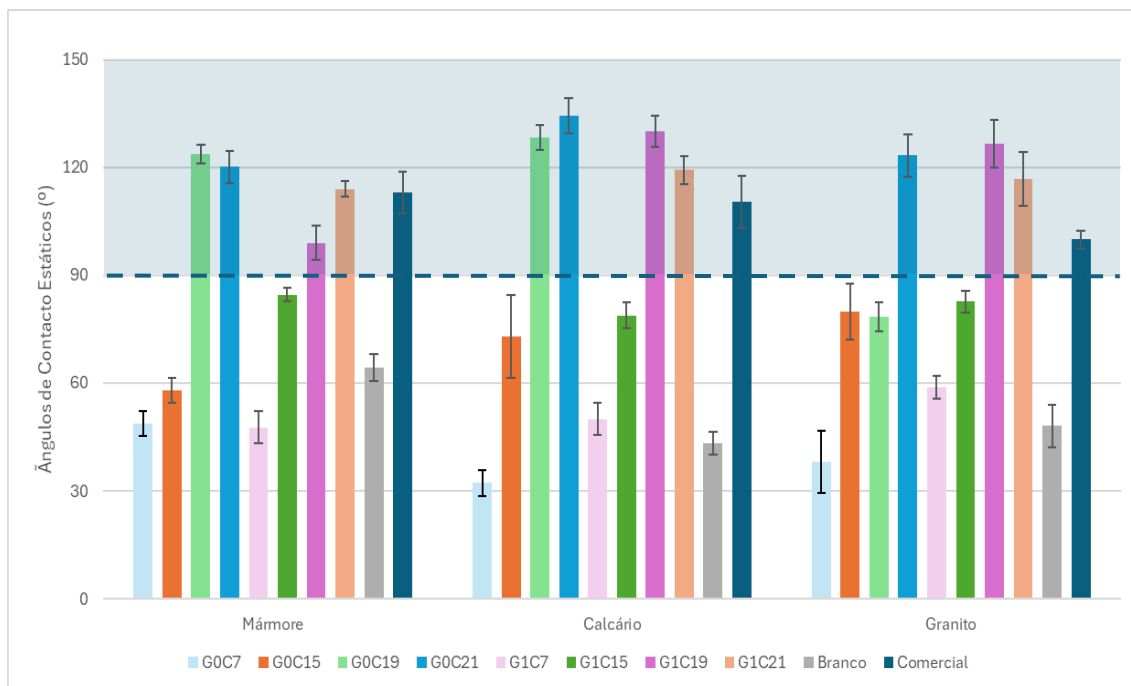
Assim, a atividade observada a concentrações mais baixas pode refletir maior disponibilidade de moléculas dispersas, enquanto concentrações superiores promovem agregação, redução da solubilidade e consequente diminuição da atividade biológica. Portanto, o aumento do comprimento da cadeia influencia a sua atividade antimicrobiana até certo ponto, após o qual a atividade diminui devido a agregação, reduzindo a atividade microbiológica (Loffredo *et al.*, 2020; Vazquez-Muñoz *et al.*, 2019).

### 4.3. Estudo das Propriedades Hidrofóbicas por Tensiometria Ótica

O ensaio de tensiometria ótica decorreu através da medição dos ângulos de contacto estáticos ( $\theta$ ) de gotas de água depositadas sobre a superfície das pedras em estudo, nomeadamente mármore, calcário e granito. Com a realização deste ensaio, pretende-se averiguar a eficácia hidrofóbica dos revestimentos sintetizados depois da aplicação destes nas pedras, bem como a manutenção das suas propriedades após os ensaios de envelhecimento acelerado (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).

### 4.3.1. Estudo da Eficácia dos Revestimentos

Um revestimento hidrofóbico é considerado eficaz quando a superfície pétreo apresenta ângulos de contato com a água superiores a  $90^\circ$  ( $\theta > 90^\circ$ ). Na **Figura 54**, encontram-se os resultados dos ângulos de contato estáticos obtidos para os diferentes substratos em estudo.



**Figura 54:** Representação gráfica da eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados, com base nos ângulos de contato estáticos da água medidos em diferentes litotipos

Por observação gráfica da **Figura 54**, verifica-se que os resultados obtidos variam entre os diferentes litotipos, devido aos diferentes níveis de porosidade de cada um. De acordo com a literatura consultada, era expectável que o calcário apresentasse ângulos de contacto mais elevados, uma vez que possui maior a porosidade aberta quando comparado com o mármore e o granito (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).

É possível observar que o revestimento comercial e quatro dos revestimentos sintetizados, nomeadamente G0C19, G0C21, G1C19 e G1C21, exibiram comportamento hidrofóbico quando aplicados nas pedras de calcário e mármore, evidenciando valores de ângulos de contacto com a água superiores a  $90^\circ$ , compreendidos entre  $99^\circ$  e  $134^\circ$ . No caso do granito, apenas o comercial e três destes revestimentos demonstram eficácia hidrofóbica, designadamente G0C21, G1C19 e G1C21. Portanto, os resultados indicam que 50 % das formulações sintetizadas apresentam propriedades hidrofóbicas quando aplicados nestes litotipos, sendo a única exceção o composto G0C19 para o substrato de

granito, com ângulo de contacto estático inferior a 90°. Adicionalmente, observa-se que os revestimentos G0C7, G0C15, G1C0 e G1C15 não possuem eficácia hidrofóbica independentemente da superfície da pedra na qual sejam aplicados.

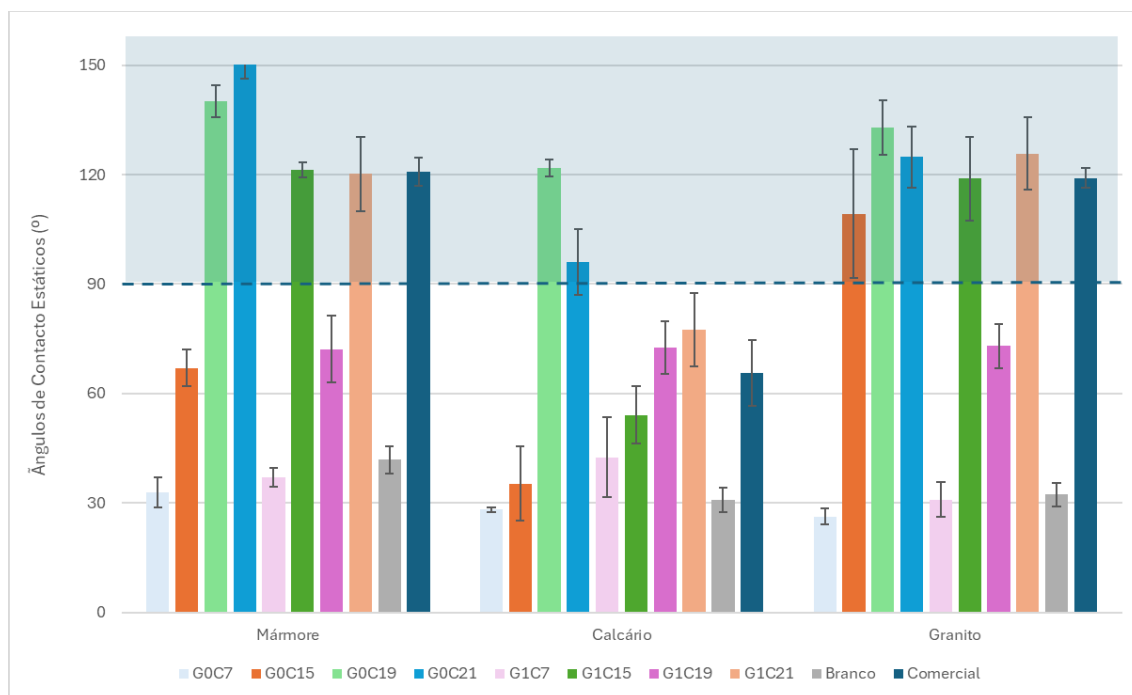
A principal característica que diferencia os revestimentos entre si é o comprimento das cadeias alifáticas dos ácidos gordos, a qual tem influência nos resultados obtidos. Formulações com cadeias alifáticas mais curtas, compostas por 7 ou 15 átomos de carbono, não evidenciam comportamento hidrofóbico ( $\theta < 90^\circ$ ), no entanto, cadeias alifáticas mais longas constituídas por 19 ou 21 átomos de carbono apresentam maior eficácia, evidenciado por ângulos de contato estáticos mais elevados ( $\theta > 90^\circ$ ). Assim, considera-se que o comprimento da cadeia de carbonos dos ácidos gordos tem influência na eficiência hidrofóbica. Relativamente às gerações dendríticas, estas não se revelam determinantes na compreensão do comportamento hidrofóbico dos compostos, uma vez que tanto compostos de geração 0 como de geração 1 apresentam desempenho hidrofóbico semelhante quando associados a cadeias longas.

Adicionalmente, importa salientar que o comportamento hidrofóbico dos revestimentos também pode depender da sua distribuição na matriz pétreia. Quando permanecem predominantemente à superfície, formam uma camada contínua repelente à água, traduzida em ângulos de contacto estáticos mais elevados. Em contrapartida, se ocorrer penetração na rede porosa dos litotipos, parte do revestimento deixa de estar exposta na superfície, podendo conduzir a valores de ângulos de contacto estáticos inferiores (Hashim *et al.*, 2024).

### 4.3.2. Estudo da Durabilidade dos Revestimentos por Tensiometria Ótica

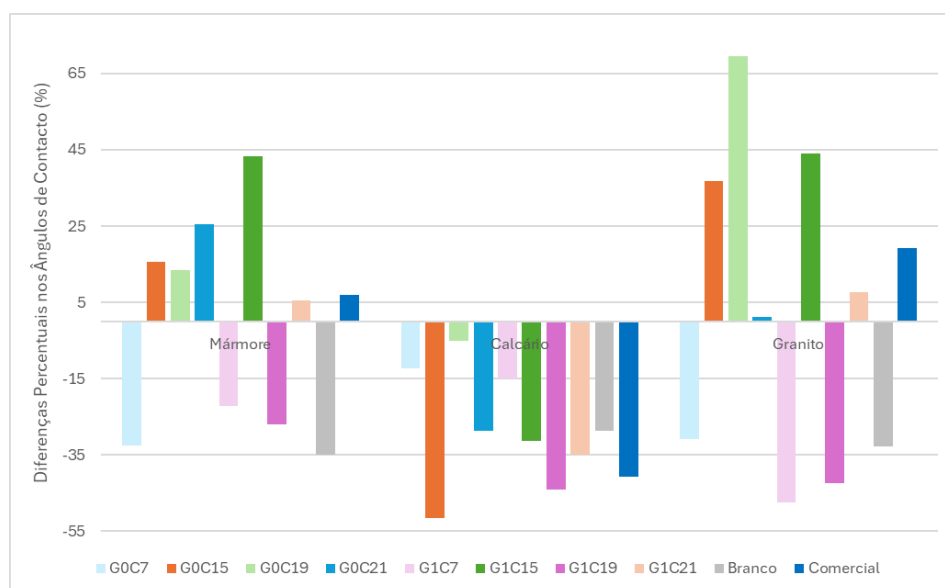
Para averiguar a durabilidade da eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados, foram medidos os ângulos de contato estáticos de gotas de água depositadas sobre a superfície das pedras, após exposição dos provetes em câmara de envelhecimento acelerado. Os resultados obtidos após o processo de envelhecimento são comparados com os resultados de pré-envelhecimento obtidos na secção 4.3.1. É esperado que os revestimentos apresentem perda mínima das suas propriedades após o envelhecimento acelerado, de forma a demonstrarem maior durabilidade a longo prazo em condições reais (Hashim *et al.*, 2024).

Os resultados dos ângulos de contato estáticos obtidos para os diferentes substratos em estudo encontram-se na **Figura 55** (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).



**Figura 55:** Representação gráfica da durabilidade da eficácia hidrofóbica dos revestimentos aplicados, com base nos ângulos de contato estáticos da água medidos nos diferentes litotipos após ensaio de envelhecimento acelerado

De forma a facilitar a interpretação e comparação entre a **Figura 54** e **Figura 55**, apresenta-se a **Figura 56** que ilustra a variação percentual dos resultados obtidos antes e depois do ensaio de envelhecimento, relacionando os valores dos ângulos de contacto medidos após a aplicação dos revestimentos nas pedras com aqueles registados após o envelhecimento acelerado, permitindo uma visualização mais clara da evolução percentual da eficácia hidrofóbica.



**Figura 56:** Representação gráfica da variação percentual dos ângulos de contacto estáticos obtidos antes e depois do ensaio de envelhecimento acelerado, para cada revestimento aplicado nos diferentes litotipos em estudo

Numa análise inicial da **Figura 56**, verifica-se que ocorreu em todos os substratos, uma diminuição dos ângulos de contacto em três dos revestimentos sintetizados, nomeadamente G0C7, G1C7 e G1C19. Contudo, a diminuição observada nos compostos G0C7 e G1C7 tem um impacto pouco significativo nos resultados, uma vez que estes revestimentos já não apresentavam carácter hidrofóbico antes do ensaio de envelhecimento (**Figura 54**), mantendo assim a ausência de eficácia hidrofóbica após o ensaio (**Figura 55**). Em contraste, o composto G1C19 destaca-se por apresentar, antes do ensaio de envelhecimento acelerado, valores de ângulos de contacto superiores a  $90^\circ$  em todos os substratos avaliados ( $99^\circ$  no mármore,  $130^\circ$  no calcário e  $127^\circ$  no granito), sendo por isso considerado um revestimento hidrofóbico (**Figura 54**). No entanto, após o envelhecimento, observa-se pela **Figura 55** que a formulação obteve, em todos os substratos, ângulos de contacto inferiores ao limite de hidrofobicidade definido ( $\theta > 90^\circ$ ), tendo como consequência a diminuição da eficácia hidrofóbica em 27 % no mármore, 44 % no calcário e 42 % no granito, face aos resultados obtidos antes do envelhecimento (**Figura 56**), não conferindo assim hidrofobicidade às pedras após o envelhecimento.

Outro aspeto evidente na análise da **Figura 56** é que, no substrato de calcário, todos os revestimentos demonstraram diminuição dos ângulos de contacto estáticos, indicando que, quando expostas a condições ambientais adversas, as formulações tendem a perder eficácia hidrofóbica ao longo do tempo, em substratos mais porosos. Neste

sentido, por análise da **Figura 54** e da **Figura 55**, verifica-se que os revestimentos que não apresentavam eficácia hidrofóbica antes do ensaio de envelhecimento mantiveram esse comportamento após o ensaio. Por outro lado, os revestimentos que inicialmente eram hidrofóbicos, nomeadamente G1C19, G1C21 e Comercial, obtiveram ângulos de contacto inferiores a  $90^\circ$  após o ensaio de envelhecimento (**Figura 55**) com uma diminuição dos ângulos em 44 %, 35 % e 41 %, respetivamente, face aos resultados obtidos antes do envelhecimento (**Figura 56**). Portanto, estes revestimentos diminuíram a hidrofobicidade do calcário, tornando-o hidrofílico, evidenciando fraca durabilidade ao longo do tempo. Em contraste, os revestimentos G0C19 e G0C21 foram os únicos que mantiveram ângulos de contacto estáticos superiores a  $90^\circ$  no substrato de calcário (**Figura 55**), evidenciando durabilidade quando sujeitos a condições ambientais adversas, apesar da diminuição dos seus ângulos de contacto após o envelhecimento (- 5 % no G0C19 e - 29 % no G0C21) conforme ilustrado na **Figura 56**.

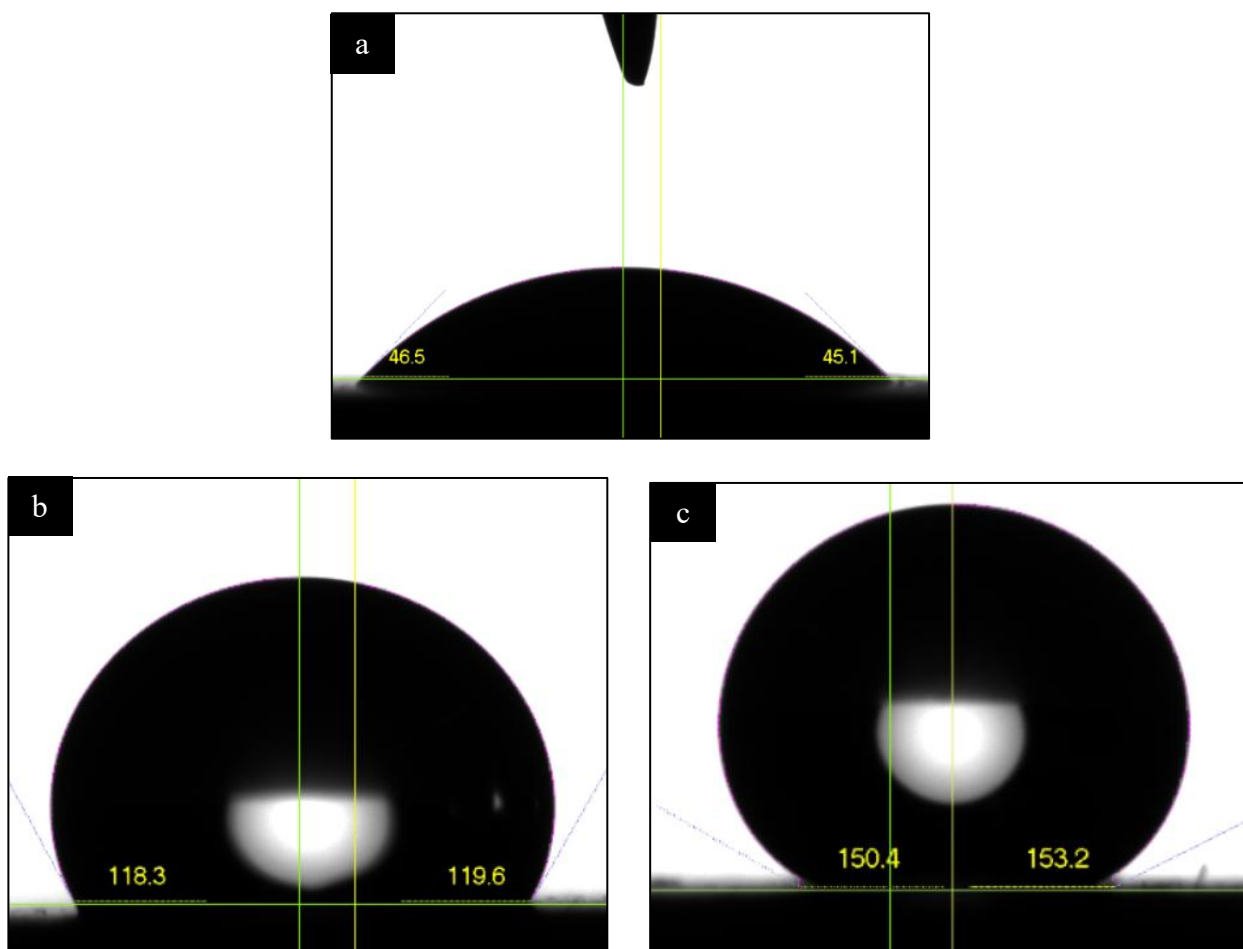
Por observação gráfica da **Figura 56**, verifica-se que nos litotipos de mármore e granito, o revestimento comercial e cinco dos revestimentos sintetizados (G0C15, G0C19, G0C21, G1C15 e G1C21) apresentaram um aumento dos ângulos de contacto estáticos após o ensaio de envelhecimento acelerado. No substrato de mármore, o revestimento G0C15 manteve ângulos de contacto inferiores ao limite de hidrofobicidade estabelecido ( $\theta > 90^\circ$ ), pelo que o aumento observado não foi suficiente para conferir eficácia hidrofóbica (**Figura 55**). Em contraste, no substrato de granito, este revestimento evidenciou um aumento significativo de 37 % dos ângulos de contacto (**Figura 56**) relativamente aos valores iniciais (**Figura 54**), permitindo atingir ângulos de contacto superiores a  $90^\circ$  ( $\approx 109^\circ$ ) após o envelhecimento (**Figura 55**), acentuando a eficácia hidrofóbica na pedra.

Uma situação semelhante foi observada para o composto G0C19 no substrato de granito. Inicialmente, este revestimento apresentava ângulos de contacto estáticos inferiores ao limite de hidrofobicidade definido ( $\theta > 90^\circ$ ), não evidenciando eficácia hidrofóbica antes do ensaio de envelhecimento (**Figura 54**). Contudo, após o ensaio, registou-se uma melhoria de 70 % nos ângulos de contacto estáticos medidos (**Figura 56**) atingindo valores próximos de  $133^\circ$  (**Figura 55**), passando assim a conferir hidrofobicidade à pedra. No caso do mármore, o mesmo composto apresentou um aumento de 13 % nos ângulos de contacto estáticos (**Figura 56**) comparativamente às

amostras não envelhecidas (**Figura 54**), reforçando a eficácia hidrofóbica previamente existente, com ângulos de contacto da ordem dos 140° (**Figura 55**).

Para além disto, nos substratos de mármore e granito, o composto G1C15 obteve antes do ensaio de envelhecimento ângulos de contacto estáticos inferiores a 90°, não sendo, por isso, considerado como hidrofóbico (**Figura 54**). Contudo, após o ensaio de envelhecimento acelerado, este revestimento evidenciou um aumento de 43 % nos ângulos de contacto do mármore e de 44 % do granito, relativamente aos valores iniciais (**Figura 56**), passando a apresentar eficácia hidrofóbica que anteriormente não possuía nestes substratos. Os ângulos de contacto do composto G1C15 após o ensaio de envelhecimento, atingiram valores de aproximadamente 121° no mármore e 119° no granito (**Figura 55**). Deste modo, podemos afirmar que o ensaio de envelhecimento acelerado melhorou as propriedades dos revestimentos G0C15, G0C19 e G1C15, permitindo capacitá-los de eficácia hidrofóbica, evidenciando assim durabilidade ao longo do tempo.

No caso dos revestimentos G0C21, G1C21 e do produto comercial, estes mantiveram ângulos de contacto estáticos superiores a 90° após o envelhecimento, reforçando a sua eficácia hidrofóbica nos substratos de mármore e granito, conforme ilustrado na **Figura 55**. É de realçar que, no mármore, o composto G0C21 evidenciou um aumento de 25 % relativamente aos valores iniciais (**Figura 56**), sendo o único revestimento a atingir ângulos de contacto estáticos da ordem dos 151°, conferindo superhidrofobicidade à pedra de mármore ( $\theta > 150^\circ$ ). Assim, evidencia-se a durabilidade eficaz destes revestimentos nos substratos de mármore e granito após serem sujeitos a condições de envelhecimento acelerado.



**Figura 57:** Imagens de tensiometria ótica obtidas para o substrato de mármore: (a) ângulos de contacto da pedra sem revestimento (branco); (b) ângulos de contacto após aplicação do revestimento G0C21; (c) ângulos de contacto após envelhecimento do revestimento G0C21

Neste sentido, os resultados revelam que 48 % das amostras em estudo apresentam comportamento hidrofóbico ou superhidrofóbico, conferindo aos litotipos propriedades repelentes à água após o envelhecimento acelerado, melhorando assim a durabilidade hidrofóbica dos revestimentos. Esta durabilidade pode ser atribuída à forte adesão dos revestimentos aos substratos pétreos, em que os revestimentos se infiltram nos poros da pedra e estabelecem uma forte ligação com a matriz do substrato (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024). A melhoria da adesão e da infiltração dos revestimentos nos substratos, contribui para uma maior resistência dos mesmos ao desgaste após o envelhecimento acelerado.

É importante salientar que, de acordo com literatura consultada, já era expectável que os revestimentos apresentassem menor durabilidade quando aplicados em pedras naturais mais porosas, como o calcário, conforme evidenciado pelos resultados obtidos

após o envelhecimento, nos quais este substrato perde propriedades hidrofóbicas e se torna hidrofílico para a maioria das amostras (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).

Por outro lado, os litotipos de mármore e granito mantêm o seu carácter hidrofóbico, sendo o granito aquele que apresenta o maior número de revestimentos com durabilidade hidrofóbica, por ser o substrato com menor porosidade, seguido do mármore. A hidrofobicidade das amostras diminui significativamente após o envelhecimento possivelmente devido à exposição a ciclos alternados de radiação UV e humidade na câmara de envelhecimento. As condições ambientais simuladas nos ensaios de envelhecimento acelerado causam alterações físicas e químicas, induzindo a formação de microfissuras e poros que permitem a infiltração de água nas pedras naturais, diminuindo assim a sua hidrofobicidade e, conseqüentemente, a durabilidade dos compostos (Armal *et al.*, 2023; Hashim *et al.*, 2024).

Deste modo, podemos afirmar que o ensaio de envelhecimento acelerado, com simulação de condições de intemperismo artificial, é uma ferramenta adequada para avaliar a durabilidade de revestimentos para proteção pétreo.

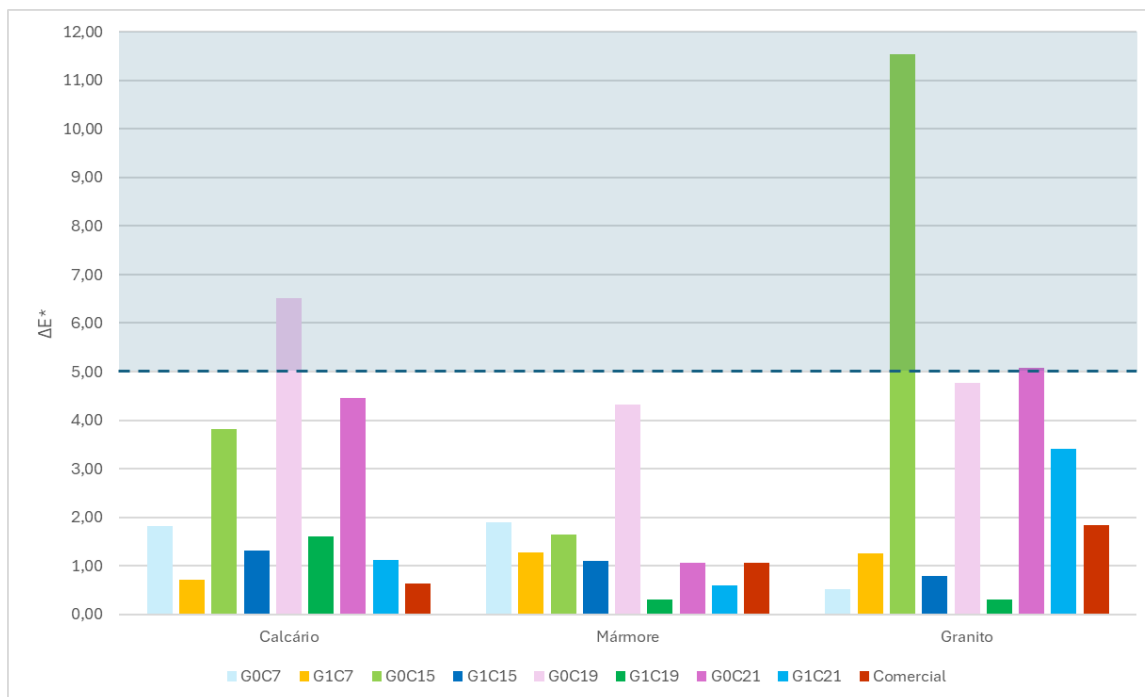
#### **4.4. Avaliação de Alteração Cromática nos Litotipos**

A aplicação de revestimentos protetores exige que os tratamentos não provoquem alterações estéticas perceptíveis nos materiais, sendo que as variações de cor são frequentemente as primeiras a serem identificadas a macroscopicamente antes de qualquer análise instrumental aplicada (Silva *et al.*, 2024). No desenvolvimento de novas formulações para materiais pétreos, a variação visível de cor é considerada uma característica indesejável, pois pode ter um impacto considerável no valor histórico, comercial ou estético da Pedra Natural.

##### **4.4.1. Estudo da Compatibilidade Estética dos Revestimentos**

No património cultural, a avaliação da variação de cor na pedra é normalmente efetuada recorrendo ao sistema CIELAB, pois é uma técnica analítica não invasiva e determina com precisão efeitos que ocorram na coloração original (Dias *et al.*, 2020b). Através da determinação dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foi possível calcular a diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) antes e após a aplicação de revestimentos nos materiais pétreos (Dias *et al.*, 2020b). Considera-se que um  $\Delta E^* < 5$  é aceitável neste contexto, pois quaisquer diferenças cromáticas abaixo deste limiar não podem ser detetáveis pelo *olho nu* (Silva *et*

al., 2024). A **Figura 58** apresenta os resultados de  $\Delta E^*$  obtidos para os substratos em estudo.



**Figura 58:** Representação gráfica do  $\Delta E^*$  para os revestimentos aplicados nas amostras pétreas de calcário, mármore e granito

De acordo com a **Figura 58**, verifica-se que os valores de  $\Delta E^*$  obtidos para o mármore são inferiores a 5, indicando que a aplicação dos revestimentos não induziu alterações cromáticas perceptíveis na cor natural desta pedra, de acordo com o limite proposto na literatura citada (Silva *et al.*, 2024). Estes resultados evidenciam a compatibilidade de todos os revestimentos com este litotipo.

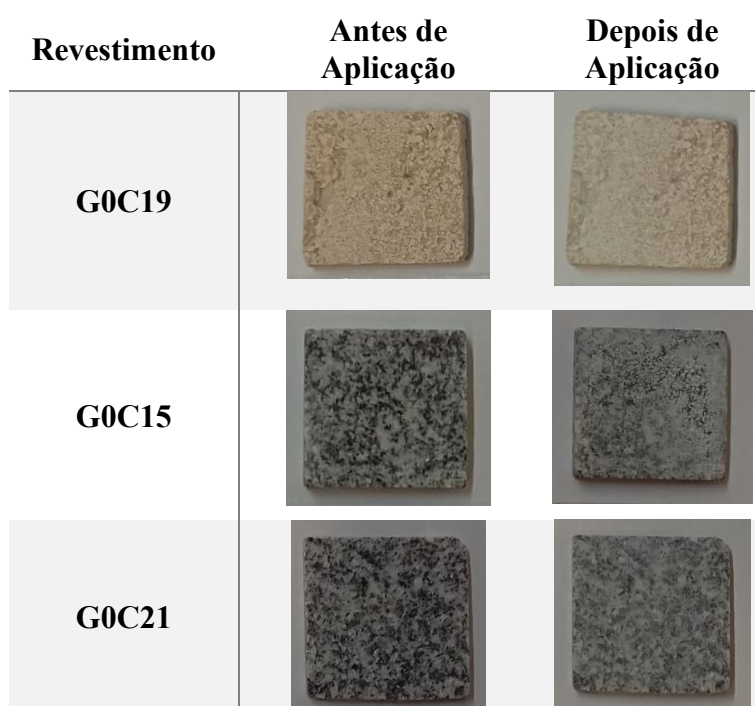
Relativamente ao calcário, a análise gráfica da **Figura 58** revela que os valores de  $\Delta E^*$  associados à maioria dos revestimentos aplicados, mantiveram-se abaixo do limite definido na literatura ( $\Delta E^* < 5$ ), com exceção do revestimento G0C19 que apresentou um valor de  $\Delta E^*$  superior a este limite. Na **Figura 59**, é possível observar os registos fotográficos a superfície do calcário antes e após a aplicação do revestimento G0C19, verificando que a superfície apresenta uma tonalidade mais clara e esbranquiçada, como também se evidencia uma redução do brilho deste litotipo em relação ao seu estado inicial.

Quanto ao granito, verifica-se por observação gráfica da **Figura 58** que a variação cromática é inferior a 5 para a maioria dos revestimentos, excepto para as formulações G0C15 e G0C21 que apresentaram  $\Delta E^* \geq 5$ . Na **Figura 59**, é possível observar o granito

antes e após a aplicação destes dois revestimentos, sendo que a formulação G0C15 polimerizou parcialmente à superfície, originando o aparecimento de manchas brancas indicativas de uma incompatibilidade severa com o litotipo. A aplicação do revestimento G0C21, resultou numa ligeira tonalidade branca à superfície da pedra, diferente da coloração original do granito. Assim, por análise da **Figura 58** e observação dos registos fotográficos da **Figura 59**, verifica-se que ambos os revestimentos induzem alterações cromáticas consideradas inaceitáveis quando aplicados a este tipo de pedra natural.

Neste sentido, 12.5 % das amostras resultaram num  $\Delta E^* \geq 5$  sendo consideradas incompatíveis com o respetivo substrato pétreo, nomeadamente, o revestimento G0C19 no caso do calcário, e os revestimentos G0C15 e G0C21 no caso do granito. No caso do substrato mármore, todas as formulações testadas revelaram compatibilidade com o mesmo.

Estes resultados indicam que as alterações cromáticas observadas nas amostras de pedra após a aplicação dos revestimentos, podem estar diretamente relacionadas com a composição química de cada formulação (Armal *et al.*, 2023).



**Figura 59:** Registo fotográfico dos substratos de pedra calcário e granito antes e após a aplicação dos revestimentos G0C19, G0C15 e G0C21

Os resultados obtidos indicam que as formulações de geração 1 apresentam maior compatibilidade estética com os três litotipos analisados, não sendo registadas alterações cromáticas significativas após a sua aplicação. Este desempenho pode estar relacionado com a maior dimensão molecular e maior grau de ramificação das estruturas de geração 1, associado à sua arquitetura anfifílica, caracterizada por um rácio 1:4 entre grupo carboxilo e as cadeias hidrofóbicas, conferindo maior carácter hidrofóbico global e maior volume periférico. Esta configuração poderá favorecer uma organização superficial mais estável, promovendo a orientação do grupo polar (L-lisina) para o substrato mineral e das cadeias hidrofóbicas (ácidos gordos) para o exterior, resultando numa menor penetração irregular na matriz porosa da pedra, evitando alterações visuais perceptíveis.

Em contraste, as formulações de geração 0, com rácio 1:2 entre o grupo carboxilo e as cadeias hidrofóbicas, evidenciam alterações cromáticas mensuráveis, indicando que a geração influencia a compatibilidade estética. Neste caso, existem apenas duas cadeias hidrofóbicas para estabilizar a estrutura, sendo que pode tornar-se menos estável na organização interfacial, implicando menor volume estérico e aumentando a aproximação excessiva das cadeias hidrofóbicas. Este comportamento ocorre particularmente nos revestimentos com ácidos gordos de cadeia longa (C15, C19 e C21), sendo que o aumento do comprimento da cadeia implica maior hidrofobicidade, menor solubilidade e dispersão no meio, favorecendo fenómenos de agregação localizada e formação de domínios superficiais heterogéneos. Assim, ocorre uma distribuição menos uniforme do revestimento, justificando as alterações cromáticas observadas nos substratos.

O mesmo não acontece na geração 1 pois o rácio 1:4 confere maior volume estérico, reduzindo a aproximação excessiva das cadeias e maior estabilidade na organização interfacial. Neste sentido, mesmo com cadeias longas, como as estruturas são mais ramificadas, podem impedir a agregação e promover distribuição mais homogénea, reduzindo variações cromáticas locais.

Para além das características dos revestimentos, as propriedades físico-químicas dos diferentes litotipos podem ter um papel importante no comportamento cromático observado. Segundo a literatura (Hashim *et al.*, 2024; Prieto *et al.*, 2010) o calcário é caracterizado por apresentar maior porosidade na sua estrutura, o que favorece a absorção dos revestimentos aplicados no seu interior, diminuindo possíveis alterações estéticas à superfície. No entanto, a formulação G0C19 é uma exceção aos revestimentos aplicados, uma vez que se obteve um valor de  $\Delta E^*$  superior ao limite estabelecido, sugerindo que a

combinação entre o tamanho da estrutura de Geração 0 e o comprimento da cadeia alifática foi o suficiente para resultar numa polimerização parcial à superfície com alteração cromática perceptível.

O mármore, é constituído por uma estrutura menos porosa e mais compacta comparativamente ao calcário, o que limita tanto a infiltração como a acumulação superficial dos revestimentos. Perante esta característica, é possível compreender a elevada compatibilidade cromática obtida para todas as formulações testadas, pois nenhuma produziu valores de  $\Delta E^*$  considerados inaceitáveis neste litotipo.

O granito é o substrato que apresenta uma estrutura menos porosa dos três litotipos em estudo, sendo também o mais recetivo às incompatibilidades estéticas, segundo os resultados obtidos. Neste caso, os revestimentos G0C15 e G0C21 originaram valores de  $\Delta E^*$  iguais ou superiores a 5, associados ao aparecimento de manchas esbranquiçadas e uma tonalidade branca visivelmente diferente da cor original do substrato. Estes efeitos indicam que existe baixa compatibilidade interfacial entre estes revestimentos com o litotipo, possivelmente devido à reduzida porosidade e à menor homogeneidade química da superfície, fatores que podem dificultar uma interação eficaz com determinados revestimentos orgânicos de carácter alifático.

Estes resultados demonstram a importância que a composição química dos revestimentos, como a geração da formulação e o comprimento da cadeia alifática, podem ter nas alterações visíveis de cor dos substratos pétreos, e que a compatibilidade estética depende tanto dos revestimentos como das propriedades físico-químicas do litotipo (Armal *et al.*, 2023; Prieto *et al.*, 2010). Por isso, é fundamental ter em consideração o tipo de revestimento que se escolhe em função do litotipo a tratar.

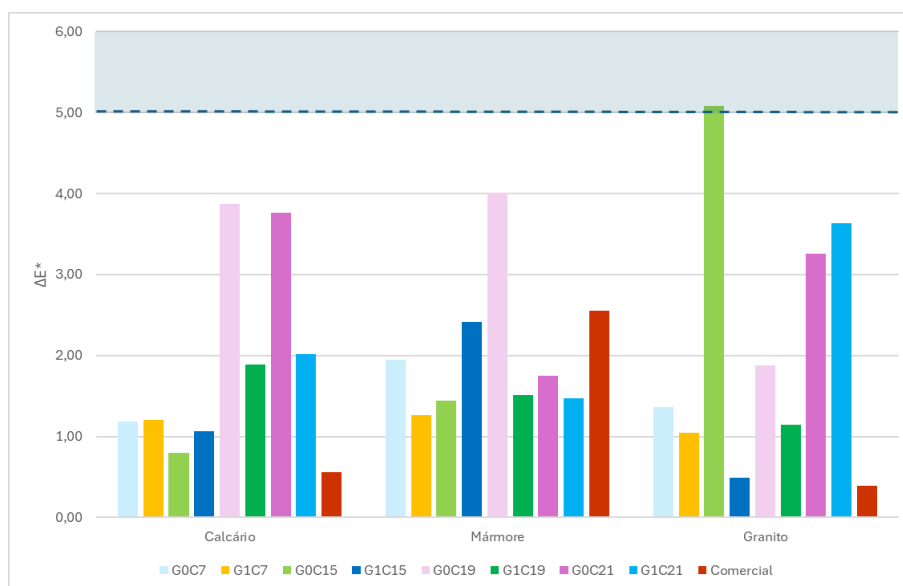
É importante salientar que 87.5 % das amostras em estudo não causaram nenhuma alteração cromática visível a *olho nu*, o que é um pré-requisito para serem utilizadas como protetores hidrofóbicos e antimicrobianos do património em Pedra Natural (N. C. Silva *et al.*, 2024).

#### **4.4.2. Potenciais Efeitos Estéticos provocados pelo Envelhecimento**

No desenvolvimento de novos revestimentos para materiais pétreos, é importante assegurar que o envelhecimento com exposição a diferentes condições atmosféricas não induz mudanças visíveis na cor dos substratos (Armal *et al.*, 2023; Prieto *et al.*, 2010).

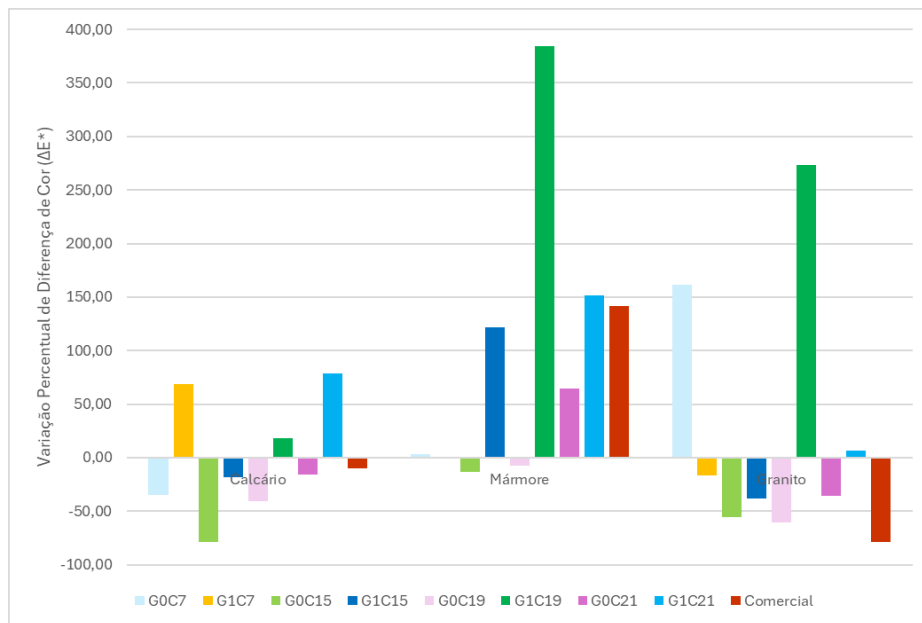
Neste estudo, foram avaliadas tanto a compatibilidade como a durabilidade dos revestimentos aplicados. Assim, após a aplicação dos revestimentos, os diferentes litotipos foram submetidos à câmara de envelhecimento acelerado, e posteriormente efetuaram-se os testes colorimétricos, sendo que a diferença de cor entre as amostras envelhecidas e as não envelhecidas foi calculada para cada espécime. A variação cromática de cada substrato foi calculada a partir dos valores de cor das amostras antes e após o envelhecimento, sendo  $\Delta E^* < 5$  o limite considerado.

A **Figura 60** apresenta a diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) entre as amostras envelhecidas e os seus estados originais, para avaliar até que ponto o processo de envelhecimento pode alterar a coloração inicial das amostras revestidas. Esta análise também serve como indicador da durabilidade dos revestimentos aplicados e a sua resistência a alterações de cor ao longo do tempo.



**Figura 60:** Representação gráfica do  $\Delta E^*$  para os revestimentos aplicados nas amostras de pedras em estudo após o ensaio de envelhecimento

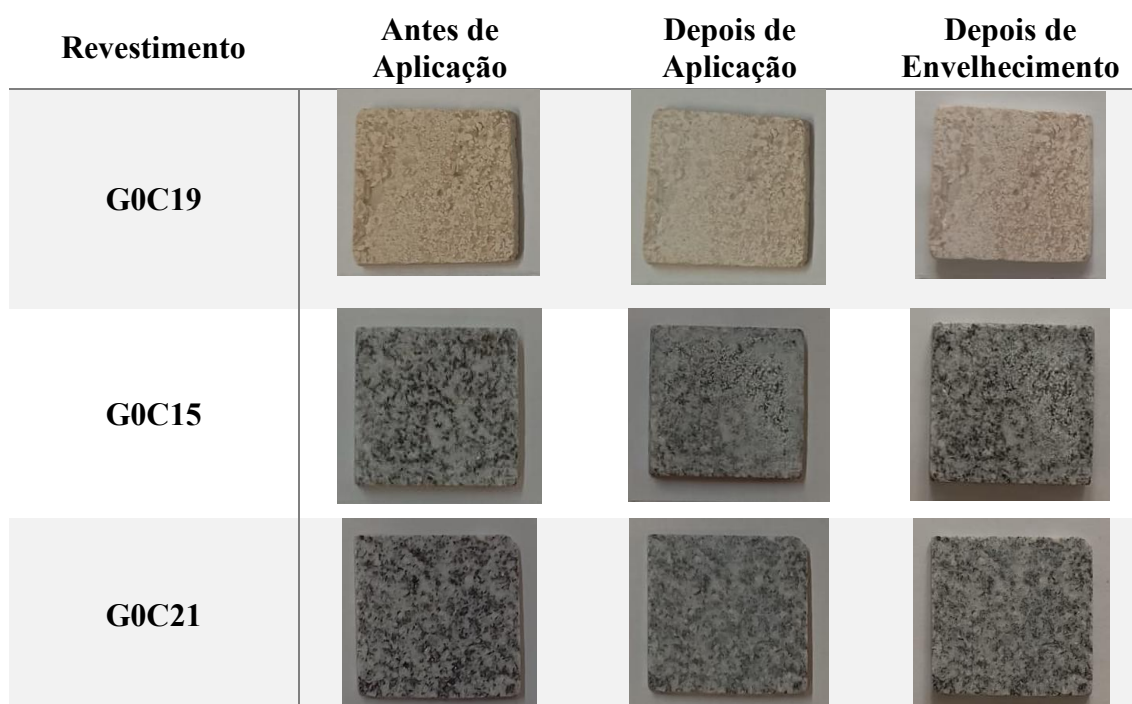
A **Figura 61** ilustra a variação percentual de diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) entre as amostras após aplicação dos revestimentos e as mesmas envelhecidas.



**Figura 61:** Representação gráfica da diferença percentual de diferença de cor ( $\Delta E^*$ ) obtida para cada revestimento aplicado nos diferentes litotipos em estudo

Por análise gráfica da **Figura 60** e da **Figura 61**, é possível perceber que os revestimentos que apresentavam compatibilidade cromática antes do ensaio de envelhecimento ( $\Delta E^* < 5$ ) mantiveram esse comportamento após o ensaio. Relativamente aos revestimentos que anteriormente foram considerados incompatíveis nos substratos de calcário (G0C19) e granito (G0C21), observou-se uma melhoria significativa no seu desempenho após o ensaio de envelhecimento acelerado. Por observação da **Figura 60**, estes revestimentos obtiveram valores de  $\Delta E^*$  inferiores a 5, indicando compatibilidade cromática aceitável e evidenciando estabilidade ao longo do tempo quando expostos às condições atmosféricas simuladas.

A **Figura 62**, apresenta o registo fotográfico dos substratos de pedra calcário e granito antes e depois da aplicação dos revestimentos G0C19, G0C15 e G0C21, bem como após o ensaio de envelhecimento.



**Figura 62:** Registo fotográfico dos substratos de pedra calcário e granito antes e depois da aplicação dos revestimentos G0C19, G0C15 e G0C21, bem como após o ensaio de envelhecimento

Verifica-se que as amostras revestidas com G0C19 e G0C21 recuperaram parcialmente a tonalidade original após o ensaio de envelhecimento, apresentando-se menos esbranquiçadas. Apenas a formulação G0C15 continua a não ser totalmente compatível com o substrato de granito, embora apresente melhorias significativas, com  $\Delta E^*$  próximo de 5.

Claramente que por observação da **Figura 62**, o revestimento G0C15 permanece visível na superfície do litotipo, ainda que de forma menos acentuada, com uma tonalidade menos esbranquiçada. No entanto, esta alteração cromática ainda é considerada inaceitável quando comparada com a cor original do substrato.

A recuperação parcial da tonalidade observada nas amostras revestidas com G0C19 e G0C21 poderá estar relacionada com a reorganização estrutural das cadeias anfífilas longas dos compostos durante o envelhecimento artificial. A exposição repetida a ciclos de aspersão de água, condensação térmica e radiação UV-A poderá ter aumentado a mobilidade molecular e promovido o relaxamento estrutural do filme superficial, conduzindo ao rearranjo das cadeias hidrofóbicas e a uma organização interfacial mais compacta e homogénea. Adicionalmente, também poderá ter ocorrido remoção de frações superficialmente adsorvidas. Deste modo, o envelhecimento terá

atuado como um processo de estabilização interfacial, contribuindo para a diminuição das heterogeneidades óticas, justificando a atenuação das alterações cromáticas inicialmente observadas.

É de salientar que os revestimentos que apresentavam compatibilidade cromática antes do envelhecimento mantiveram este comportamento após a exposição às condições atmosféricas simuladas, comprovando compatibilidade com os substratos pétreos e durabilidade ao longo do tempo. Estes resultados indicam que a maioria das formulações é estável face aos agentes de degradação aplicados, não comprometendo a aparência dos litotipos ao longo do tempo, cumprindo assim um requisito fundamental para aplicações em conservação do património cultural. Os resultados obtidos podem estar relacionados com os ciclos térmicos de condensação a 50 °C e de radiação UV-A a 45 °C, tendo estes contribuído para uma melhor adesão entre os revestimentos e os substratos, ou seja, os revestimentos infiltraram-se nos poros do substrato, estabelecendo uma forte ligação que aumenta a durabilidade do revestimento. Esta melhoria na adesão e na capacidade de penetração contribui para uma maior resistência do revestimento a processos de perda de coesão após o envelhecimento acelerado (Hashim *et al.*, 2024).

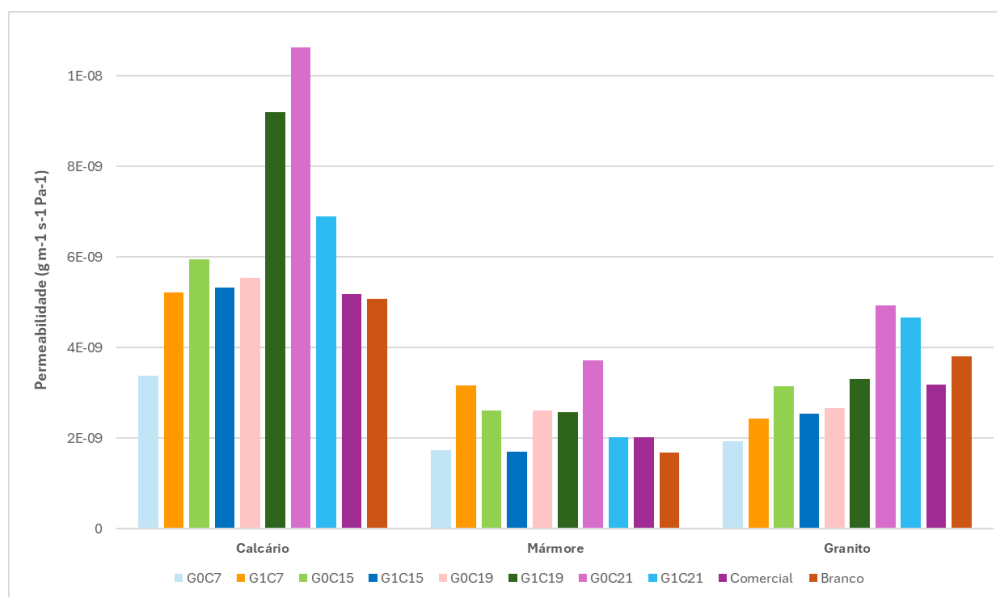
Neste sentido, podemos considerar que 95.8 % das amostras estudadas obtiveram um desempenho aceitável de compatibilidade cromática e durabilidade após a simulação de envelhecimento acelerado, segundo os critérios definidos na literatura. Deste modo, os revestimentos em estudo têm potencial para serem aplicados como protetores em Pedra Natural sem causarem alterações estéticas visíveis, garantindo durabilidade a longo prazo quando expostos a condições ambientais adversas, permitindo assim conservar as propriedades estéticas (cor) dos substratos tratados.

### **4.5. Permeabilidade ao Vapor de Água**

A avaliação da permeabilidade de substratos pétreos ao vapor de água é outra das propriedades fundamentais a ser avaliada para aferir a compatibilidade dos revestimentos protetores a serem aplicados na Pedra Natural (Eyssautier-Chuine *et al.*, 2018). Os revestimentos devem permitir a difusão do vapor de água através da pedra, de forma a preservar a “respirabilidade” da mesma, uma vez que a obstrução da estrutura porosa interna do substrato pode originar acumulação de humidade interna, induzindo tensões mecânicas que, a longo prazo, podem comprometer a sua integridade estrutural, resultando posteriormente em fissuras ou até fraturas.

#### 4.5.1. Estudo da Compatibilidade dos Revestimentos

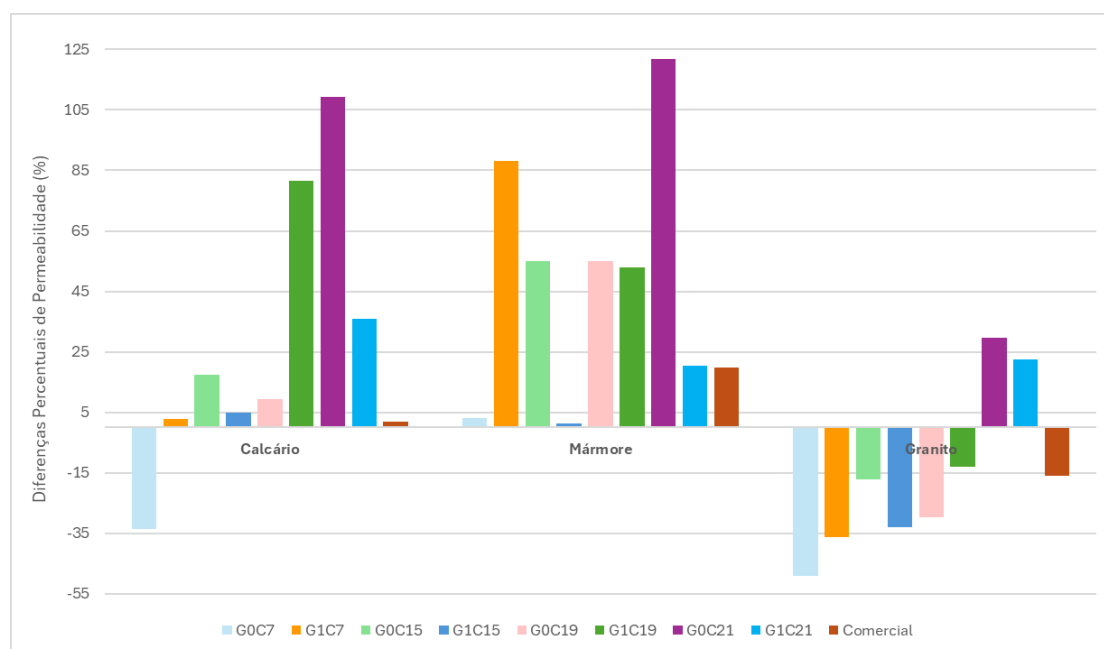
O ensaio de permeabilidade ao vapor de água decorreu ao longo de um período de 10 dias, durante o qual foram efetuadas medições diárias das amostras. Estas amostras referem-se aos substratos após a aplicação dos revestimentos em estudo, sendo os resultados obtidos apresentados na **Figura 63**.



**Figura 63:** Medições da permeabilidade ao vapor de água das amostras de pedra em estudo

Por observação gráfica da **Figura 63**, verifica-se que o calcário é o substrato que apresenta os valores mais elevados de permeabilidade ao vapor de água, quando comparado com o mármore e o granito. Estas diferenças eram espectáveis de acordo com a literatura, devido à porosidade inerente a este substrato, e que pode ser atribuída aos distintos processos diagenéticos que influenciam a formação e estrutura destes tipos de pedra. Deste modo, a estrutura interna porosa de cada litotipo terá influência nos resultados obtidos.

A **Figura 64** ilustra a variação percentual de permeabilidade para cada revestimento aplicado, permitindo uma visualização mais clara da evolução dos resultados obtidos.



**Figura 64:** Representação gráfica da diferença percentual de permeabilidade obtida para cada revestimento aplicado nos diferentes litotipos em estudo

No caso do calcário, os revestimentos G0C21 e G1C19 apresentam os melhores resultados, com aumentos de permeabilidade ao vapor de água de 109 % e 81 %, respectivamente, em comparação aos valores obtidos antes do tratamento, aumentando assim permeabilidade da pedra após a aplicação. Em contraste, o revestimento G0C7 possui o desempenho menos favorável, com uma diminuição percentual de 34 %, levando à redução da permeabilidade do calcário. Os restantes revestimentos variam entre 3-36 % em relação aos valores iniciais, correspondendo a alterações pouco significativas, mas que podem ser consideradas compatíveis, uma vez que mantêm a permeabilidade da pedra após a aplicação.

Relativamente ao mármore, os revestimentos G0C21 e G1C7 exibem os melhores resultados, com aumentos de permeabilidade ao vapor de água de 109% e 88 % respectivamente, em comparação com os valores obtidos antes do tratamento, indicando um aumento da permeabilidade da pedra após a aplicação. Para este litotipo, nenhum dos revestimentos em estudo apresentou diminuição percentual, pelo que não se observou perda de permeabilidade, revelando que todas as formulações testadas são eficazes para este substrato. Os restantes revestimentos variaram entre 1-55 % em relação aos valores iniciais, sendo estas alterações consideradas compatíveis com o mármore, uma vez que a permeabilidade da pedra se manteve globalmente estável após a aplicação.

Quanto ao granito, apenas os revestimentos G0C21 e G1C21 obtiveram um aumento percentual da permeabilidade, com valores de 30 % e 23 % respectivamente, comparativamente aos valores iniciais. Os restantes revestimentos revelaram diminuição percentual da permeabilidade, variando entre 13-49%. A diminuição percentual média da permeabilidade ao vapor de água para o granito é de 28 %. Portanto, tanto as amostras G0C15, G1C19 como a amostra comercial, revelaram reduções na permeabilidade dentro da faixa aceitável após a sua aplicação (17 %, 13 % e 16 %) enfatizando assim a sua compatibilidade. Deste modo, apenas os compostos G0C7, G1C7, G1C15 e G0C19 são considerados efetivamente incompatíveis no granito, com diminuições percentuais de 49 %, 36 %, 33 % e 30 %, respectivamente.

Numa análise global, observa-se que o revestimento G0C21 destaca-se entre os três substratos analisados, sendo o único a apresentar de forma consistente os valores mais elevados de permeabilidade ao vapor de água. Adicionalmente, nos substratos de calcário e mármore, os restantes revestimentos também evidenciaram uma boa prestação permitindo aumentar ou manter a permeabilidade após a aplicação, o que demonstra compatibilidade e capacidade de preservar a “respiração” das pedras. Estes resultados sugerem que ocorreu uma boa distribuição dos revestimentos ao longo da rede porosa dos litotipos, sendo que revestiram as paredes internas dos poros sem os obstruir. Assim, formou-se uma superfície hidrofóbica que mantém os poros abertos, que ao diminuir a condensação de água e retenção de humidade no interior dos poros facilita a difusão do vapor, refletindo-se no aumento da permeabilidade medida.

É possível verificar que o revestimento G0C7 possui o desempenho menos favorável no calcário e no granito, assim como as formulações G1C7, G1C15 e G0C19 no caso do granito. Estes resultados indicam que, independentemente da geração da formulação ou do comprimento da cadeia alifática, decorreu uma influência na permeabilidade, e que 50 % das formulações desenvolvidas não demonstraram uma boa prestação no substrato de granito, levando à redução da sua permeabilidade ao vapor de água. Neste contexto, alguns revestimentos podem ter preenchido parcialmente os poros limitando os caminhos disponíveis para a passagem do vapor de água, diminuindo assim a permeabilidade. Este comportamento representa um risco para a pedra, porque a retenção de humidade pode favorecer a condensação de água na superfície, originando tensões mecânicas entre as zonas revestidas e não revestidas. Com o tempo, estes efeitos

podem desencadear processos de deterioração, comprometendo a integridade estrutural da pedra e limitando a sua capacidade de “respiração”.

Podemos afirmar que, uma boa compatibilidade entre um revestimento e o substrato pétreo implica necessariamente uma baixa (ou ausência de) diminuição da permeabilidade ao vapor de água, sendo que um aumento da mesma é um comportamento desejável, pois permite garantir que a superfície da pedra “respira”. De forma geral, podemos considerar que as formulações apresentam eficácia e compatibilidade nos litotipos em estudo, assegurando a capacidade de permeabilidade ao vapor de água após aplicação.

## **CAPÍTULO V – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

---

*A investigação é ver aquilo que toda a gente viu e pensar aquilo que ninguém pensou.*

*– Albert Szent-Györgyi*

O presente trabalho teve como principal objetivo desenvolver revestimentos orgânicos antimicrobianos e hidrofóbicos para proteção de materiais pétreos. Os compostos foram sintetizados a partir de dendrões derivados de L-lisina e funcionalizados com ácidos gordos, de forma a obter estruturas anfifílicas com diferentes graus de ramificação, e avaliar a influência destas características no desempenho funcional dos revestimentos. A **Tabela 6**, consiste numa tabela-resumo que reúne os principais resultados obtidos nesta investigação, sendo que os quadrados a verde indicam os resultados positivos em cada ensaio, isto é, os compostos que induzem inibição microbiana, apresentam capacidade hidrofóbica, compatibilidade estética e permeabilidade ao vapor de água, a fim de aferir as formulações mais adequadas para mitigar a biodeterioração e degradação hídrica na Pedra Natural. O revestimento comercial foi igualmente testado para efeitos de comparação.

De acordo com a **Tabela 6**, é possível constatar que os compostos de geração 1 (G1) apresentam um desempenho global superior aos de geração 0 (G0) e que o comprimento da cadeia dos ácidos gordos influencia significativamente o desempenho dos revestimentos. Neste sentido, cadeias alifáticas mais longas (C19 e C21) conferem mais capacidade hidrofóbica aos substratos pétreos, enquanto cadeias mais curtas exibem menor hidrofobicidade mas tendem a apresentar maior atividade antimicrobiana, como observado no composto G1C7, o único capaz de inibir *Bacillus cereus*. No entanto, todos os compostos sintetizados inibem pelo menos um dos microrganismos testados, evidenciando um espetro de ação relevante, incluindo aqueles com cadeias mais longas. Observa-se ainda que *Saccharomyces cerevisiae* foi o microrganismo mais suscetível às formulações testadas. Quanto à compatibilidade estética, os compostos de geração 1 apresentam melhor desempenho, ao contrário de alguns compostos de geração 0 com cadeias longas que induziram alterações de cor, possivelmente associadas a fenómenos de agregação superficial e distribuição heterogénea do revestimento. Também é notório que a maioria dos revestimentos manteve permeabilidade ao vapor de água, preservando a capacidade de difusão de vapor através da pedra, evitando a acumulação interna de humidade.

De modo a considerar o melhor desempenho por ensaio, o composto G1C7 apresenta a maior atividade antimicrobiana, enquanto cadeias longas (G1C19, G0C21 e G1C21) demonstram melhor desempenho hidrofóbico. Os compostos de geração 1 evidenciam melhor compatibilidade estética e, de forma geral, os revestimentos mantêm

a permeabilidade ao vapor de água. Globalmente, o composto G1C21 destaca-se como o revestimento mais equilibrado, combinando atividade antimicrobiana, hidrofobicidade, compatibilidade estética e permeabilidade. Para além disto, observa-se uma variação dos resultados em função dos diferentes litotipos estudados, observando-se maior eficácia e compatibilidade dos compostos no mármore e calcário do que no granito, provavelmente devido às suas características intrínsecas, como se verificou anteriormente na Tabela 1.

É possível concluir que a investigação foi realizada com sucesso, uma vez que os objetivos traçados para o presente estudo foram cumpridos, tendo sido desenvolvidos revestimentos orgânicos com propriedades antimicrobianas e hidrofóbicas adequadas para aplicação em materiais pétreos. De forma particularmente relevante, os resultados demonstram que alguns dos compostos sintetizados apresentam desempenho comparável ao revestimento comercial. Este facto sugere que, por serem orgânicos, enquadram-se nos princípios da química verde e constituem uma alternativa ambientalmente mais sustentável aos revestimentos sintéticos fluorados frequentemente utilizados na conservação e proteção do património pétreo.

Como perspetivas futuras, propõe-se expandir o espetro microbiológico testado, avaliando os compostos sintetizados noutros microrganismos frequentemente associados à biodeterioração da pedra, como bactérias (*Pseudomonas* e *Arthrobacter*) e fungos (*Aspergillus* e *Cladosporium*) permitindo uma avaliação mais abrangente da eficácia antimicrobiana e consolidando o potencial destas formulações. Adicionalmente, poderá ser explorada a síntese de novos revestimentos orgânicos mantendo os ácidos gordos utilizados nesta investigação, mas modificando o grupo polar do dendrão. Em vez da L-lisina, poderão ser utilizados aminoácidos como os ácidos glutâmico e aspártico, de forma a avaliar o impacto do grupo polar nas interações com microrganismos, na organização interfacial do revestimento e na compatibilidade com os substratos pétreos.

**Tabela 6:** Tabela-resumo dos principais resultados obtidos nos diferentes ensaios realizados, incluindo eficácia antimicrobiana, potencial hidrofóbico, compatibilidade estética e permeabilidade ao vapor de água. Os quadrados a verde indicam resultados positivos, enquanto os quadrados a branco correspondem a resultados não satisfatórios

| Composto  | Inibição da Atividade Microbiana |                            |                                 | Potencial Hidrofóbico - Ensaios de Tensiometria |          |         |                     |          |         | Compatibilidade Estética - Ensaios de Colorimetria |          |         |                     |          |         | Permeabilidade ao Vapor de Água |          |         |
|-----------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|----------|---------|---------------------|----------|---------|--|----------|---------|---------------------|----------|---------|---------------------------------|----------|---------|
|           | <i>Bacillus cereus</i>           | <i>Micrococcus species</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Após Aplicação                                  |          |         | Após Envelhecimento |          |         | Após Aplicação                                     |          |         | Após Envelhecimento |          |         | Mármore                         | Calcário | Granito |
|           |                                  |                            |                                 | Mármore   | Calcário | Granito | Mármore             | Calcário | Granito | Mármore  | Calcário | Granito | Mármore             | Calcário | Granito |                                 |          |         |
| G0C7      |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| G1C7      |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| G0C15     |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| G1C15     |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| G0C19     |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| G1C19     |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| G0C21     |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| G1C21     |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |
| Comercial |                                  |                            |                                 |   |          |         |                     |          |         |  |          |         |                     |          |         |                                 |          |         |

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., & Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>
- Agudo-Álvarez, S., Díaz-Mínguez, S. S., & Benito-Arenas, R. (2024). The amide group and its preparation methods by acid-amine coupling reactions: An overview. *Pure and Applied Chemistry*, *96*(5), 691–707. <https://doi.org/10.1515/pac-2023-1104>
- Alves, C., Figueiredo, C. A. M., Sanjurjo-Sánchez, J., & Hernández, A. C. (2021). Salt weathering of natural stone: A review of comparative laboratory studies. *Heritage*, *4*(3), 1554–1565. <https://doi.org/10.3390/heritage4030086>
- Arnal, F., Dias, L., Mirão, J., Pires, V., Sitzia, F., Martins, S., Costa, M., & Barrulas, P. (2023). Chemical Composition of Hydrophobic Coating Solutions and Its Impact on Carbonate Stones Protection and Preservation. *Sustainability (Switzerland)*, *15*(22), 1–21. <https://doi.org/10.3390/su152216135>
- Benavente, D., de Jongh, M., & Cañaveras, J. C. (2021). Weathering processes and mechanisms caused by capillary waters and pigeon droppings on porous limestones. *Minerals*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/min11010018>
- Campostrini, A., Sala-Luis, A., Bosch-Roig, P., Ghedini, E., Signoretto, M., & Menegazzo, F. (2025). Mesoporous silica and vegetal extracts combined as sustainable stone heritage protection against biodeterioration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *109*(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-025-13475-5>
- Cao, Y., Salvini, A., & Camaiti, M. (2020). Current status and future prospects of applying bioinspired superhydrophobic materials for conservation of stone artworks. *Coatings*, *10*(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/coatings10040353>
- Cappitelli, F., Cattò, C., & Villa, F. (2020). The control of cultural heritage microbial deterioration. *Microorganisms*, *8*(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101542>

- Căta, A., Ienașcu, I. M. C., Ștefănuț, M. N., Roșu, D., & Pop, O. R. (2023). Properties and Bioapplications of Amphiphilic Janus Dendrimers: A Review. *Pharmaceutics*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020589>
- Celi, D., Marvasi, M., & Perito, B. (2025). Conventional and innovative approaches to black fungi control for stone heritage preservation. *IUBMB Life*, 77(3), 1–19. <https://doi.org/10.1002/iub.70010>
- Cevheroğlu Çira, S., Dağ, A., & Karakuş, A. (2018). Investigation of the Effects of Marble Material Properties on the Surface Quality. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6514785>
- Chabre, Y. M., & Roy, R. (2010). Design and Creativity in Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 63, Issue 10). [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(10\)63006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(10)63006-5)
- Collins, C. M., & Safiuddin, M. (2022). Lotus-Leaf-Inspired Biomimetic Coatings: Different Types, Key Properties, and Applications in Infrastructures. *Infrastructures*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/infrastructures7040046>
- Costa, J., Veiga, R., & Faria, P. (2016). Materiais nanoestruturados para aplicação em edifícios históricos. *Congresso Ibero-Americano “Património, Suas Matérias e Imatérias,” November*, 131–132.
- Delgado Rodrigues, J. (2022). The Portuguese Lioz Stone: an Overview on the Deterioration Problems and Conservation Perspectives. *Geoheritage*, 14(1), 0–6. <https://doi.org/10.1007/s12371-022-00657-0>
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Dias, L., Nunes, R., Costa, M., Caldeira, A. T., Mirão, J., & Barrulas, P. (2023). Unveiling the Effectiveness of Innovative Commercial Coatings Used for the Preservation of Natural Stone—A Contribution. *Heritage*, 6(9), 6328–6342. <https://doi.org/10.3390/heritage6090331>

- Dias, L., Pires, V., Sitzia, F., Lisci, C., Candeias, A., Caldeira, A. T., & Mirão, J. (2023). Evaluating the biosusceptibility of natural stone as an supporting tool to prevent Cultural Heritage biodeterioration. *European Physical Journal Plus*, 138(6). <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-04185-w>
- Dias, L., Rosado, T., Candeias, A., Mirão, J., & Caldeira, A. T. (2020a). A change in composition, a change in colour: The case of limestone sculptures from the Portuguese National Museum of Ancient Art. *Journal of Cultural Heritage*, 42, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.07.025>
- Dias, L., Rosado, T., Candeias, A., Mirão, J., & Caldeira, A. T. (2020b). Linking ornamental stone discolouration to its biocolonisation state. *Building and Environment*, 180(April). <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2020.106934>
- Ding, X., Lan, W., & Gu, J. D. (2020). A review on sampling techniques and analytical methods for microbiota of cultural properties and historical architecture. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(22), 1–15. <https://doi.org/10.3390/app10228099>
- EN 16581. (2014). EN 16581:2014 - Conservation of Cultural Heritage - Surface protection for porous inorganic materials - Laboratory test methods for the evaluation of the performance of water repellent products. *British Standards*.
- Eyssautier-Chuine, S., Calandra, I., Vaillant-Gaveau, N., Fronteau, G., Thomachot-Schneider, C., Hubert, J., Pleck, J., & Gommeaux, M. (2018). A new preventive coating for building stones mixing a water repellent and an eco-friendly biocide. *Progress in Organic Coatings*, 120, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2018.03.022>
- Fermo, P., Cappelletti, G., Cozzi, N., Padeletti, G., Kaciulis, S., Brucale, M., & Merlini, M. (2014). Hydrophobizing coatings for cultural heritage. A detailed study of resin/stone surface interaction. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 116(1), 341–348. <https://doi.org/10.1007/s00339-013-8127-z>
- Fidanza, M. R., & Caneva, G. (2019). Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: A review. *Journal of Cultural Heritage*, 38, 271–286. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.01.005>

- Gabriele, F., Casieri, C., Vetrano, A., & Spreti, N. (2023). Evaluation of acrylic and silane coatings on limestone through macroscopic and microscopic analyses. *Materials Chemistry and Physics*, 307(May), 128194. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.128194>
- Gaylarde, C. C., & Baptista-Neto, J. A. (2021). Microbiologically induced aesthetic and structural changes to dimension stone. *Npj Materials Degradation*, 5(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41529-021-00180-7>
- Guo, H. (2022). CMAS Issues in Jet Engines: The Less, the Better. *Materials Lab*, 1, 2–5. <https://doi.org/10.54227/mlab.20220042>
- Hashim, H., Dias, L., Martins, S., Pires, V., Costa, M., & Barrulas, P. (2024). Optimization of the Application of Commercial Hydrophobic Coatings for Natural Stone Protection and Preservation. *Heritage*, 7(7), 3495–3510. <https://doi.org/10.3390/heritage7070165>
- Ibrahim, M. M., Mohamed, W. S., & Mohamed, H. M. (2021). Experimental study for evaluation of Paraloid® B72 and its nanocomposite with nano TiO<sub>2</sub> and nano ZnO for consolidation of pottery samples. *Scientific Culture*, 7(2), 101–111. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4570180>
- Ilies, D. C., Blaga, L., Ilies, A., Pereş, A. C., Caciora, T., Hassan, T. H., Hodor, N., Turza, A., Taghiyari, H. R., Barbu-Tudoran, L., Dahal, R. K., Dejeu, P., Safarov, B., & Hossain, M. A. (2023). Green Biocidal Nanotechnology Use for Urban Stone-Built Heritage—Case Study from Oradea, Romania. *Minerals*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/min13091170>
- Jafari, R., Asadollahi, S., & Farzaneh, M. (2013). Applications of plasma technology in development of superhydrophobic surfaces. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 33(1), 177–200. <https://doi.org/10.1007/s11090-012-9413-9>
- Joseph, E. (2021). Microorganisms in the deterioration and preservation of cultural heritage. In *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*. <https://doi.org/10.1007/9783030694111>

- Karapanagiotis, I., & Manoudis, P. N. (2022). Superhydrophobic and superamphiphobic materials for the conservation of natural stone: An overview. *Construction and Building Materials*, 320(November 2021), 126175. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.126175>
- Latthe, S. S., Terashima, C., Nakata, K., & Fujishima, A. (2014). Superhydrophobic surfaces developed by mimicking hierarchical surface morphology of lotus leaf. *Molecules*, 19(4), 4256–4283. <https://doi.org/10.3390/molecules19044256>
- Ledin, P. A., Friscourt, F., Guo, J., & Boons, G. J. (2011). Convergent assembly and surface modification of multifunctional dendrimers by three consecutive click reactions. *Chemistry - A European Journal*, 17(3), 839–846. <https://doi.org/10.1002/chem.201002052>
- Lee, A. Y., Chen, C. H., Liou, J. S., Lin, Y. C., Hamada, M., Wang, Y. T., Peng, L. L., Chang, S. C., Chen, C. C., Lin, C. F., Huang, L., & Huang, C. H. (2022). *Micrococcus porci* sp. nov., Isolated from Feces of Black Pig (*Sus scrofa*). *Life*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/life12111749>
- Lewis, F. J., May, E., & Bravery, A. F. (1988). Metabolic Activities of Bacteria Isolated from Building Stone and their Relationship to Stone Decay. *Biodeterioration* 7, 107–112. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1363-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1363-9_13)
- Li, J., & Sha, Y. (2008). A convenient synthesis of amino acid methyl esters. *Molecules*, 13(5), 1111–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules13051111>
- Li, Z., & Li, T. (2022). New Insights Into Microbial Induced Calcium Carbonate Precipitation Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 13(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.904095>
- Liu, P., Chernyshov, A., Najdi, T., Fu, Y., Dickerson, J., Sandmeyer, S., & Jarboe, L. (2013). Membrane stress caused by octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(7), 3239–3251. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4773-5>
- Liu, X., Koestler, R. J., Warscheid, T., Katayama, Y., & Gu, J. D. (2020). Microbial deterioration and sustainable conservation of stone monuments and buildings. *Nature Sustainability*, 3(12), 991–1004. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00602-5>

- Loffredo, M. R., F. Savini, S. Bobone, B. Casciaro, H. Franzyk, M. L. Mangoni, L. Stella (2020). Inoculum effect of antimicrobial peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1101/2020.08.21.260620>
- Lyu, Z., Ding, L., Huang, A. Y. T., Kao, C. L., & Peng, L. (2019). Poly(amidoamine)dendrimers: covalent and supramolecular synthesis. *Materials Today Chemistry*, 13, 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.04.004>
- Moura, L. I. F., Martinho, N., Silva, L. C., Barata, T. S., Brocchini, S., Florindo, H. F., & Zloh, M. (2017). Poly-glutamic dendrimer-based conjugates for cancer vaccination—a computational design for targeted delivery of antigens. *Journal of Drug Targeting*, 25(9–10), 873–880. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1363213>
- Mu, B., Ying, X., Petropoulos, E., & He, S. (2021). Preparation of AgCl/ZnO nanocomposite for effective antimicrobial protection of stone-made building elements. *Materials Letters*, 285, 129143. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.129143>
- Nanjwade, B. K., Bechra, H. M., Derkar, G. K., Manvi, F. V., & Nanjwade, V. K. (2009). Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.07.008>
- Noiriel, C., Gouze, P., & Bernard, D. (2004). Investigation of porosity and permeability effects from microstructure changes during limestone dissolution. *Geophysical Research Letters*, 31(24), 1–4. <https://doi.org/10.1029/2004GL021572>
- Padilla-Garfias, F., & Peña, A. (2026). Extremophilic Yeasts as Next-Generation Eukaryotic Models : Mechanisms of Stress Integration , Systems Biology and Biotechnological Applications : A Review
- Pamplona, M., Melo, M. J., Aires-Barros, L. A., & Dionísio, A. (2007). Documenting for a better conservation: The use of consolidants and water repellents in conservation interventions of stone Portuguese monuments. *Conservar Património*, 6, 11–20. [https://doi.org/10.14568/cp6\\_2](https://doi.org/10.14568/cp6_2)
- Patel, H. N., & Patel, P. M. (2013). Dendrimer applications - A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2), 454–463.

- Prieto, B., Sanmartín, P., Silva, B., & Martínez-Verdú, F. (2010). Measuring the color of granite rocks: A proposed procedure. *Color Research and Application*, 35(5), 368–375. <https://doi.org/10.1002/col.20579>
- Romani, M., Warscheid, T., Nicole, L., Marcon, L., Di Martino, P., Suzuki, M. T., Lebaron, P., & Lami, R. (2022). Current and future chemical treatments to fight biodeterioration of outdoor building materials and associated biofilms: Moving away from ecotoxic and towards efficient, sustainable solutions. *Science of the Total Environment*, 802, 149846. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149846>
- Rosado, T., Dias, L., Lança, M., Nogueira, C., Santos, R., Martins, M. R., Candeias, A., Mirão, J., & Caldeira, A. T. (2020). Assessment of microbiota present on a Portuguese historical stone convent using high-throughput sequencing approaches. *MicrobiologyOpen*, 9(6), 1067–1084. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1030>
- Sarode, R. J., & Mahajan, H. S. (2024). Dendrimers for drug delivery: An overview of its classes, synthesis, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 98(April), 105896. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105896>
- Sazanova, K. V., Zelenskaya, M. S., Vlasov, A. D., Bobir, S. Y., Yakkonen, K. L., & Vlasov, D. Y. (2022). Microorganisms in Superficial Deposits on the Stone Monuments in Saint Petersburg. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020316>
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., & Gaylarde, C. (2009). Chapter 5 Microbial Deterioration of Stone Monuments-An Updated Overview. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 66, Issue 08). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00805-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00805-8)
- Setlow, P. (2016). Spore resistance properties. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems*, v, 201–215. <https://doi.org/10.1128/9781555819323.ch10>
- Siegesmund, S., Weiss, T., & Vollbrecht, A. (2002). Natural stone, weathering phenomena, conservation strategies and case studies: Introduction. *Geological Society Special Publication*, 205(July), 1–7. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2002.205.01.01>

- Silva, I., Dias, L., Salvador, C., Miller, A. Z., Candeias, A., & Caldeira, A. T. (2024). Microbial induced stone discoloration in alcobaça monastery: A comprehensive study. *Journal of Cultural Heritage*, 67, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2024.03.011>
- Silva, I., Salvador, C., Miller, A. Z., Candeias, A., & Caldeira, A. T. (2024). The Role of Bacteria in Pink Stone Discoloration: Insights from Batalha Monastery. *Micro*, 4(4), 778–797. <https://doi.org/10.3390/micro4040048>
- Silva, I., Salvador, C., Miller, A. Z., Candeias, A., & Caldeira, A. T. (2025). Addressing biodeterioration at UNESCO stone monuments: Tomar convent and Batalha Monastery. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 205(August). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2025.106188>
- Silva, M. G., Silva, A. B., Giacomini, F., Arzani, V. C., Ferreira, F. L., & Ruggeri, T. (2016). Tingimento de têxteis com o corante natural extraído dos excrementos do bicho-da-seda. *Química Têxtil*, 124(December), 38–44.
- Silva, N. C., Castro, D., Neto, C., Madureira, A. R., Pintado, M., & Moreira, P. R. (2024). Antimicrobial chitosan/TPP-based coatings for the prevention of biodeterioration of outdoor stone sculptures. *Progress in Organic Coatings*, 189(August 2023). <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2024.108246>
- Skipper, P. J. A., Skipper, L. K., & Dixon, R. A. (2022). A metagenomic analysis of the bacterial microbiome of limestone, and the role of associated biofilms in the biodeterioration of heritage stone surfaces. *Scientific Reports*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08851-4>
- Song, W., Ogawa, N., Oguchi, C., Hatta, T., & Matsukura, Y. (2010). Expérimentation en laboratoire de la météorisation du granite et de ses minéraux constituants. *Geomorphologie: Relief, Processus, Environnement*, 16(4), 327–336. <https://doi.org/10.4000/geomorphologie.8038>
- Sousa, L. M. O., Suárez del Río, L. M., Calleja, L., Ruiz de Argandoña, V. G., & Rodríguez Rey, A. (2005). Influence of microfractures and porosity on the physico-mechanical properties and weathering of ornamental granites. *Engineering Geology*, 77(1–2), 153–168. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2004.10.001>

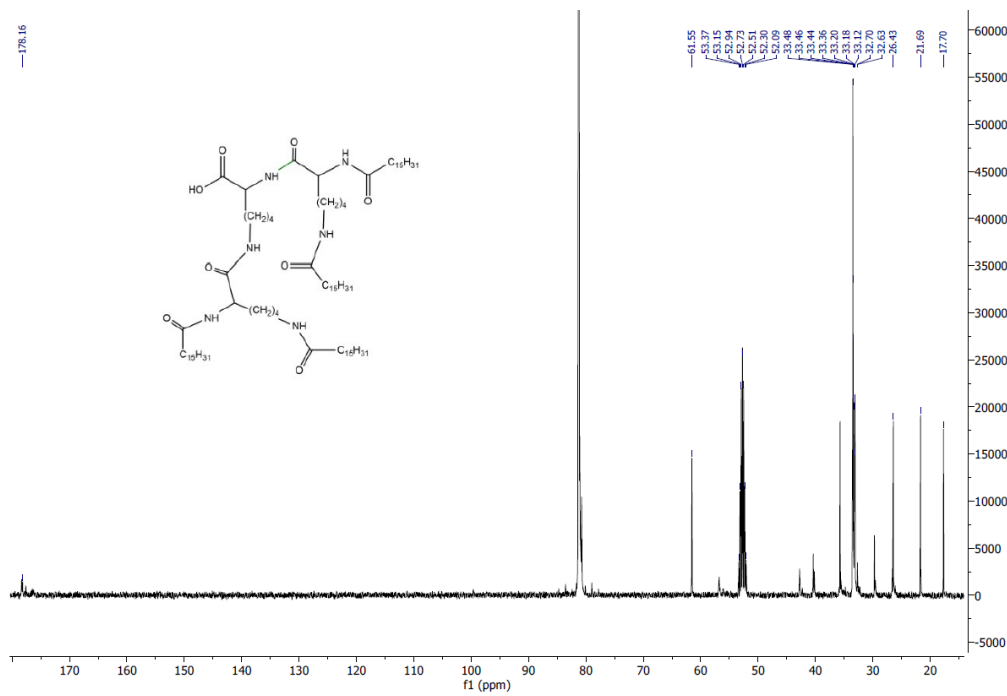
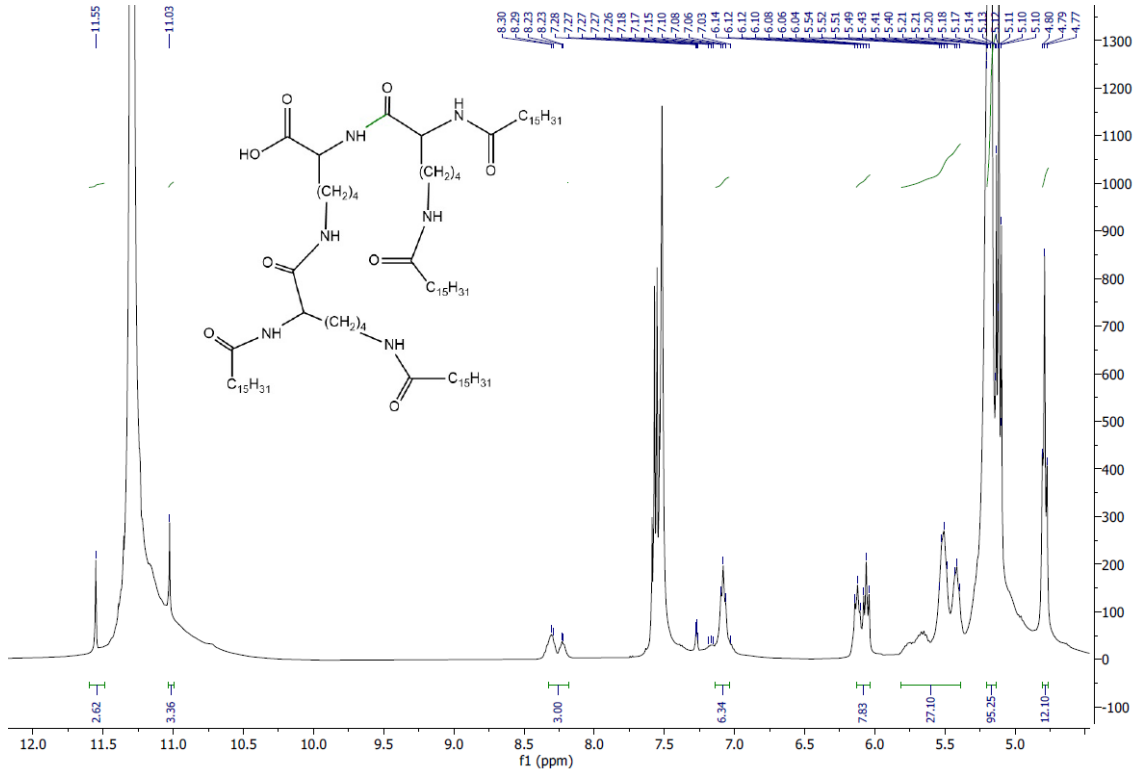
- Sowinska, M., & Urbanczyk-Lipkowska, Z. (2014). Advances in the chemistry of dendrimers. *New Journal of Chemistry*, 38(6), 2168–2203. <https://doi.org/10.1039/c3nj01239e>
- Stanaszek-Tomal, E. (2020). Environmental factors causing the development of microorganisms on the surfaces of national cultural monuments made of mineral building materials—review. *Coatings*, 10(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/coatings10121203>
- Sterflinger, K. (2010). Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biology Reviews*, 24(1–2), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.03.003>
- Sterflinger, K., & Piñar, G. (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - Tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9637–9646. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1>
- Strzałkowski, P. (2021). Characteristics of waste generated in dimension stone processing. *Energies*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/en14217232>
- Svenson, S., & Tomalia, D. A. (2005). Dendrimers in biomedical applications - Reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(15), 2106–2129. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.018>
- Takayanagi, T., & Yamabe, M. (2000). Progress of fluoropolymers on coating applications. Development of mineral spirit soluble polymer and aqueous dispersion. *Progress in Organic Coatings*, 40(1–4), 185–190. [https://doi.org/10.1016/S0300-9440\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0300-9440(00)00090-4)
- Teixeira, A. Tabelas de correlação para análise de Espetros
- Theodorou, V., Skobridis, K., Tzakos, A. G., & Ragoussis, V. (2007). A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, 48(46), 8230–8233. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.074>
- Tiano, P. (2016). Biodeterioration of Stone Monuments a Worldwide Issue. *The Open Conference Proceedings Journal*, 7(suppl 1: M3), 29–38. <https://doi.org/10.2174/2210289201607020029>

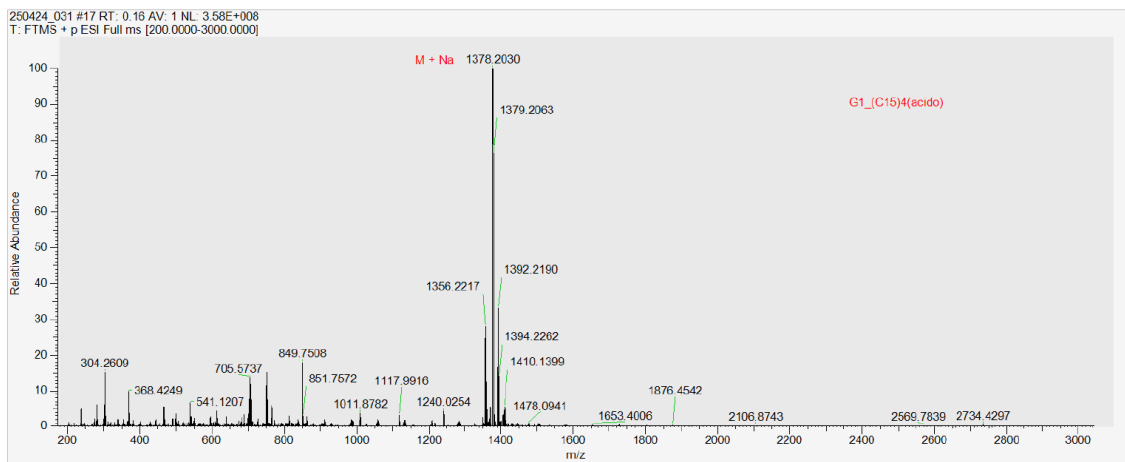
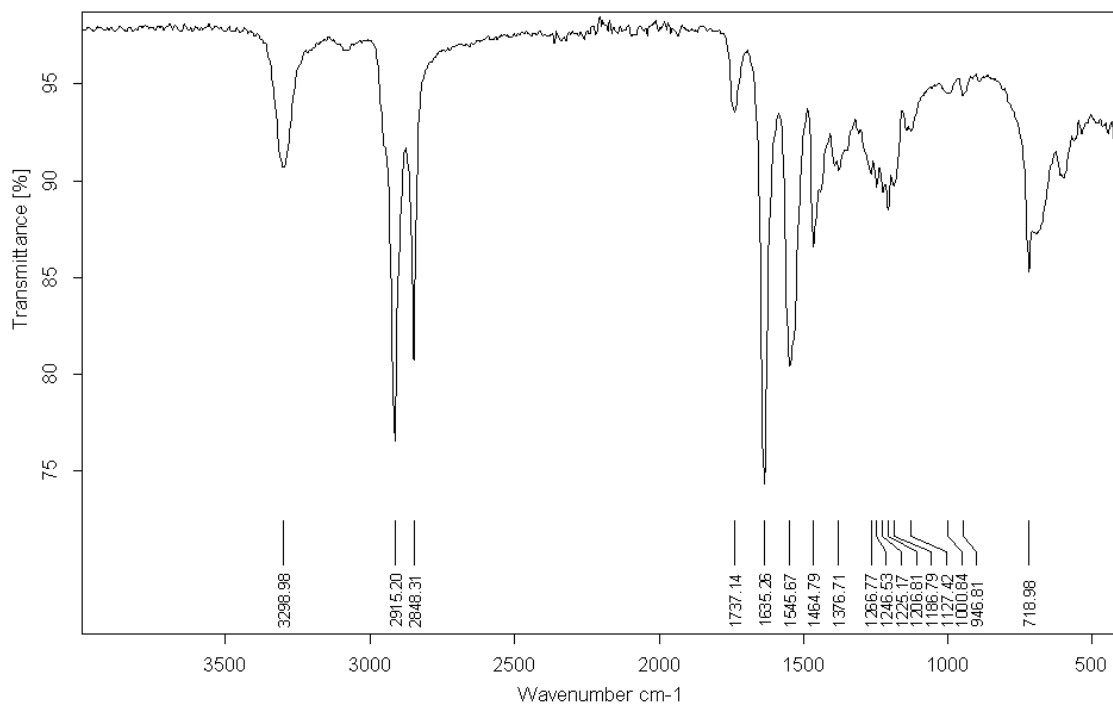
- Tomaselli, L., Lamenti, G., Bosco, M., & Tiano, P. (2000). Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46(3), 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00078-0)
- Trovão, J., & Portugal, A. (2023). Evaluation of the antifungal efficiency of biocides currently applied in the Coimbra UNESCO area limestone monuments. *Conservar Património*, 42, 7–16. <https://doi.org/10.14568/cp25076>
- UNESCO (2022). Basic Texts of the 2003 Convention for the Safeguarding of the Intangible Cultural Heritage, France. <https://ich.unesco.org/en/convention>
- Valenzuela, L., Iglesias-Juez, A., Bachiller-Baeza, B., Faraldos, M., Bahamonde, A., & Rosal, R. (2020). Biocide mechanism of highly efficient and stable antimicrobial surfaces based on zinc oxide-reduced graphene oxide photocatalytic coatings. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(36), 8294–8304. <https://doi.org/10.1039/d0tb01428a>
- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., & Verstrepen, K. J. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology , from Cell Cycle Control to DNA Damage Response
- Vazquez-Muñoz, R., Meza-Villezcás, A., Fournier, P. G. J., Soria-Castro, E., Juárez-Moreno, K., Gallego-Hernández, A. L., Bogdanchikova, N., Vazquez-Duhalt, R., & Huerta-Saquero, A. (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLoS ONE*, 14(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224904>
- Vázquez-Nion, D., Silva, B., & Prieto, B. (2018). Bioreceptivity index for granitic rocks used as construction material. *Science of the Total Environment*, 633, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.171>
- Vinçotte, A., Beauvoit, E., Boyard, N., & Guilminot, E. (2019). Effect of solvent on PARALOID® B72 and B44 acrylic resins used as adhesives in conservation. *Heritage Science*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40494-019-0283-9>
- Walter, M. V., & Malkoch, M. (2012). Simplifying the synthesis of dendrimers: Accelerated approaches. *Chemical Society Reviews*, 41(13), 4593–4609. <https://doi.org/10.1039/c2cs35062a>

- Warscheid, T., & Braams, J. (2000). Biodeterioration of stone: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46(4), 343–368. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00109-8)
- Ya-Ting Huang, A., Kao, C. L., Selvaraj, A., & Peng, L. (2023). Solid-phase dendrimer synthesis: a promising approach to transform dendrimer construction. *Materials Today Chemistry*, 27, 101285. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101285>
- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., & Cho, N. J. (2018). Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>
- Zand, E., Negrau, C., & Jaeger, H. (2022). Zand, E.;Negrau, C.; Jaeger, H. Bacterial Attachment and Biofilm Formation on Antimicrobial Sealants and Stainless Steel Surfaces. *Foods* 2022, 11, 3096. <https://doi.org/10.3390/foods11193096>

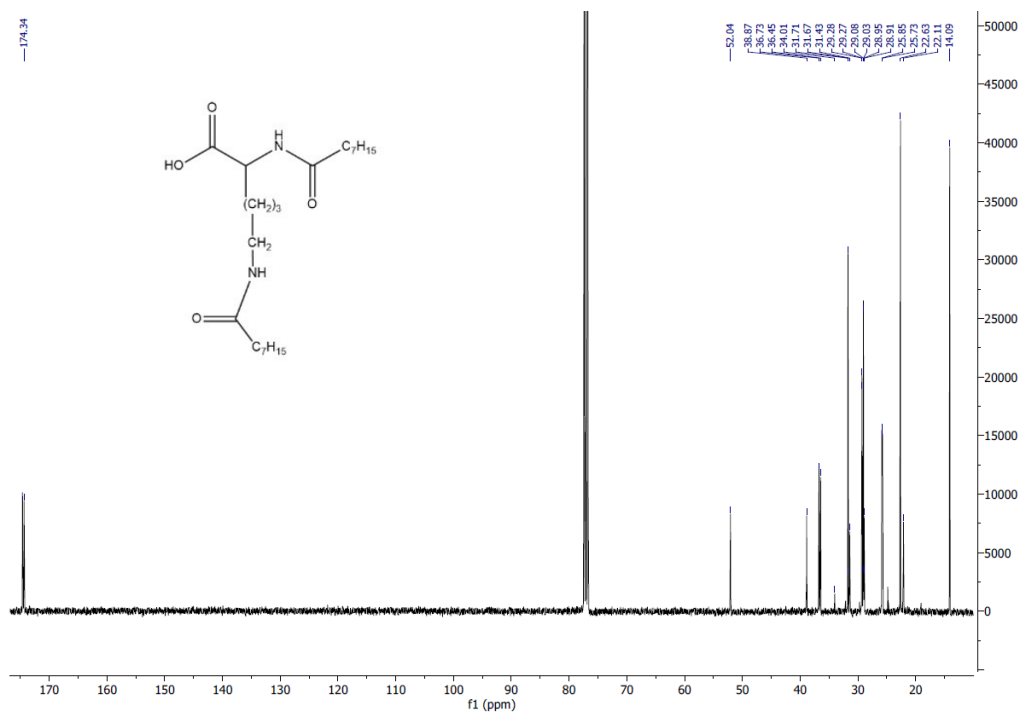
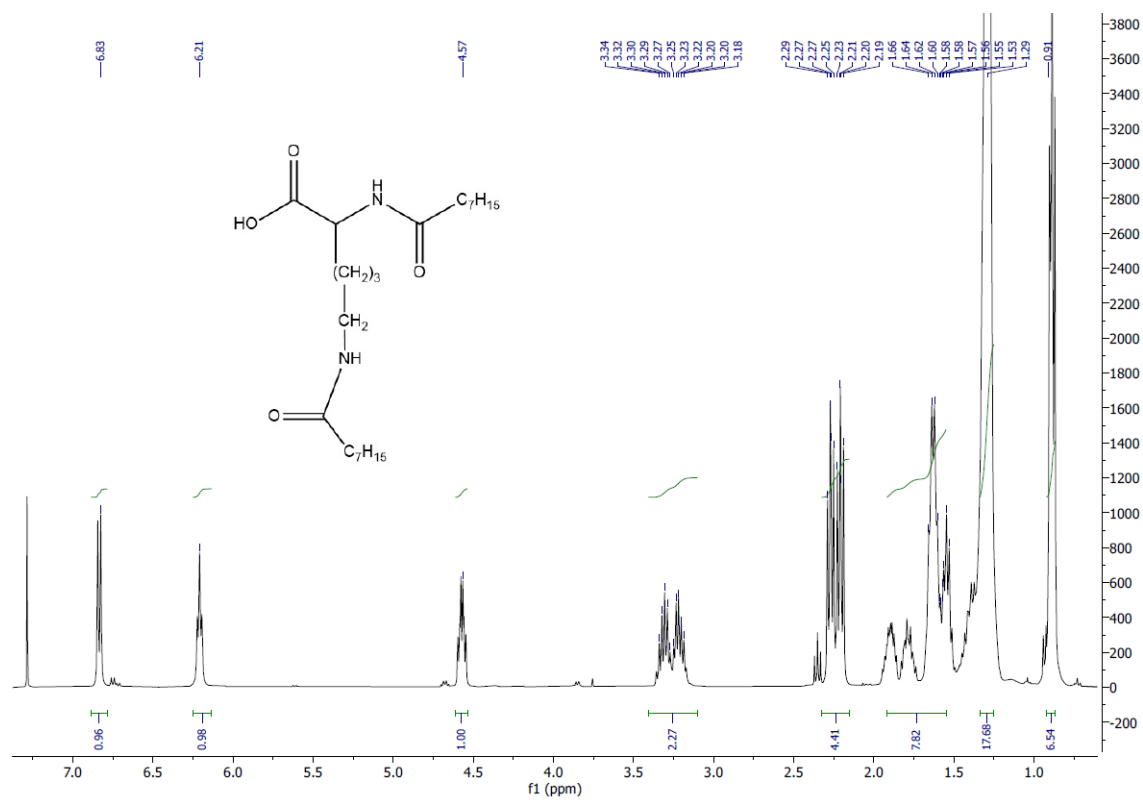
# ANEXOS

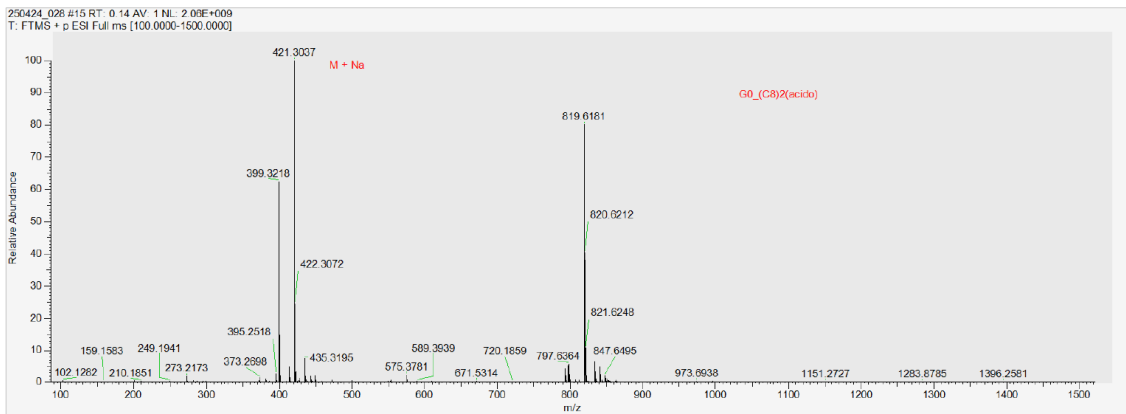
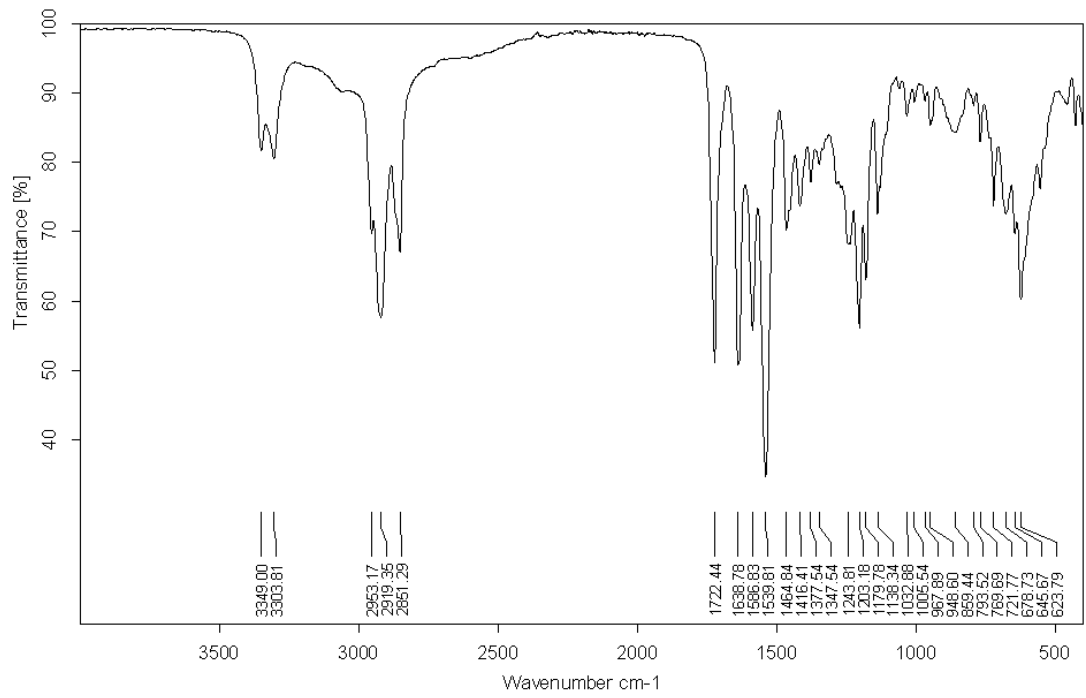
Anexo A: Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz), FTIR (ATR), ESI-MS (m/z) do composto G1(COOH)-C15



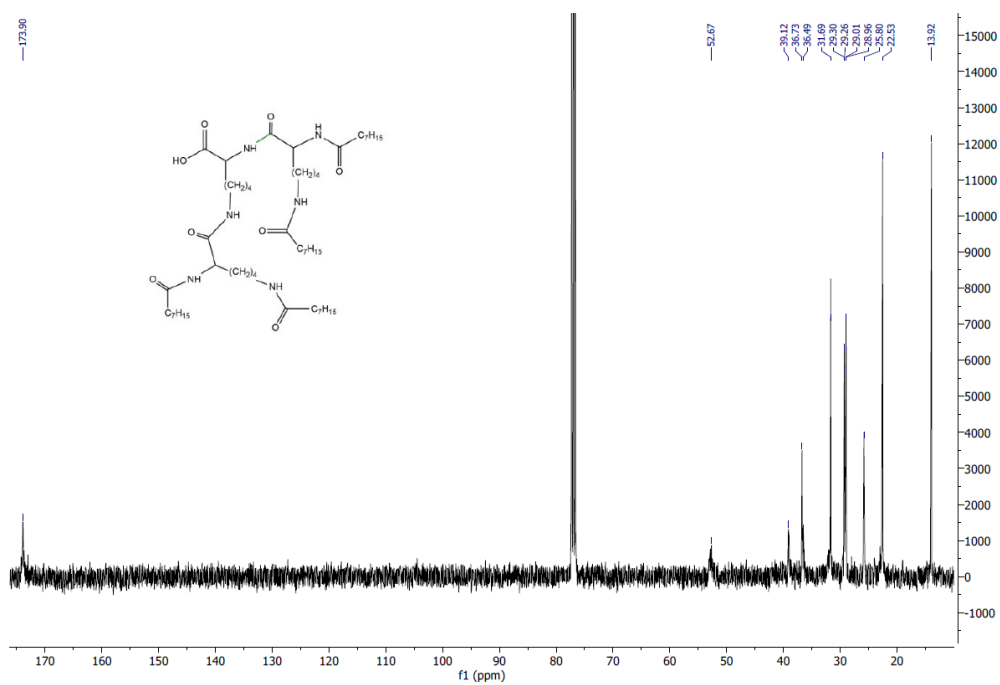
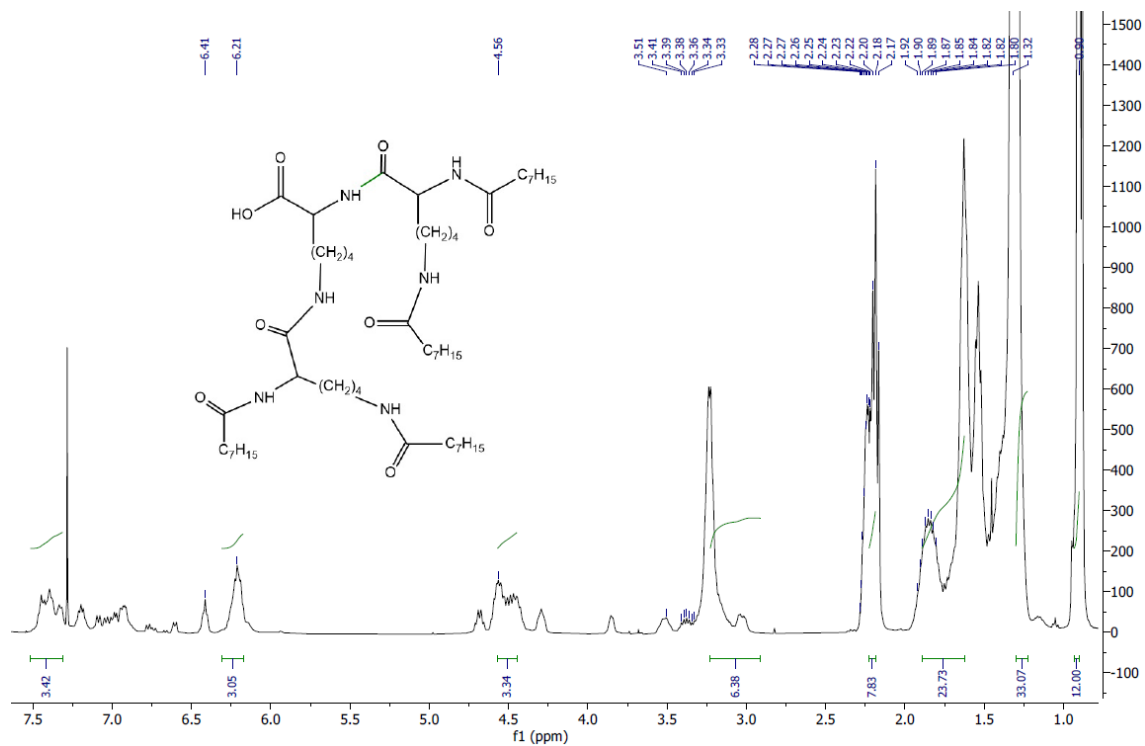


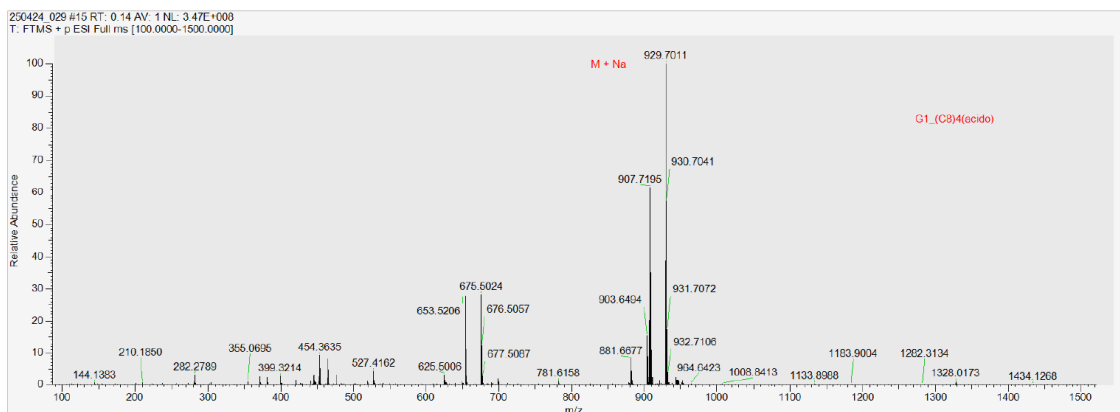
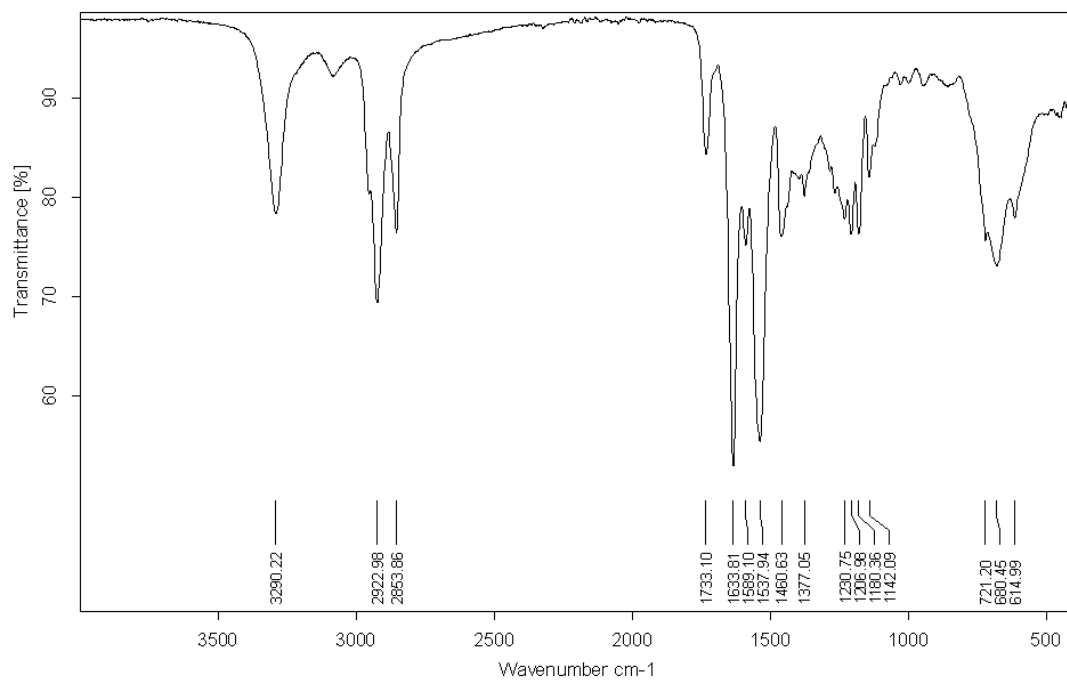
**Anexo B:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz), FTIR (ATR), ESI-MS (m/z) do composto G0(COOH)-C<sub>7</sub>



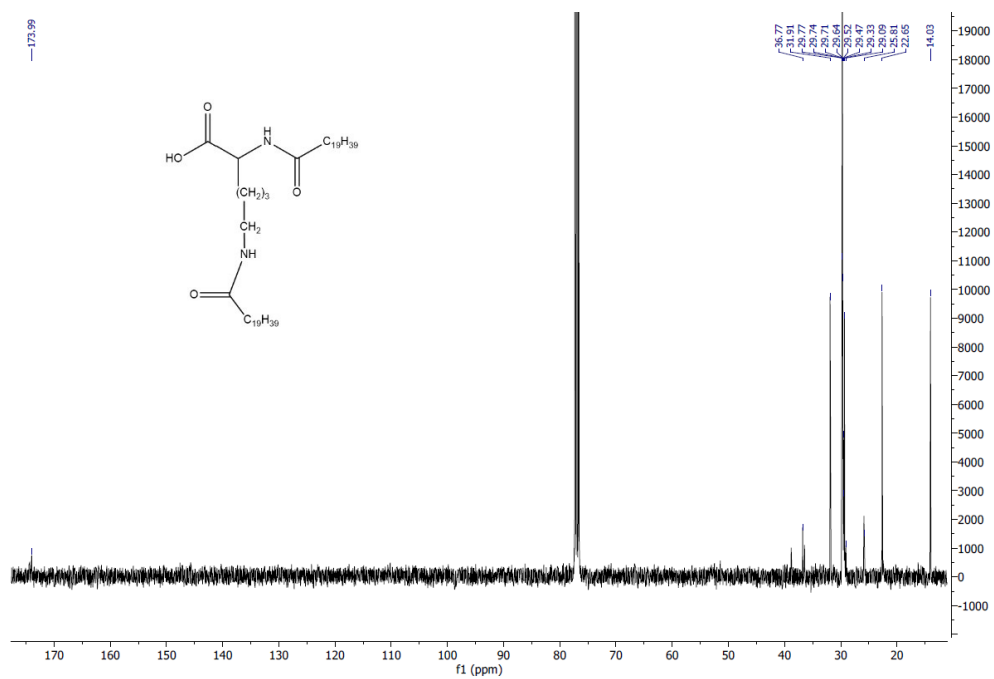
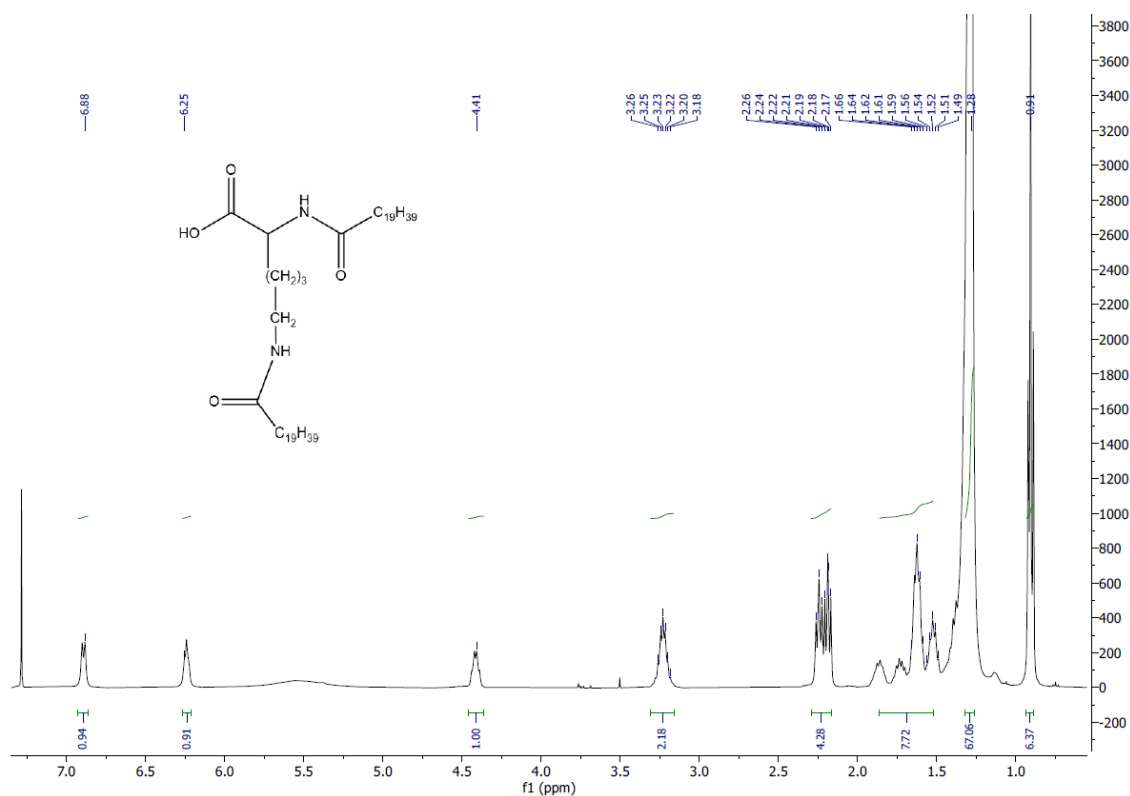


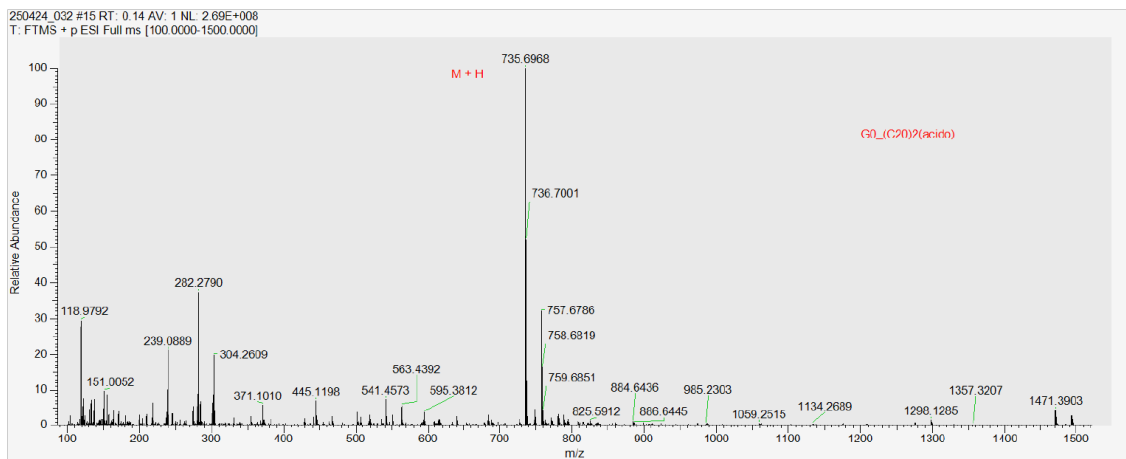
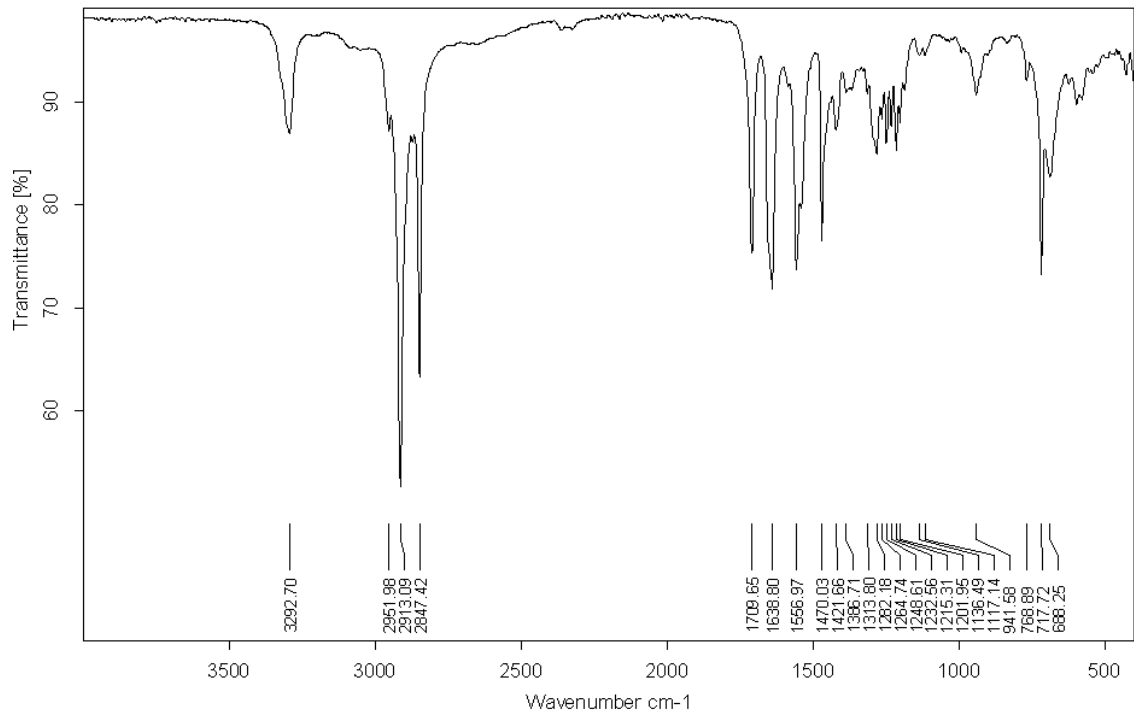
**Anexo C: Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz), FTIR (ATR), ESI-MS (m/z) do composto G1(COOH)-C<sub>7</sub>**



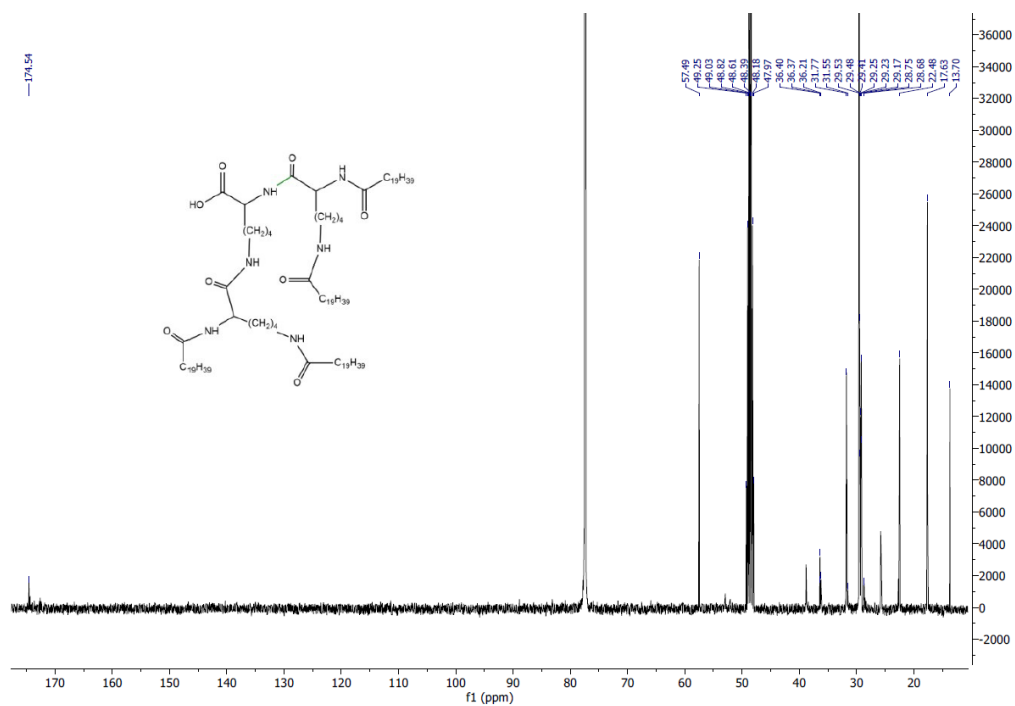
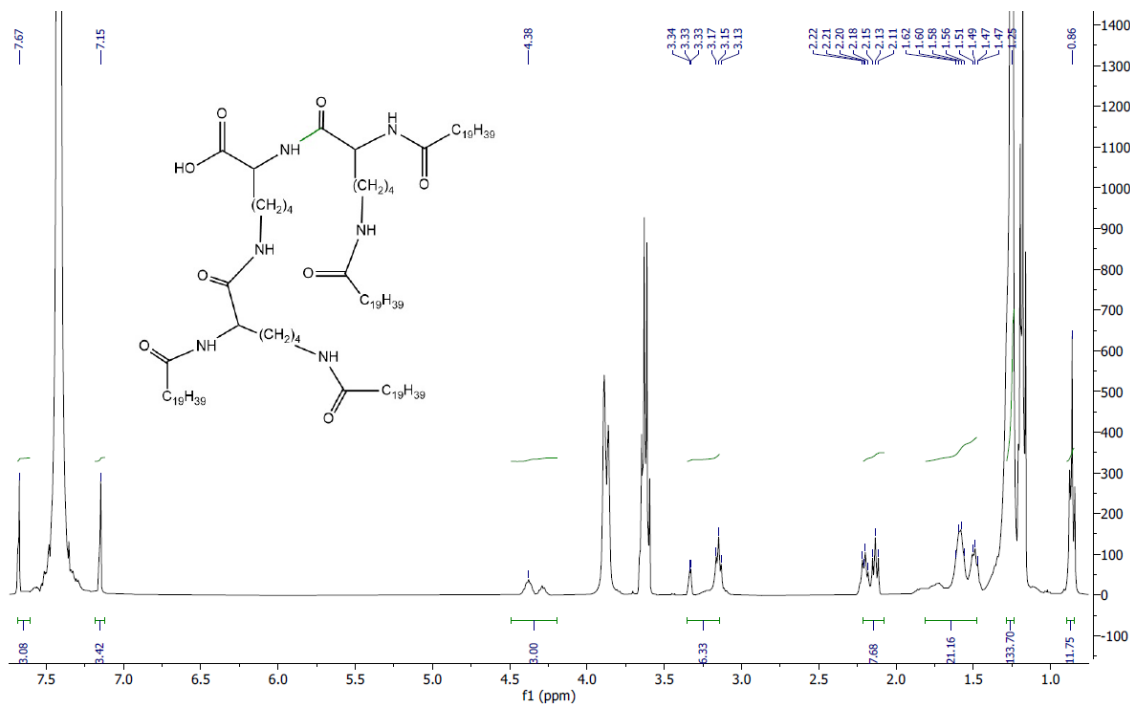


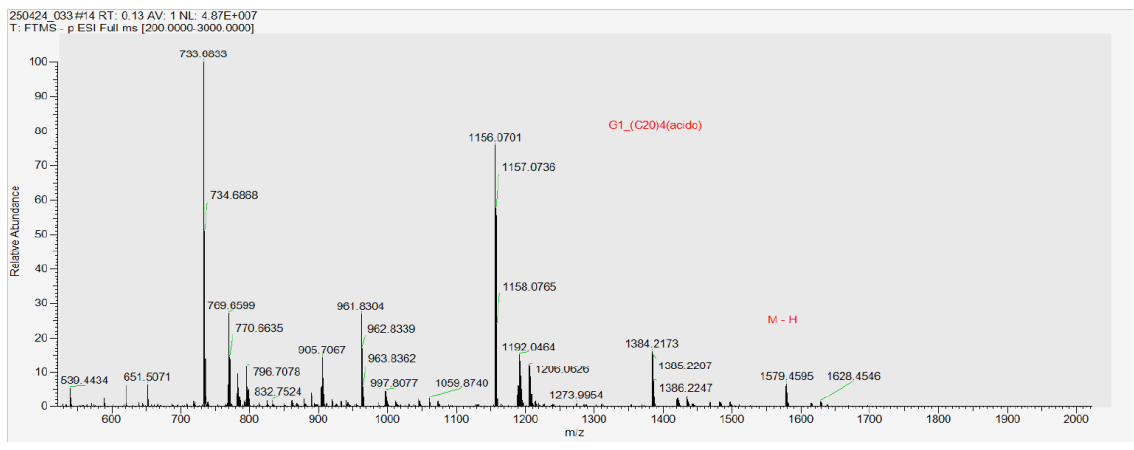
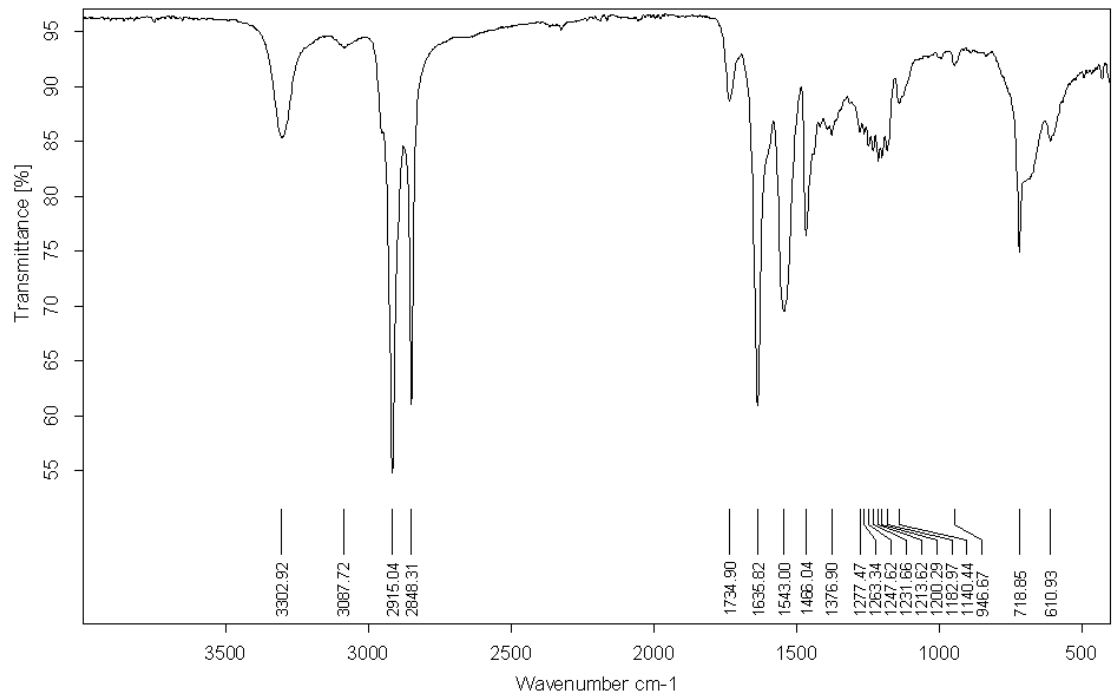
**Anexo D:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz), FTIR (ATR), ESI-MS (m/z) do composto G0(COOH)-C<sub>19</sub>



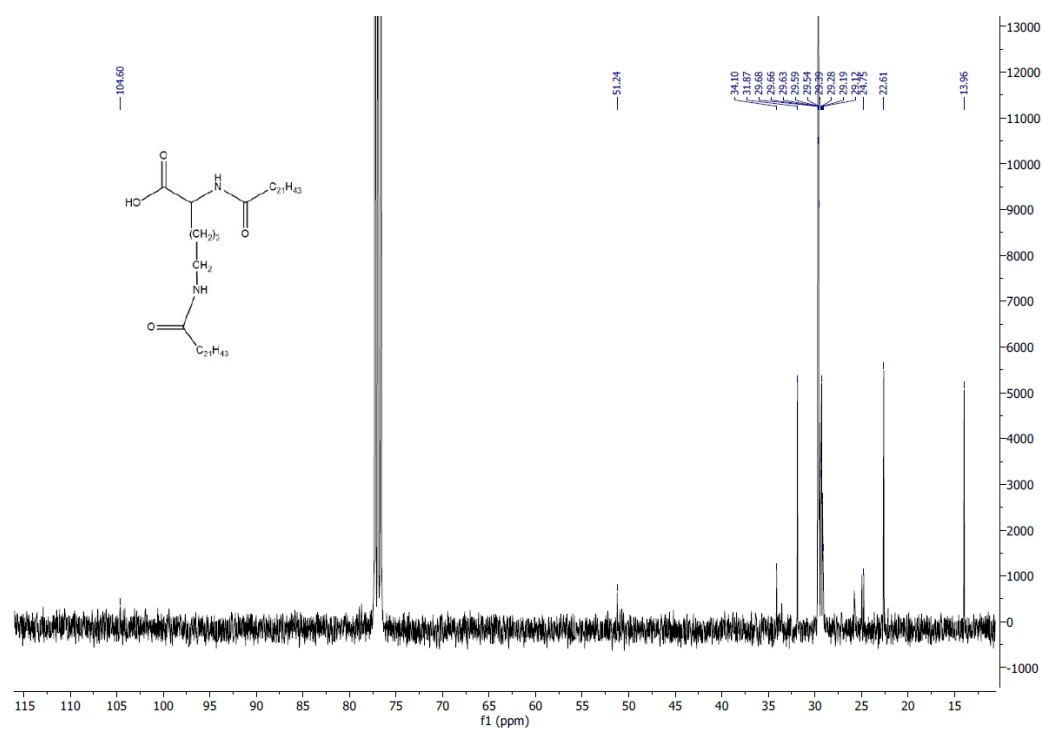
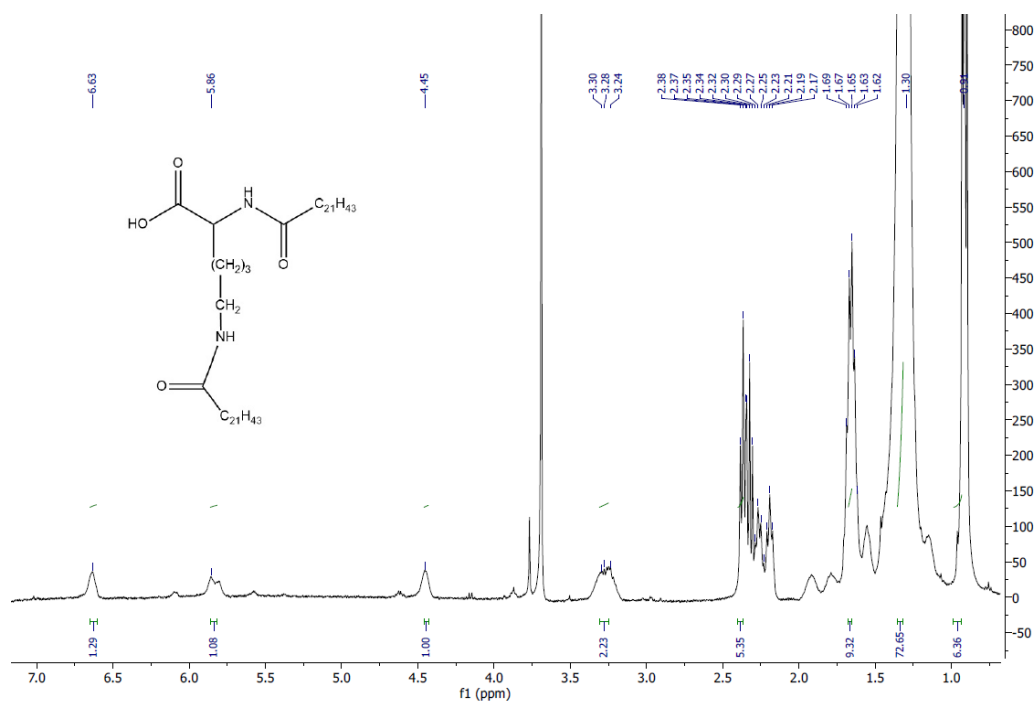


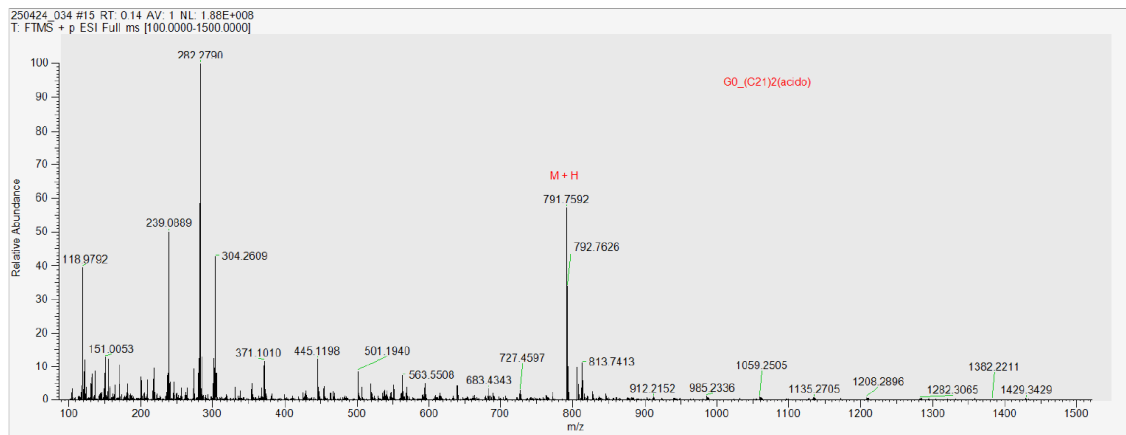
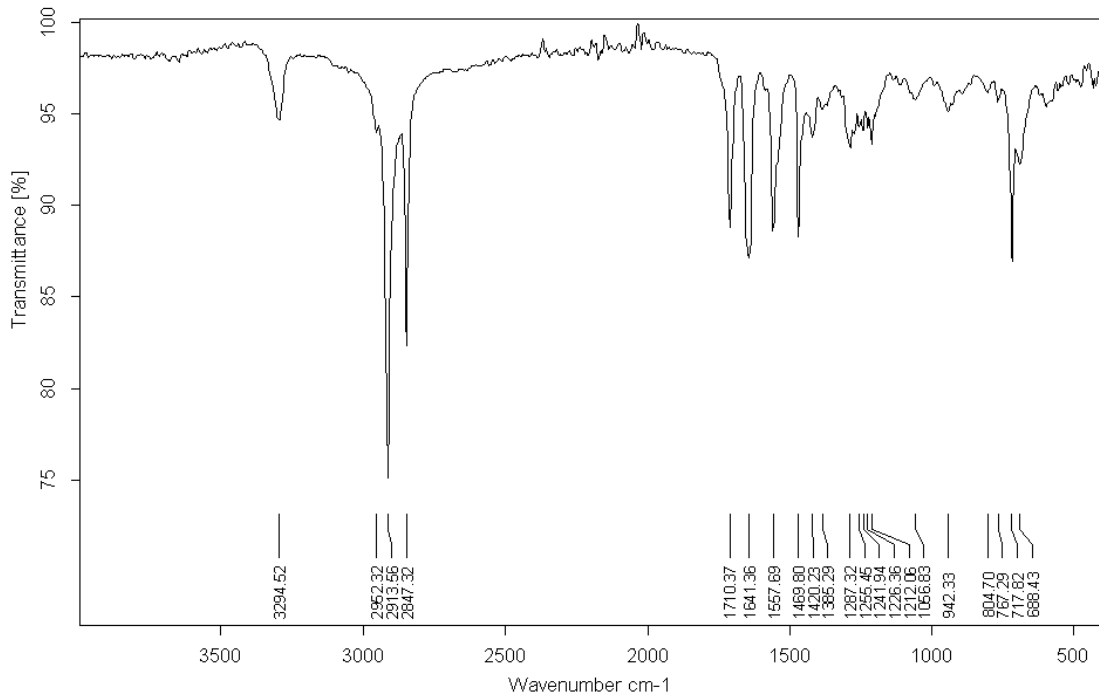
**Anexo E:** Espetros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz), FTIR (ATR), ESI-MS (m/z) do composto G1(COOH)-C<sub>19</sub>





**Anexo F:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz), FTIR (ATR), ESI-MS (m/z) do composto G0(COOH)-C<sub>21</sub>





**Anexo G:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz),  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz), FTIR (ATR), ESI-MS (m/z) do composto G1(COOH)-C<sub>21</sub>

