

Relatório de Progresso do Projeto NatBio

Relatório de Progresso n.º 1.

Período a que o relatório diz respeito

Data de início: 1 de setembro de 2021

Data de fim: 1 de setembro 2022

IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

- Título: Biocidas naturais para conservação sustentável do património
- Referência interna: CFPI2021/01
- Investigador Principal: Dina Mateus
- Data de início: 1 de setembro 2021
- Data de fim: 1 de setembro de 2023
- Financiamento concedido: 18050

RESUMO DOS TRABALHOS DESENVOLVIDOS E DESVIOS À PROPOSTA APROVADA

1. Resumo dos trabalhos

Foram concretizadas todas as atividades previstas para o 1º ano de execução do projeto e atingidos todos os objetivos programados.

Apresenta-se de seguida um resumo dos trabalhos efetuados por tarefa.

Task #1 - Biocides Extraction and Purification & Task #2 – Chemical Characterization

1- Foram decididas as plantas a utilizar em reunião via Zoom com os investigadores das 2 primeiras tasks. Definiram-se como critério base o seguinte: i) plantas pertencentes a Géneros diferentes e com composição química de óleos essenciais diferenciada; ii) efeito antimicrobiano que tradicionalmente lhes é atribuído; iii) o facto de serem produzidos industrialmente os óleos essenciais dessas plantas tendo sido já iniciado estudo prévio de caracterização química dos mesmos; iv) haver possibilidade de os adquirir posteriormente para suportar um maior volume de ensaios experimentais, dado que a sua hidrodestilação laboratorial é muito morosa e laboriosa. Optou-se pela utilização das seguintes plantas: Tomilho bela-luz – *Thymus mastichin*, L.; Perpétua-das-areias – *Helicrysum stoechas* (L.) Moench; Funcho – *Foeniculum vulgare*, Mill; Poejo – *Mentha pulegium*, L.; Rosmaninho-verde – *Lavandula viridis*, L'Her.

2 - Contactou-se a empresa D'Alenguadiana, situada em Cortes- Sines, Mértola para definir as datas de colheita das plantas.

3 – Deslocação da responsável da tarefa 1 ao Alentejo para recolha das plantas em junho 2021. Não foi possível colher todas devido às suas diferentes épocas de floração. A empresa comprometeu-se a enviar pelos CTT, nomeadamente o poejo no mês de julho e o funcho no final do mês de agosto.

4 - Foram decididos os solventes a utilizar na extração Soxhlet após um estudo acerca da polaridade dos solventes usuais e de reuniões com os investigadores das tarefas 5 e 6 que irão proceder à limpeza e preservação dos objetos. Optou-se por realizar as extrações com etanol e com n-hexano. As condições das extrações Soxhlet foram otimizadas em termos de tempo de extração e tamanho da partícula. A aluna Maria Inês Girão, inscrita na UC de Trabalho Final de LTQ aceitou realizar este trabalho de extração com solventes no IPT. Os resultados desta tarefa encontram-se descritos no Relatório do respetivo Trabalho Final.

5 – Por falta do aparelho de Clevenger no período de estágio não foi possível realizar as hidrodestilações em Tomar, pelo que se realizou uma deslocação à Universidade da Beira Interior (UBI) em julho 2021 para aí se extraírem os óleos essenciais, tarefa em que participaram a aluna, a responsável da Tarefa 1 e as 2 investigadoras da tarefa 2.

6 – A tarefa 2 foi integralmente realizada nos laboratórios de Química de Produtos Naturais da UBI e consistiu na caracterização da composição química dos óleos essenciais das amostras das 5 plantas supracitadas pelo método de cromatografia gasosa acoplada com espetrometria de massas (GC-MS). Os resultados referentes à amostra de *L. viridis* levantaram algumas questões ao serem comparados com a literatura pelo que se decidiu esperar pela floração do ano seguinte (2022) e repetir o processo de hidrodestilação e análise química. Em julho de 2022 foi realizada nova colheita e nova análise, pelo que a responsável da tarefa 1 deslocou-se de novo a Mértola e à UBI.

7 – Foi também executada a caracterização química dos OEs comerciais das plantas em análise.

Foi realizada uma comunicação oral na *1st International FibEnTech Congress, New opportunities for fibrous materials in the ecological transition*, UBI, Covilhã, Portugal, 9 a 10 de dezembro de 2021 e apresentado um artigo nos *Proceedings* deste congresso.

Task #3 – Laboratory experiments for biocidal assessment and impact study

1 – Realizou-se um revisão bibliográfica sobre os processos e metodologias de emulsificação de óleos essenciais (OEs) e sobre os métodos para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana. Optou-se pelo surfactante aniónico Dodecil sulfato de sódio (SDS) para preparar as emulsões e pelo método de disco-difusão para determinação da eficácia biocida dos extratos de solvente (ESs) e óleos essenciais das plantas selecionadas nas atividades anteriores.

2 – Efetuaram-se recolhas de microrganismos, por *swabbing* com zaragatoas esterilizadas e imediatamente imersas em solução de Ringer, de diversos locais do Claustro Principal do Convento de Cristo em Tomar e da Casa atribuída a Cantaber, nas ruínas do Museu Monográfico de Conímbriga.

3 – Efetuaram-se testes exploratórios com inoculação das suspensões dos microrganismos recolhidos em meios de crescimento para bactérias heterotróficas (TSA) fungos (PDA) e microalgas e bactérias autotróficas (BG11). Testaram-se várias concentrações de OEs e escolheu-se o biocida comercial Biotin T, como referência. Optou-se para prosseguimento dos estudos pela concentração de 20% de OEs e de ESs. Para as condições ensaiadas o OE da planta Perpétua-das-areias não revelou efeito biocida pelo que se decidiu não prosseguir estudos com o OE e os ESs desta planta.

4- Procedeu-se ao isolamento dos microrganismos cultiváveis em laboratório e à sua identificação preliminar, baseada na aparência morfológica e nas características bioquímicas. Posteriormente foi contratada a sua identificação por técnicas de biologia molecular ao Laboratório de Fitossanidade do Instituto Pedro Nunes. Não foram detetadas nas amostras microrganismos autotróficos cultiváveis em laboratório

5- Efetuaram-se testes para avaliar o efeito biocida dos OEs e ESs com os microrganismos isolados, pertencentes aos grupos das bactérias heterotróficas e fungos (leveduras e fungos filamentosos). Para as condições ensaiadas os ESs não revelaram efeito biocida significativo. Decidiu-se a continuação dos trabalhos apenas com os OEs que revelaram melhor potencial biocida nomeadamente os obtidos de Poejo, Funcho e Rosmaninho verde.

6 – Encontram-se em curso ensaios exploratórios em provetes para avaliar, não só o efeito biocida, mas também o efeito do OEs no material de suporte. Nomeadamente estudos colorimétricos, absorção de água e porosidade.

7- Nos trabalhos desta atividade estiveram envolvidos estudantes dos cursos de Licenciatura em Conservação e restauro (UC Biodeterioração) e Tecnologia Química (UCs Biotecnologia e Projeto).

Do trabalho desenvolvido nesta atividade estão aprovadas 2 comunicações em Congressos Científicos Internacionais com publicação de artigos em Proceedings, está ainda submetida uma comunicação num Congresso Internacional.

Task #4 – Ecotoxicology tests

1 - Revisão bibliográfica sobre o tema dos testes ecotoxicológicos para biocidas e biocidas naturais, em particular utilizando sementes de alface *Lactuca sativa*;

2 - Estudos preliminares para a compreensão da influência do emulsificante (Dodecil Sulfato de Sódio) na germinação das sementes. Foram testados os óleos essenciais de Poejo, Funcho e Rosmaninho Verde e o biocida comercial Botin T. Os testes com cada um destes quatro analitos envolveram 5 concentrações, cada uma com três repetições. Cada repetição consiste numa caixa de Petri de 10 cm de diâmetro, colocando-se na metade inferior uma folha de papel de filtro Whatman nº3 de 9 cm de diâmetro, sobre o qual são colocadas 20 sementes que são sujeitas ao contacto durante 120 horas com 4 ml de uma solução contendo óleo essencial e emulsificante. Verificou-se que a diluição dos óleos essenciais emulsificados deve ser feita apenas com água e que, para concentrações superiores a 0,2 g/L (0,02%), o emulsificante usado influencia fortemente a germinação e o tamanho da mesma.

3 - Estudo de otimização das melhores condições de ensaio, nomeadamente:

3.1 - Volume de solução a usar em cada repetição - O volume a pipetar para cada caixa de Petri para permanecer em contacto com as sementes deve ser de 8 mL.

3.2 - Colocação ou não de *Parafilm* como meio de selar as caixas de *Petri* usadas nos ensaios - A selagem da metade inferior das caixas de *Petri* com *Parafilm*, impede a evaporação da fase líquida e contribui para um maior tamanho das germinações.

4 – Fase exploratória - Para cada OE e para o biocida comercial, utilizou-se de uma sequência logarítmica de concentrações para determinação do ponto final do ensaio ecotoxicológico, que correspondente à inibição da germinação de 50% das sementes (IG₅₀). As concentrações dos analitos variaram numa gama entre 0,5 e 0,005 g/L. Trata-se de uma gama de concentrações em que sabemos, num extremo haverá inibição de germinação e no outro extremo haverá germinação de todas as sementes com tamanhos muito próximos dos tamanhos do ensaio de controlo efetuado apenas com água desionizada.

Esta fase indicou através de avaliação gráfica dos resultados que as concentrações aproximadas que inibem 50% das germinações.

5 – Fase de teste - Foram testados os três OEs emulsificados e o biocida comercial para 5 concentrações crescentes destes analitos em escala aritmética (igualmente espaçada) entre 0,2 e 1 g/L. Os resultados deste ensaio encontram-se em fase de apuramento.

Task #5 - In situ experiments

Selecionaram-se os locais do CCT e do MMC para a realização dos testes in situ dos com os OEs selecionados nas atividades 3 e 4. Está em curso a caracterização dos locais, o levantamento gráfico e fotográfico e ainda a monitorização ambiental. Foram adquiridos 3 dataloggers para registo de temperatura e humidade dos locais escolhidos.

Efetuaram-se diversas deslocações ao CCT e ao MMC.

2. Desvios à proposta aprovada

Não houve desvios à proposta aprovada

BALANÇO ORÇAMENTAL E DESVIOS À PROPOSTA APROVADA

1. Balanço orçamental

Neste período foram efetuados gastos nas seguintes rubricas e atividades do projeto:

Missões: Deslocações à empresa D'Alenguadiana em Mértola para recolha de plantas e obtenção de OEs; deslocação à UBI (parceiro do projeto) para a caracterização dos OEs e ESs; deslocação ao MMC (parceiro do projeto) para recolha de amostras, registo fotográfico colocação de dataloggers para monitorização ambiental e recolha de dados; Deslocação ao IPN para entrega das amostras de microrganismos para análise/identificação.

Aquisição de bens e serviços: Aquisição de solventes, reagentes e material corrente de laboratório para os ensaios das atividades 1, 2, 3, 4 e 5; aquisição de análises ao IPN para a atividade 3; aquisição de normas ISSO para a atividade 4.

Demonstração, Promoção e Divulgação: Inscrição em 3 conferências Internacionais (FibEnTech 21; ICEST2022; EMCEI2022).

Equipamento: aparelho de Clevenger para obtenção de OEs; 3 dataloggers (EL-USB-2) para monitorização das condições ambientais; Medidor portátil de oxigénio dissolvido (Hanna Instruments HI9174-04) para os ensaios de ecotoxicidade.

Na tabela 1 apresentam-se os montantes executados no 1º ano de execução do projeto (setembro 2021 a setembro 2022). A informação apresentada foi disponibilizada pela gestão financeira do Techn&Art. Os pedidos e orçamentos comparativos foram feitos pelo Investigador principal e pelos Investigadores responsáveis de cada atividade. Contudo os investigadores do projeto não têm conhecimento dos valores finais pagos, nem das datas de pagamento.

Tabela 1 – Montantes executados (informação fornecida pela gestão financeira do Techn&Arte)

Rubrica	2021	2022
Resumo	Executado	Executado
Missões	- €	633,90 €
Aquisição de bens e serviços	567,00 €	3 148,67 €
Demonstração, Promoção e Divulgação	100,00 €	679,51 €
Equipamento	720,40 €	1 949,03 €
Total	1 387,40 €	6 411,11 €

2. Desvios à proposta aprovada

A análise apresentada é apenas indicativa uma vez que como já foi referido anteriormente os investigadores do projeto não recebem informação exata das despesas, nem datas de pagamento. Os desvios à proposta aprovada encontram-se principalmente em três rubricas, nomeadamente:

1 – Demonstração, Promoção e Divulgação - Devido à situação pandémica da Covid-19 não foi possível a presença em eventos presenciais, sendo que nos eventos à distância as taxas de inscrição são inferiores e não houve despesas com deslocações e alojamento. Será no próximo ano reforçada a presença em eventos, prevendo-se ainda o pagamento de taxas de publicação de artigos em revistas científicas.

2 – Missões – As reuniões previstas para a equipa do Projeto realizaram-se principalmente online.

2- Equipamento – A verba não executada destinava-se à compra de um computador portátil para trabalho de campo, a sua aquisição não foi autorizada.

Tabela – Desvios face à proposta aprovada (os destaques correspondem a parcelas que não conferem com a informação fornecida pela área financeira do Techn&Art, situação a averiguar)

Rubrica	2021 e 2022		2022
	previsto	executado	diferença
Missões	1500,00 €	633,90 €	866,10 €
Aquisição de bens e serviços	4000,00 €	3715,67 €	284,33 €
Demonstração, Promoção e Divulgação	3 500,00 €	779,51 €	2 720,49 €
Equipamento	3250,00 €	2669,43 €	580,57 €
Total	12250,00 €	7798,51 €	4451,49 €

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

A equipa de investigação não sofreu alteração

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Trabalhos finais do curso

Maria Inês Girão (2021). Isolamento e caracterização de compostos extratáveis de plantas aromática. Trabalho Final da Licenciatura em Tecnologia Química, novembro 2021, Instituto Politécnico de Tomar.

Vera Patrícia Marques Perna (2022, submetido). Efeito biocida de óleos essenciais e extratos de plantas contra microrganismos isolados das ruínas da cidade Romana de Conímbriga e do Convento de Cristo da Cidade de Tomar. Trabalho Final da Licenciatura em tecnologia Química, (submetido) Instituto politécnico de Tomar.

Comunicações em Evento Nacional

Mateus, D.M.R. et al. (2021). Biocidas naturais para conservação sustentável do património. Webinar de apresentação pública Projetos do Techn&Art, 12 de julho, Tomar. https://adamastor.ipt.pt/NatBio/publicacoes/20210712_NatBio-apresentacao_final.mp4

Mateus, D.M.R. (2022). Biocidas naturais para conservação sustentável do património – NatBio. Sessão Apresentação Projetos – Iniciação à Investigação, 9 de março de 2022, Escola Secundária Santa Maria do Olival – Tomar.

https://adamastor.ipt.pt/NatBio/publicacoes/20220309_ESSMO_Projetos_I_e_D.mp4

Comunicações em Congresso Internacional

Cecília Baptista, Luís Santos, Maria Emília Amaral and Lúcia Silva. Chemical characterization of essential oils with biocide base for conservation and restoration. 1st International FibEnTech Congress 2021, December 9-10, Covilhã (online).

<https://www.youtube.com/watch?v=ESfVR42LwuY&t=3480s>

Dina Mateus, Fernando Costa and Ricardo Triães (aceite para comunicação oral). Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Portuguese Convent of Christ in Tomar. 13th International Conference on Environmental Science and Technology.

Dina Mateus, Vera Perna, Pedro Sales, Virgílio Correia (aceite para comunicação oral). Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Portuguese Convent of Christ in Tomar. 4th Euro Mediterranean Conference for Environmental Integration.

Eduardo Ferraz e Dina Mateus (submetido). Ação de óleos essenciais de funcho, poejo e rosmaninho (com potencial efeito biocida), na tonalidade de calcários provenientes do Convento de Cristo (Tomar) e do Museu Monográfico de Conímbriga. XXIII Encontro da REALP Ciências da Sustentabilidade em Língua Portuguesa.

Artigo Científicos

Cecília Baptista, Luís Santos, Maria Emilia Amaral, and Lúcia Silva, (2022). Chemical Characterization of Essential Oils With a Biocide Base for Conservation and Restoration. In 1st International FibEnTech Congress (FibEnTech21) New opportunities for fibrous materials in the ecological transition, KnE Materials Science, pages 80–90. DOI 10.18502/kms.v7i1.11611 [https://knepublishing.com/index.php/KnE-](https://knepublishing.com/index.php/KnE-Materials/issue/view/338)

[Materials/issue/view/338](https://knepublishing.com/index.php/KnE-Materials/issue/view/338)

Dina Mateus, Fernando Costa and Ricardo Triães (aceite para publicação). Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Portuguese Convent of Christ in Tomar. In: 13th International Conference on Environmental Science and Technology.

Dina Mateus, Vera Perna, Pedro Sales, Virgílio Correia (aceite para publicação). Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Portuguese Convent of Christ in Tomar. In: 4th Euro Mediterranean Conference for Environmental Integration.

Data: 30 de setembro de 2022

Assinatura digital do Investigador Principal: