



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NICOLE SCHWANTES CEZARIO

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DE CAVERNA NO FECHAMENTO DE POROS E
FISSURAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS**

LONDRINA
2021

NICOLE SCHWANTES CEZARIO

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DE CAVERNA NO FECHAMENTO DE POROS E
FISSURAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a Dr^a Berenice Martins
Toralles

LONDRINA
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C425 Cezario, Nicole Schwantes .
INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE CAVERNA NO FECHAMENTO DE PÓROS E FISSURAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS / Nicole Schwantes Cezario. - Londrina, 2021.
255 f. : il.

Orientador: Berenice Martins Toralles.
Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Tecnologia e Urbanismo, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Autocicatrização - Tese. 2. Bactérias - Tese. 3. CaCO₃ - Tese. 4. Fissuras - Tese. I. Toralles, Berenice Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Tecnologia e Urbanismo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. III. Título.

CDU 62

NICOLE SCHWANTES CEZARIO

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DE CAVERNA NO FECHAMENTO DE POROS E
FISSURAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Engenharia Civil da Universidade Estadual
de Londrina, como requisito parcial à obtenção
do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Berenice Martins Toralles
Universidade Estadual de Londrina

Prof^º Dr^º Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior
Universidade Estadual de Londrina

Prof^º Dr^º Márcio Florian
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof^ª Dr^ª Nayara Soares Klein
Universidade Federal do Paraná

Prof^º Dr^º Wellington Longuini Repette
Universidade Federal de Santa Catarina

Londrina, 14 de dezembro

*Ao meu amado esposo Davi pelo apoio
incondicional em todos os momentos.*

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

Galileu Galilei

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que me deu e por ter me dado subsídio para chegar até aqui, dando-me forças para não desistir dos meus sonhos.

Ao meu amado esposo Davi de Souza Cezario, que com muito carinho me ajudou a manter a calma, ter paciência e me incentivou a não desistir em momento algum. Tenho certeza de que não teria conseguido atingir meus objetivos sem o seu apoio.

Aos meus pais, Vilson e Eloísa, ao meu irmão Daniel e à minha cunhada Rosiane, os quais são meu maior orgulho e exemplo de vida, que de forma especial sempre estiveram presentes em todos os momentos dividindo alegrias e tristezas e me dando forças para continuar na busca dos meus sonhos.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Berenice Martins Toralles, que me repassou todo seu conhecimento, foi paciente e compreensiva o tempo todo.

Aos professores doutores Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior, Gerson Nakazato e Renata Kobayashi por todo o auxílio e por disponibilizarem seus laboratórios para o desenvolvimento da pesquisa. E agradecendo a vocês, estendo meus agradecimentos ao aluno Msc. Gustavo Teixeira, pela realização da bioinformática do sequenciamento do genoma completo, e a todos os integrantes do NIP 3, principalmente ao Dr. Leonardo Medeiros, que foi meu braço direito e me ensinou muito sobre os procedimentos necessários para os experimentos na parte da microbiologia.

Ao professor Dr. Avacir Casanova Andrello, pela realização dos ensaios de Porosimetria por Intrusão de Mercúrio, ao professor Dr. Paulo Rogério, pela realização dos ensaios de DRX e ao professor Dr. Paulo Parreira pelas análises de FRX.

À professora Dra. Raquel Teixeira pela disponibilização do uso do Laboratório de Solos da Universidade Estadual de Londrina para a realização da fissuração nas amostras.

Ao professor Dr. André Vanzela e aos seus alunos do Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal, pela disponibilização da estereoscópio para as análises.

Aos professores membros da banca pelas contribuições para a melhoria do trabalho.

Ao Instituto Senai de Inovação em Engenharia de Estruturas pela realização das análises em MEV da última campanha experimental, em especial gostaria de

agradecer a minha querida amiga Geovana Ferreira Nogueira Camargo, pelo incansável auxílio na operação do equipamento e aquisição das imagens.

Ao meu querido amigo Gersson Barreto Sandoval pelo a apoio e companheirismo durante todo o doutorado, em especial pelo auxílio na padronização e análise do ensaio de permeabilidade.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, Geovana Souza Ferreira Nogueira, Alisson do Couto Franco, Maria Fernanda Porto, David Baldon e Livia Fernanda Silva pelo ombro amigo nos momentos difíceis e pelas boas risadas, mesmo as que eram de desespero foram fundamentais para que eu mantivesse a saúde mental durante esse período.

Aos alunos de Iniciação científica Lucca Viera Cremasco e Alex Morin Carneiro, pelo auxílio no desenvolvimento das campanhas experimentais e redação de artigos científicos.

À aluna de TCC Camila Vianna Neves pelo auxílio nos ensaios de permeabilidade da última campanha experimental.

Ao aluno de pós-graduação do departamento de Engenharia Elétrica, Angel Labrador, pelo auxílio na montagem do sistema intermitente e assessoria na escolha dos equipamentos necessários.

Aos técnicos do Laboratório de Materiais de Construção, Microscopia eletrônica e Microanálise e Espectroscopia pelo cuidado ao manusearem minhas amostras e pelo auxílio na realização dos ensaios.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho, que contribuíram direta ou indiretamente na realização desse trabalho. E a toda a equipe do Sinapse da Inovação Paraná e da Fundação Araucária, pelos treinamentos e pelo recurso recebido. Sem ele não conseguiríamos realizar todos os ensaios e adquirir os materiais necessários.

Encerro os meus agradecimentos com a seguinte colocação: “Uma tese não se constrói sozinha”. Existem tantas pessoas por trás dessa escrita: uma orientadora sempre disposta a corrigir e orientar. Um esposo sempre atencioso e paciente que inúmeras vezes me auxiliou em outras atividades para que eu pudesse escrever. A família e os amigos que sempre entenderam o porquê da minha ausência e sempre me incentivaram a continuar na busca dos meus sonhos.

“Uma tese não se constrói sozinha” ... O meu muito obrigada a todos, do fundo do meu coração. Se eu consegui chegar até aqui, foi pelo auxílio de todos vocês!

SCHWANTES-CEZARIO, NICOLE. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE CAVERNA NO FECHAMENTO DE POROS E FISSURAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS. 2021. 255 páginas. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Os materiais de base cimentícia são utilizados na construção civil por apresentarem bom desempenho mecânico e durabilidade. Porém esses materiais podem apresentar manifestações patológicas, sendo a fissuração uma das mais frequentes. Fissuras de até 0,4 mm são previstas no dimensionamento de estruturas de concreto, porém, com o tempo, estas podem levar à diminuição da vida útil desses materiais e acelerar sua degradação. Buscando minimizar este problema, bactérias precipitadoras de cristais de carbonato de cálcio (CaCO_3) começaram a ser aplicadas em materiais cimentícios para a autocicatrização de fissuras, evitando sua deterioração precoce e protegendo-os não apenas dos desgastes sofridos pela entrada de água, mas também por outras substâncias prejudiciais. Diferentes microrganismos capazes de precipitar cristais de CaCO_3 precisam ser estudados, dentre os quais destacam-se as bactérias isoladas das cavernas. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o fechamento de poros e a autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios mediante a precipitação de CaCO_3 promovida pela adição de bactérias isoladas de caverna, assim como a influência da condição de exposição no potencial de atuação destes microrganismos. Para atingir esse objetivo, o estudo foi dividido em três campanhas experimentais. Na primeira, buscou-se selecionar uma bactéria com maior potencial de precipitação de CaCO_3 , e assim com maior capacidade de autocicatrização. Na segunda campanha a bactéria selecionada foi testada em diferentes concentrações, em argamassas de traço 1:3 e relação água/cimento (a/c) de 0,54, buscando a concentração ideal para aplicação em materiais cimentícios. Por fim, a bactéria selecionada na concentração ideal foi aplicada novamente em argamassas de mesmo traço, com a adição de lactato de cálcio, sendo então submetidas a diferentes condições de exposição para a análise do fechamento de poros, autocicatrização e tratamento de superfície de fissuras. Com os resultados obtidos, verificou-se que a bactéria isolada CV16, identificada como *B. subtilis*, apresentou maior potencial de precipitação de CaCO_3 e, por esse motivo, foi selecionada para aplicação nas demais etapas experimentais, sendo então liofilizada para facilitar sua aplicação. Com relação à concentração a ser aplicada verificou-se um maior fechamento de fissura com a adição da concentração de 10^7 células/mL na água de amassamento, sendo que esta concentração não apresentou prejuízos às propriedades mecânicas do material, sendo então selecionada para a última etapa. Na terceira campanha experimental, verificou-se que a adição dos esporos não foi prejudicial a resistência à compressão e não acelerou a carbonatação em amostras bipartidas. Com relação às condições de exposição, observou-se que a presença de água é fundamental para potencializar a autocicatrização. Os cristais precipitados foram de calcita, varita e aragonita, de acordo com a análise em MEV e DRX. Desta forma, concluiu-se que a bactéria *B. subtilis* isolado CV16 pode atuar na autocicatrização de fissuras em locais em contato com água, assim como pode ser aplicada em edificações existentes no tratamento de superfície de fissuras.

Palavras-chave: Autocicatrização; Bactérias; CaCO_3 ; Fissuras; Poros.

SCHWANTES-CEZARIO, NICOLE. INFLUENCE OF CAVE-ISOLATED BACTERIA ADDITION FOR PORES AND CRACK FILLING IN CEMENT-BASED MATERIALS. 2021. 255 pages. Thesis (Doctorate degree in Civil Engineering) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Cement-based materials are used in civil construction due to their mechanical performance and durability. However, these materials may present pathological manifestations, being that cracking is a frequent problem. Cracks measuring up to 0.4 mm are foreseen in concrete structures design, however, over time, these can lead to a reduction in the lifespan of the materials and accelerate their degradation. Searching for a solution to this problem, bacteria precipitating calcium carbonate crystals (CaCO_3) began to be applied to cementitious materials for cracks self-healing, preventing their early deterioration and protecting them not only from the wear and tear suffered by water infiltration, but also by other harmful substances. Different microorganisms capable of precipitating CaCO_3 crystals need to be studied, among which stand out cave-isolated bacteria. This study aims to evaluate the capacity of filling pores and cracks in cementitious materials through the precipitation of CaCO_3 promoted by the addition of cave-isolated bacteria, as well as the exposure condition that enhances the performance of those microorganisms. To achieve this goal, the study was divided into three experimental campaigns. In the first, the aim was to select the bacterium with the greatest potential for CaCO_3 precipitation, and thus with greater self-healing capacity. In the second campaign, the selected bacterium was tested in different concentrations, in mortars with a 1:3 cement-to-sand ratio and 0.54 water-to-cement ratio, seeking the ideal concentration for application in cementitious materials. Finally, in the last campaign, the bacteria selected at the ideal concentration was applied once again in mortars using the same cement-to-sand ratio, with the addition of calcium lactate, being subjected to different exposure conditions for the analysis of pore closure, crack self-healing and surface treatment. With the results obtained, it was found that the cave-isolated bacteria CV16, identified as *B. subtilis*, had the greatest potential for CaCO_3 precipitation and for this reason was selected for application in the other experimental stages, being then lyophilized to facilitate its application. When the concentration to be applied in the mortars was studied, the greatest self-healing was observed with the addition of 10^7 spores/mL, and this concentration did not jeopardize the mechanical properties of the material, being then selected for the last step. In the third experimental campaign, it was found that the addition of spores was not harmful to the compressive strength and did not accelerate carbonation in split samples. Regarding the exposure conditions, it was observed that the presence of water is essential to enhance the self-healing. It is worth noting that the precipitated crystals were calcite, varite and aragonite, according to the SEM and XRD analysis. Thus, it is concluded that the bacteria *B. subtilis* isolated CV16 can act in the self-healing of cracks when in contact with water, as well as being applied in existing buildings, treating cracked surfaces.

Keywords: Self-healing; Bacterial; CaCO_3 ; Cracks; Pores.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MUSEU DE ARTE DO RIO DE JANEIRO.....	34
FIGURA 2 – FISSURA EM UMA LAJE DE GARAGEM SEM A ADIÇÃO DE BACTÉRIAS (A) E COM A ADIÇÃO DE BACTÉRIAS (B).....	35
FIGURA 3 – TANQUE DE ÁGUA EM ROTERDÃ	36
FIGURA 4 – LAJE ELABORADA COM ADITIVO À BASE DE BACTÉRIAS	36
FIGURA 5 – CAUSAS DA AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS	37
FIGURA 6 – COMPARAÇÃO DO ANTES E DEPOIS DE FISSURAS SEM E COM UM AGENTE DE AUTOCICATRIZAÇÃO	42
FIGURA 7 – ACOMPANHAMENTO DE FISSURAS DE 0,3 MM (A) E 0,8 MM (B) DURANTE 20 DIAS DE CURA	42
FIGURA 8 – ACOMPANHAMENTO DA AUTOCICATRIZAÇÃO DE FISSURAS POR IMAGEM PELA ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BACTÉRIA	43
FIGURA 9 – AUTOCICATRIZAÇÃO DAS FISSURAS APÓS 165 DIAS DE CURA	44
FIGURA 10 – AUTOCICATRIZAÇÃO DE FISSURA POR ADIÇÃO DE BACTÉRIAS E NUTRIENTES EM MICROCÁPSULAS	44
FIGURA 11 – FECHAMENTO DE FISSURAS EM AMOSTRAS DE CONCRETO PROJETADO ANTES E DEPOIS DE 28 DIAS DE CURA, SENDO GRUPO G1 (A), G2 (B); G3(C) E G4 (D)	45
FIGURA 12 – ENSAIO DE PERMEABILIDADE DE CARGA VARIÁVEL	47
FIGURA 13 – RESULTADOS DE TAN E COLABORADORES PARA A TAXA DE AUTOCICATRIZAÇÃO	47
FIGURA 14 – ILUSTRAÇÃO DAS ABERTURAS FORMADAS NO ESTUDO REALIZADO POR RONG <i>ET AL.</i> , (2020).....	49
FIGURA 15 – ESQUEMA ENSAIO DE PERMEABILIDADE DE CARGA CONSTANTE	49
FIGURA 16 – TAXA DE AUTOCICATRIZAÇÃO (R _k) DAS ARGAMASSAS PELO TESTE DE PERMEABILIDADE	50
FIGURA 17 – TAXA DE AUTOCICATRIZAÇÃO (R _w) DAS ARGAMASSAS PELA MEDIÇÃO DA ÁREA DA ABERTURA	50
FIGURA 18 – LEVANTAMENTO REALIZADO POR NGUYEN <i>ET AL.</i> , (2019) SOBRE AS BACTÉRIAS UTILIZADAS PARA AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS....	52
FIGURA 19 – MICROGRAFIA DA DIVISÃO CELULAR DE <i>B. SUBTILIS</i>	53
FIGURA 20 – AUTOCICATRIZAÇÃO PROMOVIDA PELA BACTÉRIA ISOLADA DA CAVERNA JOMBLANG NA INDONÉSIA	55
FIGURA 21 – CÉLULA BACTERIANA COMO LOCAL DE NUCLEAÇÃO DOS CRISTAIS DE CaCO ₃ EM MEIO A UMA FONTE DE CÁLCIO (A) E PELA DEGRADAÇÃO DO EPS (B E C)	56
FIGURA 22 – REPRESENTAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE <i>B. PASTEURII</i> ATUANDO COMO LOCAL DE NUCLEAÇÃO DO CaCO ₃	57
FIGURA 23 – RESULTADOS DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO FRENTE A VARIAÇÃO DA FONTE DE CÁLCIO ADICIONADA	63
FIGURA 24 – INFLUÊNCIA DO PERCENTUAL DA FONTE DE CÁLCIO NA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DE MATERIAIS CIMENTÍCIOS.....	64

FIGURA 25 – RESULTADOS DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO OBTIDOS POR JONKERS E COLABORADORES	65
FIGURA 26 – MORFOLOGIA DOS POLIMORFOS DE CaCO_3 ENCONTRADOS NA LITERATURA (CONTINUA).....	69
FIGURA 27 – MORFOLOGIA DOS POLIMORFOS DE CaCO_3 ENCONTRADOS NA LITERATURA (CONTINUAÇÃO)	70
FIGURA 28 – CaCO_3 PRECIPITADO PELA MUDANÇA DE pH EM UMA ARGAMASSA BÁSICA POR MEIO DA ADIÇÃO DE ESPOROS DA BACTÉRIA <i>B. SUBTILIS</i> AP91	71
FIGURA 29 – ANÁLISE DA PRECIPITAÇÃO DE CaCO_3 NO MEIO DE CULTIVO B4: APENAS O MEIO DE CULTIVO (A); INÓCULO DAS BACTÉRIAS <i>E. COLI</i> (B), <i>B. CEREUS</i> (C) E <i>B. SUBTILIS</i> 168 (D) E O DRX DA CALCITA PRECIPITADA PELA BACTÉRIA <i>B. SUBTILIS</i> 168 (E).....	72
FIGURA 30 – MEV E ESTEREOSCÓPIO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE AMOSTRAS SEM BACTÉRIAS (REFERÊNCIA) E COM BACTÉRIA TRATADAS COM CLORETO DE CÁLCIO E ACETATO DE CÁLCIO.....	73
FIGURA 31 – PRECIPITAÇÃO DE CaCO_3 PROMOVIDA POR <i>B. SPHAERICUS</i> (A-D).....	74
FIGURA 32 – PERCENTUAL DE AUMENTO OU DIMINUIÇÃO DA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DAS AMOSTRAS COM RELAÇÃO À REFERÊNCIA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES COM A ADIÇÃO DA BACTÉRIA <i>S. PASTEURII</i> (A), <i>SHEWANELLA</i> (B) E <i>B. SUBILIS</i> (C).....	77
FIGURA 33 – PERCENTUAL DE DIMINUIÇÃO DA ABSORÇÃO DE ÁGUA DAS AMOSTRAS COM RELAÇÃO ÀS SUAS RESPECTIVAS REFERÊNCIAS NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ESTUDADAS	78
FIGURA 34 – CONDIÇÕES DE CURA LEVANTADAS NO ESTUDO DE ZHANG E COLABORADORES	81
FIGURA 35 – SISTEMATIZAÇÃO DO PORTIFÓLIO	82
FIGURA 36 – AUTOCICATRIZAÇÃO OBTIDA POR TZIVILOGLOU E COLABORADORES	86
FIGURA 37 – RESULTADOS DE MUDANÇA DE pH EM DIFERENTES PROFUNDIDADES	87
FIGURA 38 – CORPO DE PROVA UTILIZADO PARA FISSURAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONCRETO. VISÃO LATERAL (A) E CORTE (B).....	88
FIGURA 39 – EVOLUÇÃO DA ESPESSURA DA FISSURA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO: CÂMARA ÚMIDA (A), IMERSA (B) E CICLO INTERMITENTES (C).....	89
FIGURA 40 – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL	91
FIGURA 41 – FLUXOGRAMA DA 1º CAMPANHA EXPERIMENTAL.....	93
FIGURA 42 – SISTEMA DE FILTRAÇÃO COM BOMBA A VÁCUO COM SETA APONTANDO PARA O LOCAL ONDE O FILTRO DE PAPEL É INSERIDO	95
FIGURA 43 – FLUXOGRAMA DA ETAPA 2 – 1º CAMPANHA EXPERIMENTAL	96
FIGURA 44 – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).....	97
FIGURA 45 – FLUXOGRAMA DA 2º CAMPANHA EXPERIMENTAL.....	100
FIGURA 46 – FLUXOGRAMA DA ETAPA 1	101
FIGURA 47 – MEIO TAMPONADO E NÃO TAMPONADO NA INCUBADORA	102
FIGURA 48 – SOLUÇÃO CONCENTRADA DAS BACTÉRIAS SENDO CONGELADA EM ÁLCOOL À -80°C (A) E MATERIAL CONGELADO AO FINAL DO PROCESSO (B).....	103
FIGURA 49 – AMOSTRAS (APONTADAS PELAS SETAS) SENDO LIOFILIZADAS	104

FIGURA 50 – MEIO B4 COM INDICADOR VERMELHO DE FENOL PADRÃO, SEM TAMPONAR (A), PH TAMPONADO EM 7,2 (B) E PH TAMPONADO EM 8,2 (C), SEGUIDOS PELA FITA DE INDICAÇÃO DO PH.....	105
FIGURA 51 – FLUXOGRAMA DA ETAPA 2	106
FIGURA 52 –MOLDES E PRENSA MANUAL UTILIZADA PARA A FISSURAÇÃO NA ETAPA 2	109
FIGURA 53 – POROSÍMETRO MICROMERITICS AUTOPORE IV	110
FIGURA 54 – LUPA LEICA	111
FIGURA 55 – FOTO DA FISSURA ANALISADA EM TODA SUA EXTENSÃO.....	111
FIGURA 56 – FLUXOGRAMA DA 3º CAMPANHA EXPERIMENTAL.....	113
FIGURA 57 - MOLDES DE 50x50 MM (A), 50x100 MM (B) E 40x40x160 MM (C).....	114
FIGURA 58 – ADAPTAÇÃO DE FIXAÇÃO PARA O ADENSAMENTO DOS CORPOS DE PROVA PRISMÁTICOS	115
FIGURA 59 – CORPOS DE PROVA CONFINADOS NOS MOLDES APÓS A MOLDAGEM (A), CORPOS DE PROVA DESMOLDADOS (B) E ENCAMINHADOS PARA A CURA INICIAL (C)	115
FIGURA 60 – ARGAMASSAS SUBMETIDAS ÀS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO	118
FIGURA 61 – CROQUI (A) E FOTO DO SISTEMA INTERMITENTE MECANIZADO (B).....	119
FIGURA 62 – REFORÇO DAS AMOSTRAS COM SILVER TAPE (A); FISSURAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA PRISMÁTICOS EM PRENSA MANUAL (B); FISSURAS FORMADAS PELO ENSAIO AO LADO DE UM FISSURÔMETRO (C).....	120
FIGURA 63 – ESTEREOSCÓPIO LEICA E <i>SOFTWARE</i> UTILIZADO	121
FIGURA 64 – EXEMPLO DOS PONTOS TOMADOS PARA OBTENÇÃO DA ESPESSURA MÉDIA (ED).....	121
FIGURA 65 – CROQUI REPRESENTATIVO DO TESTE DE PERMEABILIDADE (A) E FOTO DO ENSAIO SENDO REALIZADO COM AS MEDIDAS UTILIZADAS EM MM (B)	122
FIGURA 66 – SITUAÇÕES PARA A MEDIÇÃO DO AVANÇO DE CARBONATAÇÃO.....	126
FIGURA 67 – RESULTADOS DA PRECIPITAÇÃO <i>IN VITRO</i> NO MEIO B4	127
FIGURA 68 – MEV E EDS DAS AMOSTRAS DO TESTE BRANCO (A) E DOS INÓCULOS DAS BACTÉRIAS <i>E. COLI</i> (B), <i>B. SUBTILIS</i> 168 (C), <i>B. SUBTILIS</i> AP91 (D) E <i>CV16</i> (E) COM AMPLIAÇÃO DE 15.000 VEZES.	130
FIGURA 69 – MEV DAS AMOSTRAS DO TESTE BRANCO (A), <i>E. COLI</i> (B), <i>B. SUBTILIS</i> 168 (C), <i>B. SUBTILIS</i> AP91 (D) E <i>CV16</i> (E), COM AMPLIAÇÃO DE 6.000 VEZES	131
FIGURA 70 – TESTE DA PRODUÇÃO DA ENZIMA UREASE	132
FIGURA 71 – PLACA DE PETRI COM MEIO MUELLER HINTON	134
FIGURA 72 – MEV E EDS DAS AMOSTRAS: MEIO B4 (A), MEIO B4 COM $Ca(OH)_2$ E SEM BACTÉRIAS (B) E MEIO B4 COM $Ca(OH)_2$ E ADIÇÃO DA BACTÉRIA <i>CV16</i> (C E D) ...	135
FIGURA 73 – MEV COM AMPLIAÇÃO DE 12.000X DO MEIO B4 SEM O INÓCULO DA BACTÉRIA (A E B), DO MEIO B4 ALCALINO (COM $Ca(OH)_2$) E SEM BACTÉRIA (C E D) E DO MEIO B4 ALCALINO COM O INÓCULO DA BACTÉRIA <i>CV16</i> (E-F).....	136
FIGURA 74 - REPRESENTAÇÃO CIRCULAR DO GENOMA <i>CV16</i> USANDO O PROGRAMA BRIG. DE DENTRO PARA FORA, AS LEGENDAS SÃO AS SEGUINTEs: (1) CONTEÚDO GC, (2) INCLINAÇÃO GC, (3-6) RESPECTIVAMENTE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 168, G7, <i>BACILLUS</i>	

COHNII DSM6307 (JONKERS ET AL., 2010) E <i>SPOROSARCINA PASTEURII</i> BNCC (MA ET AL., 2020).	138
FIGURA 75 – MATERIAL LIOFILIZADO DO MEIO NÃO TAMPONADO E TAMPONADO (A) E MATERIAL SENDO MACERADO EM ALMOFARIZ (B) E MATERIAL FINAL, PRONTO PARA APLICAÇÃO (C)	139
FIGURA 76 – MEV DOS ESPOROS LIOFILIZADOS COM AMPLIAÇÃO DE 15.000 VEZES	140
FIGURA 77 – CRESCIMENTO E PRECIPITAÇÃO NO MEIO B4 ANTES (A) E DEPOIS (B) DO INÓCULO COM INDICADOR DE pH DA BACTÉRIA <i>CV16</i> LIOFILIZADA (<i>CV16L</i>) E NÃO LIOFILIZADA (<i>CV16</i>).....	141
FIGURA 78 – CRISTAIS PRECIPITADOS NO MEIO B4 COM DIFERENTES pH'S COM INÓCULO DA BACTÉRIA <i>CV16</i> SEM PASSAR PELO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO COMPARADA A LIOFILIZADA (<i>CV16L</i>). IMAGENS COM AMPLIAÇÃO DE 40X.....	142
FIGURA 79 – FOTOS DO ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA DAS ARGAMASSAS	144
FIGURA 80 – EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DAS ARGAMASSAS AO LONGO DO PERÍODO DE CURA (A) E <i>BOXPLOTS</i> DOS DADOS DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO (B)	145
FIGURA 81 – ABSORÇÃO DE ÁGUA.....	148
FIGURA 82 – ÍNDICE DE VAZIOS AOS 28 E 63 DIAS	149
FIGURA 83 – POROSIDADE ABERTA POR PIM DAS ARGAMASSAS AO LONGO DO PERÍODO DE CURA	150
FIGURA 84 – DIÂMETRO DOS POROS <i>VERSUS</i> LOG DIFERENCIAL DE INTRUSÃO AOS 7 DIAS DE TODAS AS AMOSTRAS (A) E SEPARADAS POR CONCENTRAÇÃO (B-E)	151
FIGURA 85 – DIÂMETRO DOS POROS <i>VERSUS</i> LOG DIFERENCIAL DE INTRUSÃO AOS 168 DIAS DE TODAS AS AMOSTRAS (A) E SEPARADAS POR CONCENTRAÇÃO (B-E)	153
FIGURA 86 – COMPARATIVO DO LOG DA INTRUSÃO ACUMULADA AO LONGO DO TEMPO DE ANÁLISE POR ARGAMASSA: REF (A), A_3 (B), A_5 (C) E A_7 (D)	154
FIGURA 87 – POROS DA ARGAMASSA DE REFERÊNCIA AOS 28 (A-B) E AOS 168 DIAS DE CURA (C-D)	156
FIGURA 88 – POROS DA ARGAMASSA A_3 AOS 28 (A-B) E AOS 168 DIAS DE CURA (C-D)	156
FIGURA 89 – POROS DA ARGAMASSA A_5 AOS 28 (A-B) E AOS 168 DIAS DE CURA (C-D)	156
FIGURA 90 – POROS DA ARGAMASSA A_7 AOS 28 (A-B) E AOS 168 DIAS DE CURA (C-D)	157
FIGURA 91 – FOTOGRAFIAS DAS FISSURAS AO LONGO DO TEMPO ANALISADO DAS AMOSTRAS REF E A_3	158
FIGURA 92 – FOTOGRAFIAS DAS FISSURAS AO LONGO DO TEMPO ANALISADO DAS AMOSTRAS A_5 E A_7.....	159
FIGURA 93 – MEV DO MATERIAL RETIRADO DAS FISSURAS DAS AMOSTRAS REF (A), A_3 (B), A_5 (C) E A_7 (D), COM AMPLIAÇÃO DE 6.000 VEZES	161
FIGURA 94 – CRISTAIS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DE A_3 (A), A_5 (B) E A_7 (C).	162
FIGURA 95 – MEV E EDS DO MATERIAL RETIRADO DA FISSURA DA ARGAMASSA DE REFERÊNCIA (A) E DA ARGAMASSA COM ADIÇÃO DE 10 ³ ESPOROS/M ^L (B E C).....	163
FIGURA 96 – MEV E EDS DO MATERIAL RETIRADO DA FISSURA DA ARGAMASSA COM ADIÇÃO DE 10 ⁵ ESPOROS/M ^L (A, B E C)	164

FIGURA 97 – MEV E EDS DO MATERIAL RETIRADO DA FISSURA DA ARGAMASSA COM ADIÇÃO DE 10^7 ESPOROS/ML (A, B E C)	165
FIGURA 98 – ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA DO GRUPO: DE REFERÊNCIA (A), ESPOROS (B) E TRATAMENTO DE SUPERFÍCIA (C).....	167
FIGURA 99 – IMAGENS DE ESTEREOSCÓPIO DAS AMOSTRAS EXPOSTAS AO AR AO LONGO DO PERÍODO ANALISADO	169
FIGURA 100 – IMAGENS DE ESTEREOSCÓPIO DAS AMOSTRAS IMERSAS EM ÁGUA AO LONGO DO PERÍODO ANALISADO	170
FIGURA 101 – IMAGENS DE ESTEREOSCÓPIO DAS AMOSTRAS IMERSAS EM CAL AO LONGO DO PERÍODO ANALISADO.....	172
FIGURA 102 – IMAGENS DE ESTEREOSCÓPIO DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO REGIME INTERMITENTE AO LONGO DO PERÍODO ANALISADO.....	173
FIGURA 103 – IMAGENS DE ESTEREOSCÓPIO DAS AMOSTRAS TRATADAS SUPERFICIALMENTE COM A SOLUÇÃO BACTERIANA AO LONGO DO PERÍODO ANALISADO.....	175
FIGURA 104 – TAXA DE AUTOCICATRIZAÇÃO CALCULADA COM BASE NO ACOMPANHAMENTO DA ESPESSURA DAS FISSURAS EM ESTEREOSCÓPIO DAS AMOSTRAS COM E SEM ADIÇÃO DE BACTÉRIAS NA ÁGUA DE AMASSAMENTO PARA TODAS AS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO	177
FIGURA 105 – TAXA DE AUTOCICATRIZAÇÃO CALCULADA SEPARADA POR CONDIÇÃO DE EXPOSIÇÃO: AO AR (A), IMERSA EM ÁGUA (B), IMERSA EM CAL (C), EM REGIME INTERMITENTE (D) E DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE (E).....	179
FIGURA 106 – PERMEABILIDADE DOS CORPOS DE PROVA FISSURADOS AO LONGO DO TEMPO PARA AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO (A) E SEPARADO POR CONDIÇÃO DE EXPOSIÇÃO (B-E)	182
FIGURA 107 – TAXA DE AUTOCICATRIZAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA AO LONGO DO TEMPO PARA AS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO (A) E SEPARADO POR CONDIÇÃO DE EXPOSIÇÃO (B-E).....	183
FIGURA 108 – PERMEABILIDADE (A) E TAXA DE AUTOCICATRIZAÇÃO (B) DAS AMOSTRAS QUANTO AO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE AO LONGO DO PERÍODO DE ANÁLISE.....	186
FIGURA 109 – MEV E EDS DAS AMOSTRAS DE REFERÊNCIA (R) AOS 7 DIAS OBTIDAS COM AMPLIAÇÃO DE 6.000X (A) E 12.000X (B) SEGUIDAS PELAS AMOSTRAS COM ADIÇÃO DOS ESPOROS (E) NAS MESMAS AMPLIAÇÕES DE 6.000X (C) E 12.000X (D).....	187
FIGURA 110 – MEV DAS AMOSTRAS DE REFERÊNCIA (A-B) E DAS AMOSTRAS COM ADIÇÃO DOS ESPOROS BACTERIANOS (C-D), COM AMPLIAÇÃO DE 12.000X, AOS 7 DIAS DE IDADE	188
FIGURA 111 – MEV E EDS DAS AMOSTRAS R_AR (A-B) E E_AR (C-D) AOS 28 DIAS COM AMPLIAÇÃO DE 6.000X	189
FIGURA 112 – MEV E EDS DAS AMOSTRAS R_IM_ÁGUA (A-B) E E_IM_ÁGUA (C-D) AOS 28 DIAS COM AMPLIAÇÃO DE 6.000X	190
FIGURA 113 – MEV E EDS DAS AMOSTRAS R_IM_CAL (A-B) E E_IM_CAL (C-D) AOS 28 DIAS.....	191
FIGURA 114 – MEV E EDS DAS AMOSTRAS R_INT (A-B) E E_INT (C-D) AOS 28 DIAS ...	192

FIGURA 115 - MORFOLOGIAS ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS E_AR (A), E_IM_ÁGUA (B), E_IM_CAL (C) E E_INT (D) AOS 28 DIAS COM AMPLIAÇÃO DE 12.000X	194
FIGURA 116 – MEV E EDS DE REGIÕES DA AMOSTRA E_INT NA AMPLIAÇÃO DE 6.000X AOS 28 DIAS	195
FIGURA 117 – MEV E EDS DAS ARGAMASSAS R_AR (A), E_AR (B), R_INT (C) E E_INT (D) AOS 168 DIAS COM AMPLIAÇÃO DE 6.000X	196
FIGURA 118 – IMAGENS DE MEV AOS 168 DIAS COM AMPLIAÇÃO DE 2.000X E 12.000 DA AMOSTRA E_AR (A-B) E DA AMOSTRA E_INT (C-D), RESPECTIVAMENTE	197
FIGURA 119 – MEV E EDS DO MATERIAL COLETADO DA FISSURA DA R_AR (A) E E_AR (B)	198
FIGURA 120 – MEV E EDS DO MATERIAL COLETADO DA FISSURA DA ARGAMASSA R_IM_ÁGUA (A) E E_IM_ÁGUA (B)	199
FIGURA 121 – MEV E EDS DO MATERIAL COLETADO DA FISSURA DA ARGAMASSA R_IM_CAL (A) E E_IM_CAL (B)	199
FIGURA 122 – MEV E EDS DO MATERIAL COLETADO DA FISSURA DA ARGAMASSA R_INT (A) E E_INT (B)	200
FIGURA 123 – MEV E EDS DO MATERIAL COLETADO DA FISSURA DA ARGAMASSA R_TS (A) E E_TS (B)	200
FIGURA 124 – IMAGENS DE MEV NA AMPLIAÇÃO DE 12.000X DAS AMOSTRAS R_AR (A), E_AR (B), R_IM_ÁGUA (C) E E_IM_ÁGUA (D-E)	201
FIGURA 125 – IMAGENS DE MEV NA AMPLIAÇÃO DE 12.000X DAS AMOSTRAS R_IM_CAL (A), E_IM_CAL (B-C), R_INT (D) E E_INT (E-F)	202
FIGURA 126 – IMAGENS DE MEV NA AMPLIAÇÃO DE 12.000X DAS AMOSTRAS R_TS (A) E E_TS	203
FIGURA 127 – PERCENTUAL DE CÁLCIO PRESENTE NAS AMOSTRAS	204
FIGURA 128 – DIFRATOGRAMAS OBTIDOS DAS AMOSTRAS EXPOSTAS AO AR (A), IMERSAS EM ÁGUA (B), IMERSAS EM CAL (C), EXPOSTAS AO REGIME INTERMITENTE (D) E SUBMETIDAS AO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE (E)	206
FIGURA 129 – PERDA DE MASSA OBTIDA PELO ENSAIO DE TERMOGRAVIMETRIA DAS AMOSTRAS EXPOSTAS AO AR (A), IMERSAS EM ÁGUA (B), IMERSAS EM CAL (C), EM REGIME INTERMITENTE (D) E TRATADA SUPERFICIALMENTE (E)	209
FIGURA 130 – DERIVADA DA PERDA DE MASSA OBTIDA PELO ENSAIO DE TERMOGRAVIMETRIA DAS AMOSTRAS EXPOSTAS AO AR (A), IMERSAS EM ÁGUA (B), IMERSAS EM CAL (C), EM REGIME INTERMITENTE (D) E TRATADA SUPERFICIALMENTE (E).....	210
FIGURA 131 – PERCENTUAL DE CaCO ₃ PRESENTE NAS AMOSTRAS ANALISADAS	211
FIGURA 132 – RESULTADOS DA ABSORÇÃO DE ÁGUA PARA TODAS AS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO (A) E SEPARADAMENTE PARA CADA CONDIÇÃO AO LONGO DO TEMPO DE CURA (B, C, D E E)	214
FIGURA 133 – ÍNDICE DE VAZIOS PARA TODAS AS CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO	215
FIGURA 134 - DIÂMETRO DOS POROS <i>VERSUS</i> LOG DIFERENCIAL DE INTRUSÃO DAS ARGAMASSAS AOS 7 DIAS (A) E AOS 168 DIAS SEPARADAS POR CONDIÇÃO DE EXPOSIÇÃO (B-E).....	217

FIGURA 135 – MEV DAS AMOSTRAS E_AR (A) E E_INT (B) AOS 168 DIAS COM AMPLIAÇÃO DE 500X	218
FIGURA 136 – RESULTADOS DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DAS AMOSTRAS EXPOSTAS AO AR (A), IMERSAS EM ÁGUA (B), IMERSAS EM CAL (C) E SUBMETIDAS AO REGIME INTERMITENTE (D)	219
FIGURA 137 – AVANÇO DE CARBONATAÇÃO DAS AMOSTRAS AO LONGO DO TEMPO DE ANÁLISE.....	221
FIGURA 138 – IMAGENS OBTIDAS DO AVANÇO DE CARBONATAÇÃO DAS AMOSTRAS DURANTE O TEMPO DE ANÁLISE	222
FIGURA 139 – ACOMPANHAMENTO DA FISSURA DA ARGAMASSA DE REFERÊNCIA (REF) DURANTE O PERÍODO DE ANÁLISE	245
FIGURA 140 – ACOMPANHAMENTO DA FISSURA DA ARGAMASSA COM ADIÇÃO DE 10^3 ESPOROS/M \bar{L} (A_3) DURANTE O PERÍODO DE ANÁLISE.....	246
FIGURA 141 – ACOMPANHAMENTO DA FISSURA DA ARGAMASSA COM ADIÇÃO DE 10^5 ESPOROS/M \bar{L} (A_5) DURANTE O PERÍODO DE ANÁLISE.....	247
FIGURA 142 – ACOMPANHAMENTO DA FISSURA DA ARGAMASSA COM ADIÇÃO DE 10^7 ESPOROS/M \bar{L} (A_7) DURANTE O PERÍODO DE ANÁLISE.....	248
FIGURA 143 – IMAGENS DAS ARGAMASSAS DE REFERÊNCIA (REF) E COM ADIÇÃO DE 10^3 ESPOROS/M \bar{L} (A_3) EM ESTEREOSCÓPIO	249
FIGURA 144 – IMAGENS DAS ARGAMASSAS COM ADIÇÃO DE 10^5 (A_5) E 10^7 (A_7) ESPOROS/M \bar{L} EM ESTEREOSCÓPIO	250

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CUSTO DAS POSSÍVEIS FONTES DE CÁLCIO COMERCIALIZADAS PELA SYNTH..	60
TABELA 2 – CONSTITUINTES DO MEIO B4	94
TABELA 3 – CONSTITUINTES MEIO ÁGAR UREA DE CHRISTENSEN.....	98
TABELA 4 – CONSTITUINTES DO MEIO B4 UTILIZADO NESTA ETAPA	102
TABELA 5 – TEORES DE CAO, MGO E CAO LIVRE.....	106
TABELA 6 – CARACTERIZAÇÃO DO AGREGADO MIÚDO	107
TABELA 7 – QUANTIDADES DOS MATERIAIS DA ETAPA 2.....	108
TABELA 8 – CRESCIMENTO BACTERIANO E LIOFILIZAÇÃO	140
TABELA 9 – QUANTIDADE DE ESPOROS DO MATERIAL LIOFILIZADO PRESENTE EM 0,003 G	140
TABELA 10 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DAS ARGAMASSAS EM FRESCO	143
TABELA 11 – TESTE TUKEY PARA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	145
TABELA 12 – TESTE TUKEY PARA A ABSORÇÃO DE ÁGUA (N=3)	148
TABELA 13 – TESTE TUKEY PARA O ÍNDICE DE VAZIOS (N=3)	149
TABELA 14 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DAS ARGAMASSAS EM FRESCO	166
TABELA 15 – ESPESSURAS MÉDIAS DAS FISSURAS MEDIDAS EM ESTEREOSCÓPIO AOS 7 DIAS	168
TABELA 16 – ESPESSURAS MÉDIAS DAS FISSURAS MEDIDAS EM ESTEREOSCÓPIO AOS 7 DIAS E UTILIZADAS NO ENSAIO DE PERMEABILIDADE	181
TABELA 17 – ELEMENTOS QUÍMICOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS	204
TABELA 18 – QUANTIDADE DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS.....	205
TABELA 19 – RESULTADOS DE PERDA DE MASSA NOS INTERVALOS DE 425-550°C, 550- 800°C E PERCENTUAL DE CaCO ₃ PRECIPITADO	211
TABELA 20 – TESTE TUKEY PARA A ABSORÇÃO DE ÁGUA AOS 28 DIAS	253
TABELA 21 – TESTE TUKEY PARA A ABSORÇÃO DE ÁGUA AOS 63 DIAS	253
TABELA 22 – TESTE TUKEY PARA A ABSORÇÃO DE ÁGUA AOS 168 DIAS	253
TABELA 23 – TESTE TUKEY PARA O ÍNDICE DE VAZIOS AOS 28 DIAS	254
TABELA 24 – TESTE TUKEY PARA O ÍNDICE DE VAZIOS AOS 63 DIAS	254
TABELA 25 – TESTE TUKEY PARA O ÍNDICE DE VAZIOS AOS 168 DIAS	254
TABELA 26 – TESTE TUKEY PARA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DAS AMOSTRAS AOS 28 DIAS.....	255
TABELA 27 – TESTE TUKEY PARA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DAS AMOSTRAS AOS 63 DIAS.....	255
TABELA 28 – TESTE TUKEY PARA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO DAS AMOSTRAS AOS 168 DIAS.....	255

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESTUDOS REALIZADOS SOBRE A AUTOCICATRIZAÇÃO DE FISSURAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS PELA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS (CONTINUA).....	39
QUADRO 2 – NOMENCLATURA E PROPORÇÕES DE NUTRIENTES E ESPOROS ESTUDADAS POR ALZHARI E COLABORADORES	43
QUADRO 3 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DAS FONTES DE CÁLCIO ADICIONADAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS E SUA INFLUÊNCIA NA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	62
QUADRO 4 – LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO DAS FONTES DE CÁLCIO ADICIONADAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS PARA AUTOCICATRIZAÇÃO POR ADIÇÃO DE BACTÉRIAS	66
QUADRO 5 – ESTUDOS REALIZADOS SOBRE A CONCENTRAÇÃO BACTERIANA ADICIONADA AOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS.....	75
QUADRO 6 - ESTUDOS REALIZADOS SOBRE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CURA E EXPOSIÇÃO QUANDO BACTÉRIAS FORAM ADICIONADAS À MATERIAIS CIMENTÍCIOS	83
QUADRO 7 – NOMENCLATURA DAS ARGAMASSAS	107
QUADRO 8 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA ÉTAPA 2	109
QUADRO 9 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS NO ESTADO ENDURECIDO DA 3ª CAMPANHA EXPERIMENTAL	116
QUADRO 10 – NOMENCLATURA DAS ARGAMASSAS ESTUDADAS	118
QUADRO 11 – CONSUMO DE MATERIAIS	119

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	40
Equação 2.....	41
Equação 3.....	41
Equação 4.....	49
Equação 5.....	57
Equação 6.....	57
Equação 7.....	58
Equação 8.....	58
Equação 9.....	58
Equação 10.....	59
Equação 11.....	59
Equação 12.....	59
Equação 13.....	59
Equação 14.....	60
Equação 15.....	60
Equação 16.....	79
Equação 17.....	103
Equação 18.....	208

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RILEM	<i>Réunion Internationale des Laboratoires et Experts des Matériaux, systèmes de construction et ouvrages</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ca	Cálcio
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
CP	Corpo de prova
C-S-H	Silicato de cálcio hidratado
EDS	<i>Energy Dispersive System</i>
DRX	Difração de Raio X
EPS	<i>Extracellular polymeric substances</i>
Etr	Etringita
HC	Hidróxido de cálcio
LARX	Laboratório de Análises por Técnicas de Raio X
LB	Luria-Bertani
LMEN	Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise
MBI	Mineralização Biologicamente Induzida
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NaCl	Cloreto de sódio
NBR	Norma Brasileira
PIM	Porosimetria por Intrusão de Mercúrio
pH	Potencial hidrogeniônico
MUC	<i>Mixed Ureolytic Culture</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 JUSTIFICATIVA	26
1.2 OBJETIVO GERAL	28
1.2.1 <i>Objetivos Específicos</i>	28
1.3 QUESTÃO DE PESQUISA	29
1.4 HIPÓTESES	29
1.5 TRABALHOS DESENVOLVIDOS PELO GRUPO DE PESQUISA RELACIONADOS AO TEMA	29
1.6 DELIMITAÇÃO DE PESQUISA	31
1.7 CONTRIBUIÇÃO ESPERADA	32
1.8 ESTRUTURA DO TRABALHO	32
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS	33
2.1.1 <i>Histórico</i>	33
2.1.2 <i>Causas da autocicatrização</i>	37
2.1.3 <i>Autocicatrização por adição de bactérias</i>	38
2.1.4 <i>Bactérias utilizadas na bioprecipitação de carbonato de cálcio (CaCO₃)</i> 51	
2.1.5 <i>Bactérias isoladas de caverna</i>	53
2.1.6 <i>Mecanismos de precipitação de CaCO₃</i>	56
2.1.7 <i>Fontes de cálcio adicionadas aos materiais cimentícios para a autocicatrização por adição de bactérias</i>	60
2.1.8 <i>Morfologia do CaCO₃ precipitado por bactérias</i>	67
2.2 A INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS	74
2.2.1 <i>Concentração de bactérias adicionadas aos materiais cimentícios</i>	74
2.3 CONDIÇÕES DE CURA E DE EXPOSIÇÃO.....	80
3 MATERIAIS E MÉTODOS	91
3.1 PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL	92
3.1.1 <i>Etapa 1: Seleção da bactéria</i>	93
3.1.1.1 Preparação do meio B4 e inóculo das bactérias	94
3.1.1.2 Quantificação do material precipitado	94
3.1.2 <i>Etapa 2: Morfologia e entendimento dos mecanismos de precipitação</i>	95
3.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS).....	96
3.1.2.2 Teste de produção da enzima urease	97
3.1.2.3 Crescimento bacteriano e precipitação de CaCO ₃ em ambiente alcalino 98	
3.1.2.4 Sequenciamento do genoma completo	99
3.2 SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL	100
3.2.1 <i>Etapa 1: Preparo da bactéria para aplicação nos materiais cimentícios</i> 101	

3.2.2	<i>Etapa 2: Definição da concentração</i>	105
3.2.2.1	Materiais	106
3.2.2.2	Métodos	107
3.2.2.3	Elaboração das argamassas e ensaios realizados	107
3.3	TERCEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL	112
3.3.1	<i>Elaboração das argamassas e moldagem dos corpos de prova</i>	114
3.3.2	<i>Ensaio no estado fresco e no estado endurecido</i>	116
3.3.2.1	Condições de exposição.....	117
3.3.2.2	Fissuração dos corpos de prova	120
3.3.2.3	Análise do fechamento de fissura em estereoscópio	121
3.3.2.4	Análise do fechamento de fissura a partir do ensaio de permeabilidade 122	
3.3.2.5	MEV e EDS	123
3.3.2.1	Fluorescência de Raio X.....	123
3.3.2.2	Difração de Raio X (DRX).....	124
3.3.2.3	Termogravimetria (TG)	124
3.3.2.4	Absorção de água e índice de vazios	125
3.3.2.5	Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM).....	125
3.3.2.6	Resistência à compressão e avanço da carbonatação	125
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	127
4.1	PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL	127
4.1.1	<i>Etapa 1: Seleção da bactéria com maior capacidade de precipitação de CaCO₃ in vitro</i>	127
4.1.2	<i>Etapa 2: Morfologia dos cristais precipitados e mecanismo de precipitação da bactéria selecionada</i>	128
4.1.2.1	Estudo da morfologia em MEV e EDS	128
4.1.3	<i>Produção da enzima urease</i>	132
4.1.4	<i>Teste de precipitação em meio alcalino</i>	133
4.1.5	<i>Teste complementar: Sequenciamento do genoma completo</i>	137
4.2	SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL	139
4.2.1	<i>Etapa 1: Preparo das bactérias</i>	139
4.2.2	<i>Etapa 2: Definição da concentração</i>	143
4.2.2.1	Ensaio no estado fresco	143
4.2.2.2	Ensaio no estado endurecido	144
4.2.2.2.1	Resistência à compressão	144
4.2.2.2.2	Absorção de água e Índice de vazios.....	147
4.2.2.2.3	Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)	150
4.2.2.2.4	Análise dos poros por estereoscópio	155
4.2.2.2.5	Acompanhamento de fissuras	158
4.2.2.2.6	Análise em MEV do material precipitado	160
4.3	TERCEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL	166
4.3.1	<i>Ensaio no estado fresco</i>	166
4.3.2	<i>Etapa 1</i>	167

4.3.2.1	Acompanhamento das fissuras em estereoscópio.....	167
4.3.2.2	Permeabilidade em corpos de prova fissurados.....	180
4.3.2.3	MEV e EDS	186
4.3.2.4	Fluorescência de Raio X (FRX)	203
4.3.2.5	Difração de Raio X (DRX).....	205
4.3.2.6	Termogravimetria (TG).....	208
4.3.3	<i>Etapa 2</i>	213
4.3.3.1	Absorção de água e Índice de vazios.....	213
4.3.3.2	Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM).....	216
4.3.4	<i>Etapa 3</i>	218
4.3.4.1	Resistência à compressão	218
4.3.4.2	Avanço de carbonatação	221
5	CONCLUSÃO	224
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	226
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	227
	ANEXOS	245

1. INTRODUÇÃO

Após o início da era industrial os materiais cimentícios se tornaram os materiais de construção mais utilizados no mundo, decorrente das suas características de elevada resistência à compressão, durabilidade em contato com ambientes agressivos e adaptabilidade a diferentes formas geométricas (JOSHI, GOYAL e REDDY, 2018). No entanto apesar das características citadas, os materiais cimentícios podem sofrer degradação, o que diminui sua vida útil e durabilidade (TAN *et al.*, 2020).

A porosidade está diretamente ligada à durabilidade, pois a partir de poros e fissuras agentes nocivos adentram nos materiais cimentícios e aceleram sua degradação (NEVILLE, 2001; BASHEER, KROPP e CLELAND, 2001; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). Nesse sentido, vários pesquisadores investigaram o uso de diferentes tratamentos para refinar a estrutura de poros e evitar a deterioração precoce destes materiais. Tratamentos de superfície à base de polímeros e aditivos que colmatam os poros estão disponíveis no mercado. Porém estes são ineficientes a longo prazo, havendo a necessidade de manutenção constante associada muitas vezes a dificuldades de acessibilidade ao local (PAN *et al.*, 2017; VAN MULLEN *et al.*, 2020; SKEVI *et al.*, 2021; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, métodos promissores para restauração ecológica de materiais cimentícios estão sendo investigados e desenvolvidos em vários laboratórios do mundo. Um desses métodos envolve o uso de bactérias precipitadoras de cristais de carbonato de cálcio (CaCO₃) (NGUYEN *et al.*, 2019; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021; RYPAROVÁ *et al.*, 2021).

A bioprecipitação de carbonato de cálcio promovida por bactérias tem se estabelecido como uma área de pesquisa multidisciplinar, visando a otimização da vida útil de materiais cimentícios (ANBU *et al.*, 2016; ALAZHARI *et al.*, 2018). Segundo Jonkers *et al.* (2010), essas bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios a fim de reduzir sua porosidade e fechar fissuras, sendo apresentadas como uma técnica de reparação sustentável.

Várias bactérias que são capazes de precipitar CaCO₃ podem ser utilizadas para autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios, sendo que a maior parte das pesquisas utiliza bactérias do gênero *Bacillus*. Entretanto bactérias isoladas de caverna começaram a ser estudadas para este mesmo fim (ZHU e DITTRICH, 2016; LI *et al.*, 2019), pois estes microrganismos possuem um grande potencial de formação de minerais de CaCO₃ em ambientes naturais (GROTH *et al.*, 2001; CANAVERAS *et al.*, 2001; SANCHEZ-MORAL *et al.*, 2003; CACCHIO *et al.*, 2003; CACCHIO *et al.*, 2004; ENGEL *et al.*, 2004).

Estudos realizados em materiais cimentícios com uma bactéria isolada da caverna cársica Yixing Shanjuan, na China, apontaram que a bioconsolidação promovida pela precipitação de CaCO_3 resultou em um aumento da resistência à compressão e uma diminuição da absorção de água mediante a adição da bactéria isolada (LI *et al.*, 2019). Cavernas cársicas são consideradas ambientes extremos de escassez nutricional, falta de iluminação e privação de oxigênio. Desta forma, microrganismos presentes nestes ambientes conseguem sobreviver em condições adversas ao seu crescimento e geralmente estão envolvidos na formação e manutenção do sistema de cavernas através de várias atividades metabólicas (DONG *et al.*, 2020).

As bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios em concentrações que podem influenciar no desempenho mecânico e na autocicatrização de fissuras. Enquanto alguns pesquisadores indicam a concentração de 10^5 células/mL como a ideal para melhoria do desempenho mecânico (GHOSH *et al.*, 2005; REDDY *et al.*, 2010; CHAHAL *et al.*, 2012; CHAHAL e SIDDIQUE, 2013; MONDAL e GHOSH, 2018), outros afirmam que é necessária uma concentração mínima de 10^7 células/mL para que a precipitação de CaCO_3 seja efetiva e apresente resultados significativos (ZHANG *et al.*, 2016).

Além disso o ambiente de exposição que o material cimentício estiver submetido pode influenciar na precipitação de CaCO_3 e conseqüentemente no fechamento de poros e na autocicatrização de fissuras. Por esse motivo, o ambiente de exposição das amostras deve ser levado em consideração nas pesquisas. Entretanto ainda existem lacunas sobre qual ambiente de exposição pode potencializar o crescimento bacteriano e conseqüentemente aumentar o potencial de autocicatrização de materiais cimentícios a partir da incorporação de bactérias (WANG *et al.*, 2014; LUO, QIAN e LI, 2015; TZIVILOGLOU *et al.*, 2016; ALAZHARI *et al.*, 2018).

Diante do exposto, observa-se a importância de desenvolver pesquisas que selecionem uma bactéria com maior potencial de fechamento de poros e autocicatrização de fissuras, além de se verificar qual concentração é ideal para que esta seja adicionada a um material cimentício e que condição de exposição pode potencializar a atuação bacteriana na autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios.

1.1 JUSTIFICATIVA

A fissuração é um problema inerente à maioria dos materiais de construção à base de cimento (KALHORI e BAGHERPOUR, 2017; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Mesmo que o dimensionamento de estruturas de concreto permita fissuras de pequenas aberturas, entre 0,2 e 0,4 mm, (NBR 6118/2014) e as microfissuras não afetem significativamente a resistência do concreto (MORS e JONKERS, 2019), estas permitem a penetração de água, cloretos, sulfatos e ácidos que podem resultar na degradação do material (NGUYEN *et al.*, 2019; DE BELIE *et al.*, 2019; RYPAROVÁ *et al.*, 2021).

Por esse motivo há a necessidade de estudos de materiais que possam diminuir a incidência de fissuras em materiais cimentícios e também diminuir sua espessura, contribuindo para o aumento da vida útil das edificações (KALHORI e BAGHERPOUR, 2017; SKEVI *et al.*, 2021). Durante as últimas décadas, estudos sobre bactérias precipitadoras de CaCO₃ que proporcionam o fechamento de poros e a autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios se intensificaram em todo o mundo (MUKERJEE e REDDY, 2013; DHAMI, REDDY e MUKJERJEE, 2013; ALAZHARI *et al.*, 2018; RONG *et al.*, 2020).

A partir da autocicatrização de fissuras promovida por bactérias, a vida útil de materiais cimentícios pode ser estendida sem a necessidade de intervenção (GRANGER *et al.*, 2007; HILLOULIN *et al.*, 2014; ALAZHARI *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2020; MOHAMMED *et al.*, 2020; RYPAROVÁ *et al.*, 2021; SKEVI *et al.*, 2021).

Em contrapartida, ainda existem lacunas do conhecimento quanto às condições ótimas para o fechamento de poros e autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios, pois existem muitas bactérias que podem ser aplicadas para este fim e cada uma pode se comportar de forma diferente frente às condições de aplicação e as suas próprias características (VAN TITTELBOOM *et al.*, 2012; ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013).

Bactérias isoladas de ambientes naturais, tais como solos, cavernas e ambientes marítimos, demonstram um grande potencial de aplicação em materiais cimentícios pelo seu potencial de precipitação de CaCO₃ (CANAVERAS *et al.*, 2001; GROTH *et al.*, 2001; CACCHIO *et al.*, 2003; SANCHEZ-MORAL *et al.*, 2003; CACCHIO *et al.*, 2004; ENGEL *et al.*, 2004; ZHU e DITTRICH, 2016).

Entretanto poucos estudos são apresentados nas pesquisas utilizando este tipo de bactéria para autocicatrização de materiais cimentícios (LI *et al.*, 2019). Além disso ainda existem divergências na literatura, principalmente em relação à concentração de bactérias que deve ser adicionada aos materiais cimentícios (ALGAIFI *et al.*, 2020) e aos ambientes de exposição que podem potencializar ou prejudicar a atuação bacteriana nestes materiais.

Com relação às condições de exposição alguns pesquisadores afirmam que para a precipitação de CaCO₃ acontecer as bactérias precisam estar em contato com uma fonte

de cálcio (que pode ser o hidróxido de cálcio), com o CO₂ atmosférico e em contato com água. Sendo assim, condições intermitentes (*dry-wet*) podem potencializar a precipitação de CaCO₃ e conseqüentemente a autocicatrização (TAN *et al.*, 2020). Tal fato foi corroborado por Tziviloglou *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2014) que observaram um aumento no crescimento bacteriano e da precipitação de CaCO₃ quando as amostras foram submetidas a regimes intermitentes.

De acordo com Tziviloglou *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2014) o método de respiração aeróbica para conversão de uma fonte de cálcio em carbonato de cálcio requer a presença de oxigênio e por esse motivo a autocicatrização tende a ser mais lenta quando as amostras estiverem imersas em água. Porém Luo, Qian e Li (2015) verificaram que a cura imersa em água apresentou melhores resultados de autocicatrização.

Desta forma, a pesquisa em questão contribuirá para o estudo de adições de bactérias isoladas de caverna em materiais cimentícios, e também sobre a influência da condição de exposição na autocicatrização. A literatura aponta que esse tipo de adição, além da autocicatrização de fissuras, é uma alternativa para melhoria da resistência à compressão e redução da porosidade, além de resultar no aumento da vida útil dos elementos a base de cimento (LI *et al.*, 2019; SKEVI *et al.*, 2021).

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o fechamento de poros e fissuras em materiais cimentícios mediante a precipitação de CaCO₃ promovida pela adição de bactérias isoladas de caverna, assim como a influência da condição de exposição no potencial de atuação destes microrganismos.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Selecionar uma bactéria isolada da caverna Pedra da Cachoeira com maior capacidade de precipitação de CaCO₃;
- Determinar a concentração de bactéria que proporcione o maior fechamento de poros e fissuras, sem prejudicar o desempenho mecânico;
- Acompanhar e quantificar o fechamento de fissuras em argamassas pela autocicatrização, frente a diferentes condições de exposição;
- Determinar o fechamento de fissuras, em argamassas, frente ao tratamento de superfície com solução bacteriana.

1.3 QUESTÃO DE PESQUISA

O ambiente de exposição é capaz de potencializar a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) e conseqüentemente o fechamento de poros e a autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios mediante a adição de bactérias isoladas de caverna?

1.4 HIPÓTESES

Hipótese 1: A adição de bactérias isoladas de caverna em materiais cimentícios promove o fechamento de poros e a autocicatrização de fissuras independentemente da condição de exposição em que os materiais estiverem submetidos.

Hipótese 2: A adição de bactérias isoladas de caverna em materiais cimentícios prova-se superior no fechamento de poros e na autocicatrização de fissuras quando comparada a referência, sem adição de bactérias.

1.5 TRABALHOS DESENVOLVIDOS PELO GRUPO DE PESQUISA RELACIONADOS AO TEMA

O grupo de pesquisa da UEL começou a trabalhar sobre o tema de autocicatrização em materiais cimentícios por meio da adição de bactérias no ano de 2015, tendo produzido os seguintes trabalhos:

- Acadêmicos:
 - SCHWANTES, N. **DESEMPENHO DE *Bacillus sp.* NA BIOCIMENTAÇÃO DE MATERIAIS CIMENTÍCIOS**. 2017. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.
 - SIRILO, M. O. **VERIFICAÇÃO DA AUTOCICATRIZAÇÃO POR ADIÇÃO DE BACTÉRIAS EM COMPOSTOS CIMENTÍCIOS POR MEIO DO ULTRASSOM**. 2018. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.
 - DUARTE, C. N. **INFLUÊNCIA DO AMBIENTE DE EXPOSIÇÃO NA AUTOCICATRIZAÇÃO DE MATERIAIS CIMENTÍCIOS COM ADIÇÃO DE BACTÉRIAS**. 80 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Londrina, 2021.
- Artigos completos publicados em periódicos:

- SCHWANTES-CEZARIO, N.; PERES, M. V. N. N.; FRUET, T. K.; NOGUEIRA, G. S. F.; TORALLES, B. M.; CEZARIO, D. S. **Crack filling in concrete by addition of *Bacillus subtilis* spores - Preliminary study.** DYNA (MEDELLÍN). Fator de Impacto (2013 JCR): 0,2170, v.85, p.132 - 139, 2018.
- SCHWANTES-CEZARIO, N.; PORTO, M. F.; SANDOVAL, G. F. B.; NOGUEIRA, G. S. F.; COUTO, A. F.; TORALLES, B. M. **Effects of *Bacillus subtilis* biocementation on the mechanical properties of mortars.** Revista IBRACON de estruturas e materiais. v.12, p.31 - 38, 2018.
- SCHWANTES-CEZARIO, NICOLE; NOGUEIRA, G. S. F.; TORALLES, B. M. **Biocimentação de compósitos cimentícios mediante adição de esporos de *B. subtilis* AP91.** Revista de Engenharia Civil IMED, v.4, p.142 - 158, 2017.
- SCHWANTES-CEZARIO, N.; MEDEIROS, L.; OLIVEIRA JUNIOR, A. G.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R.; TORALLES, B. M. **Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil.** International Biodeterioration e Biodegradation. Fator de Impacto (2016 JCR): 2,9620, v.123, p.200 - 205, 2017.
- SCHWANTES-CEZARIO, N.; NOGUEIRA, G. S. F.; COUTO, A. F.; PORTO, M. F.; ANDRELLO, A. C.; TORALLES, B. M. **Mortars with the addition of bacterial spores evaluation of porosity by different test methods.** Journal of Building Engineering, v. 30, p.1-10, 2020.
- SCHWANTES-CEZARIO, N.; CREMASCO, L. V.; MEDEIROS, L. P.; TEIXEIRA, G.; ALBINO, U. B.; LESCANO, L. E.; MATSUMOTO, L. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, A. G.; DA SILVA, P. R. C.; TORALLES, B. M. **Potential of cave isolated bacteria in self-healing of cement-based materials.** Journal of Building Engineering, v. 45, n. 103551, 2022.
- Artigos completos publicados em anais de congressos:
 - SCHWANTES-CEZARIO, N.; PORTO, M. F.; NOGUEIRA, G. S. F.; MEDEIROS, L. P.; ANDRELLO, A. C.; TORALLES, B. M. **Adição de bactérias em materiais cimentícios: efeito sobre a porosidade e resistência à compressão.** 61º Congresso Brasileiro do concreto IBRACON 2019.

Vale destacar, que além dos trabalhos desenvolvidos citados o grupo de pesquisa foi contemplado com o Edital Sinapse da Inovação Paraná (2019-2021) para incubação de *Startup*, a partir do qual a *startup CimeBio* foi criada. A equipe da *CimeBio* também foi

contemplada com o Edital *Startup Match*, possibilitando a contratação de dois pesquisadores durante um período de 6 meses para auxiliar no desenvolvimento de pesquisas na área de autocicatrização por adição de bactérias e recebeu o prêmio de *Startup* destaque no *Construtech Week* promovido pela Governança de Inovação na Construção Civil do Norte do Paraná (ICON) em 2021.

1.6 DELIMITAÇÃO DE PESQUISA

Para a elaboração deste trabalho cada campanha experimental teve delimitações específicas. Na primeira delimitou-se a estudar a precipitação *in vitro* de CaCO_3 de 10 bactérias isoladas de caverna, comparando-as com bactérias já estudadas na precipitação de CaCO_3 (*B. subtilis* 168 e *B. subtilis* AP91), com o intuito de selecionar a cepa que tivesse maior potencial de precipitação de CaCO_3 para a continuidade da pesquisa.

A segunda campanha experimental delimitou-se em estudar a concentração de esporos da bactéria selecionada na primeira campanha, adicionados a uma argamassa básica de traço 1:3 (em massa), com relação água-cimento (a/c) de 0,54 e submetida à cura submersa em tanque de água saturada com cal. O cimento utilizado foi o CP V – ARI e a areia foi a quartzosa natural, proveniente do Rio Paraná. As concentrações estudadas foram de 0, 10^3 , 10^5 e 10^7 esporos/mL. Vale destacar que as concentrações foram adicionadas na água de amassamento.

Por fim, a última campanha experimental se delimitou a avaliar a influência da condição de exposição no fechamento de poros e autocicatrização de fissuras. As argamassas tiveram a adição da mesma bactéria no mesmo traço, relação a/c e materiais utilizados da 2ª Campanha Experimental, com a incorporação de lactato de cálcio pentahidratado em 3% com relação à massa de cimento. A concentração bacteriana utilizada foi apenas a que apresentou os melhores resultados na campanha experimental anterior e as condições de exposição analisadas foram: ao ar, submersa em água potável, submersa em água saturada com cal e em regime intermitente.

Além disso na última campanha experimental o tratamento de superfície foi avaliado no fechamento de fissuras. Para tal análise, o experimento delimitou-se à análise do fechamento de fissuras em argamassa de traço 1:3 e relação a/c de 0,54, elaboradas sem a adição de bactérias e de lactato de cálcio na água de amassamento. As fissuras foram tratadas superficialmente a partir da aspersão das bactérias e da solução de lactato de cálcio, as quais foram aplicadas duas vezes ao dia durante o tempo de análise.

1.7 CONTRIBUIÇÃO ESPERADA

Espera-se que com o desenvolvimento desta pesquisa seja possível apresentar dados que demonstrem:

- o potencial da aplicação de bactérias isoladas de caverna para o fechamento de poros e autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios;
- a influência da concentração bacteriana na autocicatrização de materiais cimentícios;
- a influência do ambiente de exposição na autocicatrização promovida pela adição de bactérias;
- o potencial da aplicação do tratamento de superfície com solução bacteriana no fechamento de fissuras em materiais cimentícios.

1.8 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está estruturado em cinco capítulos, sendo o primeiro dedicado a introdução, justificativa, objetivo, questão de pesquisa, hipóteses, trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa relacionados ao tema, delimitação da pesquisa e a contribuição esperada.

No segundo capítulo apresenta-se a revisão bibliográfica, discorrendo primeiramente sobre o histórico da autocicatrização em materiais cimentícios, dando maior foco à autocicatrização por adição de bactérias, nas propriedades dos materiais cimentícios afetadas por este tratamento e na influência das condições de exposição na atuação bacteriana.

Os materiais empregados e os métodos utilizados no desenvolvimento das campanhas experimentais se encontram no terceiro capítulo. Dando sequência, os resultados e suas discussões, de todas as campanhas experimentais efetuadas, estão descritos no quarto capítulo. Por fim, o quinto e último capítulo traz as principais conclusões do trabalho, relacionadas com o objetivo proposto e as sugestões para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No presente capítulo está apresentada a compilação do estudo da autocicatrização em materiais cimentícios, dando ênfase na autocicatrização por adição de bactérias e abordando sobre os mecanismos e formas de precipitação de (CaCO_3) , além da influência da adição de bactérias nas propriedades dos materiais cimentícios e as condições de cura e exposição.

2.1 AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS

2.1.1 Histórico

Materiais cimentícios autocicatrizantes são aqueles capazes de reparar suas próprias fissuras, sem nenhuma adição posterior a elaboração do mesmo. De acordo com Van Tittelboom e De Belie (2013), no ano de 1969 as propriedades autocicatrizantes foram estudadas pela primeira vez em materiais poliméricos. Na sequência, entre os anos de 1979 e 1981 foram publicados artigos sobre a autocicatrização em sistemas termoplásticos e reticulados e somente após 1990 foram iniciadas pesquisas sobre a autocicatrização envolvendo materiais cimentícios.

A primeira pesquisadora a estudar sobre a autocicatrização de materiais cimentícios foi a Dra. Carolyn M. Dry, da Universidade de Illinois, no ano de 1994. Esta pesquisadora analisou a incorporação de fibras ocas de polipropileno preenchidas com um adesivo de metil metacrilato que atuam como agente autocicatrizante. Quando uma fissura se propagava, a fibra se rompia e liberava o metil metacrilato, que por sua vez preenchia as fissuras (VAN TITTELBOOM e DE BELIE, 2013).

Após a Dra. Dry, vários pesquisadores de todo o mundo começaram a estudar o fenômeno da autocicatrização e propor diferentes métodos para o fechamento de fissuras em materiais cimentícios (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; MONDAL e GHOSH, 2019). Porém a consolidação das pesquisas neste tema se deu a partir da publicação do volume do RILEM (*Réunion Internationale des Laboratoires et Experts des Matériaux, systèmes de construction et ouvrages*), que foi iniciado no ano de 2005 e finalizado em 2013, com o título “Fenômenos de autocicatrização em materiais de base cimentícia”.

A autocicatrização é um fenômeno antigo e bem conhecido em materiais cimentícios, pois decorre da hidratação contínua dos minerais presentes na mistura ou da carbonatação do hidróxido de cálcio $(\text{Ca}(\text{OH})_2)$. No entanto esta autocicatrização é de difícil

controle, sendo limitada a pequenas fissuras e apenas efetiva mediante contato com umidade (EDVARSEN, 1999; VAN TITTELBOOM e DE BELIE, 2013, DE BELIE *et al.*, 2019; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Estudos recentes buscam potencializar essa autocicatrização a partir de diferentes métodos, entre eles pode-se citar a hidratação de partículas ainda não hidratadas, adição de polímeros encapsulados e utilização de bactérias (WANG *et al.*, 2012; TAKAGI, 2013; ALAZHARI *et al.*, 2018).

Os materiais cimentícios autocicatrizantes podem ser divididos em dois grupos de acordo com o mecanismo de cicatrização: autógena ou exógena (TANG, KARDANI e CUI, 2015). A autocicatrização autógena é resultado das reações químicas internas da própria matriz cimentícia, enquanto a autocicatrização exógena acontece pela incorporação de agentes químicos ou biológicos na matriz cimentícia (SCHLANGEN e WANG, 2015; TANG, KARDANI e CUI, 2015).

De acordo com De Brito e Kurda (2020) e Ryparová *et al.* (2021) a autocicatrização autógena pode acontecer em decorrência da expansão da matriz cimentícia hidratada, carbonatação de hidróxido de cálcio, hidratação contínua de cimento não hidratado ou ainda pela presença de impurezas na água da mistura. Vale destacar que esse mecanismo acontece na presença de materiais que não são especificamente projetados para a autocicatrização.

Ao contrário da autocicatrização autógena, a autocicatrização autônoma, também chamada de exógena, pode incluir qualquer técnica que tenha como objetivo a autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios (DE BRITO e KURDA, 2020).

No Brasil, por exemplo, concretos autocicatrizantes já foram aplicados em algumas construções, como a laje de cobertura do Museu de Arte do Rio de Janeiro representada na Figura 1, no qual foram aplicadas fibras ocas com metil metacrilato (ITAMBÉ, 2016).

Figura 1 – Museu de Arte do Rio de Janeiro



Fonte: BERGAMO (2015).

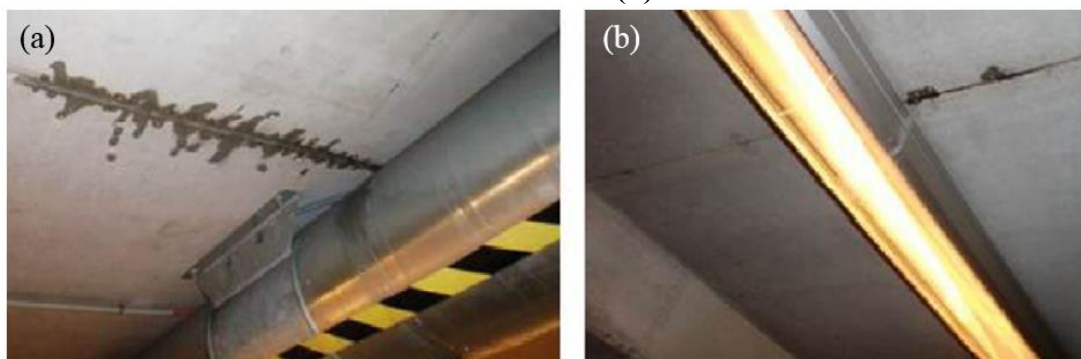
A autocicatrização promovida por bactérias, por sua vez, recebeu bastante atenção nos últimos anos (GAO *et al.*, 2020; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). Mas antes de se estudar a autocicatrização promovida pela adição de bactérias, estudos sobre o tratamento de fissuras com microrganismos para a reparação de monumentos antigos e pedras calcáreas foram desenvolvidos (TIANO *et al.*, 1999; CASTANIER *et al.*, 2000).

Em 2001 o primeiro estudo que incorporou microrganismos no momento da mistura de matrizes cimentícias foi publicado (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001), sendo que este tipo de adição ganhou maior foco nos últimos 10 anos (ALAZHARI *et al.*, 2018; RONG *et al.*, 2020; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Com o passar dos anos, as pesquisas foram avançando nesta área (JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). Entretanto de acordo com Qian *et al.* (2021) a maioria dos estudos de autocicatrização por adição de bactérias realizam análises laboratoriais e estudos práticos e em escala real raramente são realizados.

Comercialmente a autocicatrização por adição de bactérias começou ser desenvolvida na Holanda. Em 2015 os pesquisadores Wiktor e Jonkers publicaram o primeiro estudo de caso da aplicação de bactérias ureolíticas em fissuras de uma laje de garagem, na qual houve uma diminuição da permeabilidade com o tempo de análise, mas não o fechamento total da fissura, como pode-se visualizar na Figura 2. Para a análise foi delimitada uma área de 1 m² da laje, a qual foi saturada com uma solução com bactérias do gênero *Bacillus* e nutrientes e após dois meses o ensaio de permeabilidade foi conduzido. Vale ressaltar que esta aplicação foi utilizada como um tratamento de superfície e não como autocicatrização (WIKTOR e JONKERS, 2015).

Figura 2 – Fissura em uma laje de garagem sem a adição de bactérias (a) e com a adição de bactérias (b)



Fonte: Adaptado de Wiktor e Jonkers (2015).

No ano de 2017, aditivos à base de bactérias foram aplicados em um tanque de água no porto da cidade de Roterdã, conforme ilustra a Figura 3. A tecnologia do aditivo foi desenvolvida em parceria da Universidade de Delft e da empresa Basilisk.

Figura 3 – Tanque de água em Roterdã

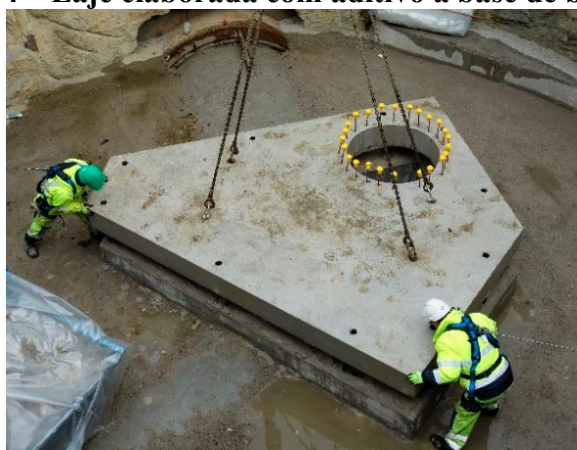


Fonte: Basilisk – Self-healing concrete ®. Disponível em: < <https://www.basiliskconcrete.com/portfolio-items/bluswaterbassin-havenbedrijf-rotterdam-2/?lang=en>>.

A estrutura possui quatro paredes de concreto, sendo que em duas delas foi utilizado o agente de autocicatrização patenteado pela empresa. Após a construção das paredes, foi notável o melhor desempenho nas paredes com o agente de autocicatrização em relação ao aparecimento e fechamento de fissuras (MORS e JONKERS, 2019).

Na Bélgica a primeira aplicação de concreto autocicatrizante à base de bactéria foi publicada por Van Mullem e colaboradores (2020). Estes pesquisadores executaram uma laje de cobertura de uma câmara de inspeção de um dos tubos de drenagem na cidade de Antuérpia, que é a maior cidade da Bélgica. A laje pode ser visualizada na Figura 4, nela foi aplicado um aditivo chamado de MUC (*Mixed Ureolytic Culture*), que nada mais é do que um material granular contendo bactérias anaeróbicas com capacidade de esporulação, solução ureolíticas e nitrato de cálcio.

Figura 4 – Laje elaborada com aditivo à base de bactérias



Fonte: Van Mullem *et al.*, (2020).

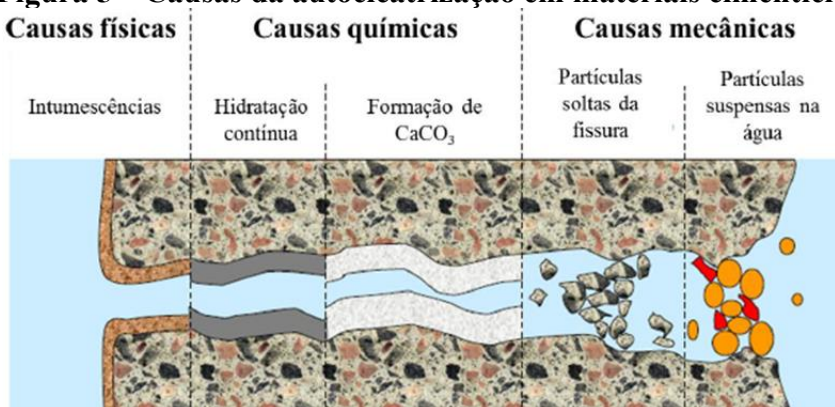
Nas inspeções realizadas na laje, durante o tempo de análise, não foram observadas fissuras. Entretanto corpos de prova foram moldados com o mesmo traço e fissurados para análise. Desta forma os pesquisadores observaram a autocicatrização das fissuras a partir da atuação bacteriana (VAN MULLEM *et al.*, 2020).

Como pode-se observar, o estudo da autocicatrização por adição de bactérias vem sendo um tema abordado na literatura com frequência, todavia apenas nos últimos anos produtos comerciais começaram a ser aplicados em obras e ainda existem várias lacunas do conhecimento sobre este tema (MORS e JONKERS, 2019). Para que se tenha um aprofundamento sobre o assunto, deve-se conhecer as causas da autocicatrização e as particularidades da adição de bactérias para esse fim.

2.1.2 Causas da autocicatrização

De acordo com boletim técnico do RILEM (2013), a autocicatrização de materiais cimentícios pode ter diversas causas, entre elas, pode-se citar as físicas, químicas e mecânicas, conforme ilustra a Figura 5.

Figura 5 – Causas da autocicatrização em materiais cimentícios



Fonte: Adaptado da RILEM (2013).

Normalmente a causa física está relacionada ao aumento de volume da pasta de cimento hidratada perto das faces da fissura, pela absorção de água. Quanto às causas químicas, existem duas possibilidades: a hidratação continuada e a formação de CaCO₃. A hidratação continuada está relacionada a hidratação do cimento ou outros materiais pozolânicos suplementares que não reagiram anteriormente. Quando estes materiais se hidratam, reagem e têm a capacidade de autocicatrização de pequenas fissuras (RILEM, 2013).

A precipitação de carbonato de cálcio, por sua vez, vem sendo abordada como o mecanismo de autocicatrização mais eficaz. No processo de precipitação os íons cálcio (Ca⁺²) e carbonato (CO₃⁻²) se ligam, na presença de água e em condições que dependem do pH,

temperatura e concentração dos reagentes. Cabe destacar que essa precipitação pode ocorrer a partir do processo natural de carbonatação como também pela ação de microrganismos, sendo a autocicatrização pela precipitação de CaCO_3 a partir da adição de bactérias a mais estudada atualmente (RILEM, 2013).

Por fim, tem-se as causas mecânicas relacionadas ao preenchimento de partes da fissura por partículas soltas e por partículas suspensas em água, mas este efeito é de pequena importância no estudo da autocicatrização (RILEM, 2013).

2.1.3 Autocicatrização por adição de bactérias

Normalmente, quando se pensa em microrganismos aplicados aos materiais cimentícios surge a preocupação dos danos que estes podem causar aos materiais, pois no passado pesquisas focavam no entendimento de efeitos negativos da proliferação bacteriana sobre diferentes substratos (BOQUET *et al.*, 1973). Entretanto na atualidade características benéficas de metabolismos bacterianos estão sendo investigadas para a autocicatrização dos materiais cimentícios a partir da bioprecipitação de CaCO_3 (DE MUYNCK *et al.*, 2008⁽²⁾; JONKERS *et al.*, 2010; VAN TITTELBOOM *et al.*, 2010; WIKTOR e JONKERS, 2011; SCHREIBEROVÁ *et al.*, 2019).

De acordo com Castanier *et al.* (1999), existem indícios de que a formação de calcita na crosta terrestre pode ser atribuída em grande parte às atividades de precipitação microbiana. Sendo que as bactérias ao longo dos anos têm se apresentado com um potencial de crescimento e aplicação nas condições mais adversas (SECKBACH e CHELA-FLORES, 2012).

Nos últimos anos, a bioprecipitação de carbonato de cálcio promovida por bactérias tem se estabelecido como uma área de pesquisa multidisciplinar, visando o aumento da vida útil de materiais cimentícios (ANBU *et al.*, 2016; ALAZHARI *et al.*, 2018; SKEVI *et al.* 2021; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). Segundo Jonkers *et al.* (2010) essas bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios a fim de reduzir a porosidade e fechar fissuras, sendo apresentadas como uma técnica de reparação sustentável, a qual está sendo investigada e desenvolvida em vários centros de pesquisa do mundo, como por exemplo: Universidade de Delft na Holanda, Universidade de Ghent na Bélgica, Universidade de Bath no Reino Unido, Universidade de Thapar na Índia, entre outros.

O Quadro 1 apresenta um resumo dos estudos que serão abordados na sequência em relação à autocicatrização de materiais cimentícios com adição de bactérias.

Quadro 1 – Estudos realizados sobre a autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios pela adição de bactérias (continua)

Autor e ano	Bactéria estudada	Forma de adição	Concentração adicionada	Variável estudada	Condição de cura	Ensaio realizados
Wiktor e Jonkers (2011)	<i>B. alkalinitrilicus</i>	Impregnada com meio de cultivo em argila expandida	$1,7 \times 10^5$ esporos/grama de argila expandida	Adição de esporos bacterianos	Selado com plástico filme e mantido a temperatura ambiente	MEV, acompanhamento de fissuras por imagem e cálculo do percentual de autocicatrização
Luo, Quian e Li (2015)	Bactéria alcali-resistente e formadora de esporos (não mencionada qual)	Na água de amassamento	30 mL na concentração de 10^9 adicionados à água de amassamento	Espessura de fissura	25°C; imerso em água; 25°C a 90% de umidade relativa; 25°C em ciclos úmido-seco.	Permeabilidade, acompanhamento de fissuras por imagem, MEV e DRX
Mondal e Ghosh (2018)	<i>B. subtilis</i>	Na água de amassamento	10^3 , 10^5 e 10^7 células/mL	Concentração bacteriana	27°C imerso em água	Resistência à compressão, absorção de água, autocicatrização de fissuras, MEV e DRX
Alazhari <i>et al.</i> , (2018)	<i>B. pseudofirmus</i>	Impregnada com meio de cultivo em perlita expandida	$4,1 \times 10^9$ esporos/g de perlita expandida	Quantidade de perlita expandida com nutrientes e com esporos	Primeiros 28 dias imerso em água. Depois 165 dias em câmara úmida com umidade de aproximadamente 100%.	Autocicatrização de fissuras e absorção superficial
Wang <i>et al.</i> , (2014)	<i>B. sphaericus</i>	Microencapsulada	10^9 células/g das microcápsulas	Presença de nutrientes, esporos e condição de cura	20°C a 95% de umidade relativa; imerso em água; imerso em meio de cultivo; ciclos intermitentes em água; ciclos intermitentes no meio de cultivo	Absorção de água, autocicatrização de fissuras, PIM e permeabilidade
Kalhari e Bagherpour (2017)	<i>B. subtilis</i>	Imersão e água de amassamento com nutrientes	$2,2 \times 10^6$ esporos/mL	Condição de cura e forma de adição dos esporos	Imerso em água; imerso em solução de ureia e cloreto de cálcio; imerso em solução de ureia e cloreto de cálcio com bactérias	Resistência à compressão e à tração, permeabilidade, absorção de água, DRX e autocicatrização de fissuras
Tan <i>et al.</i> , (2020)	<i>Bacillus cohnii</i>	Encapsulados em grânulos de concreto aerado leve	5,25 gramas dos grânulos de concreto aerado leve (aproximadamente $3,64 \times 10^{10}$ esporos)	Autocicatrização em amostras carbonatadas e não carbonatadas com adição dos esporos bacterianos	Imerso em água durante 28 dias e em regime intermitente (16h úmido e 8 horas seco) após esse período	Calorimetria de condução isotérmica, carbonatação, autocicatrização

Autor e ano	Bactéria estudada	Forma de adição	Concentração adicionada	Variável estudada	Condição de cura	Ensaio realizado
Rong <i>et al.</i> , (2020)	<i>S. pasteurii</i>	Na água de amassamento com nutrientes	10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹ células/mL (essas concentrações não foram em todo o volume de água)	Concentração e espessura de abertura	Imerso em água	Quantificação do CaCO ₃ precipitado, taxa de autocicatrização por permeabilidade a carga constante e por análise de imagem, DRX e MEV

Fonte: Autora.

Vale destacar que as análises de autocicatrização foram realizadas por imagem e/ou pelo ensaio de permeabilidade. O cálculo da autocicatrização por imagem é realizado a partir da quantificação da espessura da fissura ou de sua área imediatamente após a fissuração e essa medição é repetida ao longo do tempo, para análise da evolução da taxa de autocicatrização, de acordo com a Equação 1.

$$R_w = \frac{E_0 - E_d}{E_0} \times 100\% \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

- R_w é a taxa de autocicatrização, no dia d (%);
- E_0 é a espessura ou área da fissura medida imediatamente após a fissuração;
- E_d é a espessura ou área medida no dia d , ao longo do período de análise.

A determinação da autocicatrização a partir da medição da espessura ou da área utilizando imagens foi realizada por Wiktor e Jonkers (2011), Luo, Qian e Li (2015), Mondal e Ghosh (2018), Alazhari *et al.* (2018) e Tan *et al.* (2020).

Entretanto nos últimos anos, com o objetivo de avaliar a fissura em toda a sua profundidade, ensaios de permeabilidade começaram a ser utilizados para quantificar a autocicatrização. De acordo com Rong *et al.* (2020) permeabilidade de água em materiais cimentícios está diretamente ligada a porcentagem de autocicatrização das fissuras formadas nesses elementos. De Muynck e colaboradores (2008) ainda acrescentam que concretos e argamassas com uma baixa permeabilidade apresentam uma maior durabilidade.

O ensaio de permeabilidade é realizado imediatamente após a fissuração e repetido ao longo do tempo para análise da evolução da autocicatrização. Este ensaio pode ser a carga constante ou a carga variável. O ensaio de carga variável é recomendado pelo Método de Teste da Rilem 11.4 (TAN *et al.*, 2020), o qual mede a permeabilidade a carga variável sob baixa pressão e calcula o coeficiente de permeabilidade K de acordo com a Equação 2:

$$K = \frac{aL}{At} \ln \left[\frac{h_1}{h_2} \right], \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

- a corresponde à área da pipeta (mm²);
- L a profundidade da amostra (mm);
- A a área da seção do tubo de PVC utilizado (mm²);
- t o tempo em segundos;
- h₁ a leitura inicial da água na pipeta e;
- h₂ a leitura final (mm).

O coeficiente de permeabilidade inicial (K_0) é calculado após a fissuração e o coeficiente K_d após a autocicatrização, de acordo com as idades de ensaio (TAN *et al.*, 2020). Desta forma a taxa de autocicatrização (R_K) ao longo do tempo é obtida a partir da Equação 3:

$$R_K = \frac{K_0 - K_d}{K_0} \times 100\% \quad \text{Eq. 3}$$

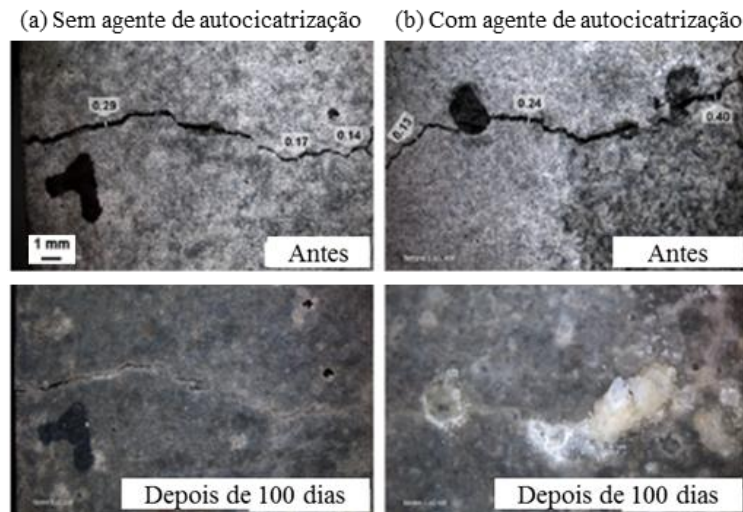
Onde:

- R_K é a taxa de autocicatrização, em porcentagem;
- K_0 é a permeabilidade inicial, medida imediatamente após a fissuração (mm/s);
- K_d é a permeabilidade medida no dia d, ao longo do período de análise (mm/s);

A análise de autocicatrização pela permeabilidade a carga variável foi realizada por Luo, Qian e Li (2015), Wang *et al.* (2014) e Tan *et al.* (2020); enquanto por carga constante foi realizado por Kalhori e Bagherpour (2017). Os resultados obtidos serão apresentados mais a diante.

Na sequência os resultados obtidos pelas pesquisas descritas no Quadro 1 estão apresentados, iniciando com a pesquisa de Wiktor e Jonkers (2011). Estes pesquisadores estudaram concretos com adição da bactéria *B. alkalinitrilicus*. Essa bactéria foi impregnada com meio de cultivo em argila expandida, a qual foi utilizada como agregado graúdo na elaboração do concreto. A Figura 6 ilustra os resultados obtidos pelos pesquisadores, onde a autocicatrização autógena (sem agente de autocicatrização), analisada por imagem, fechou parcialmente uma fissura de até 0,3 mm, Figura 6 (a), e a autocicatrização por ação bacteriana fechou completamente uma fissura de até 0,4 mm após um período de 100 dias, conforme pode-se visualizar na Figura 6 (b) (WIKTOR e JONKERS, 2011).

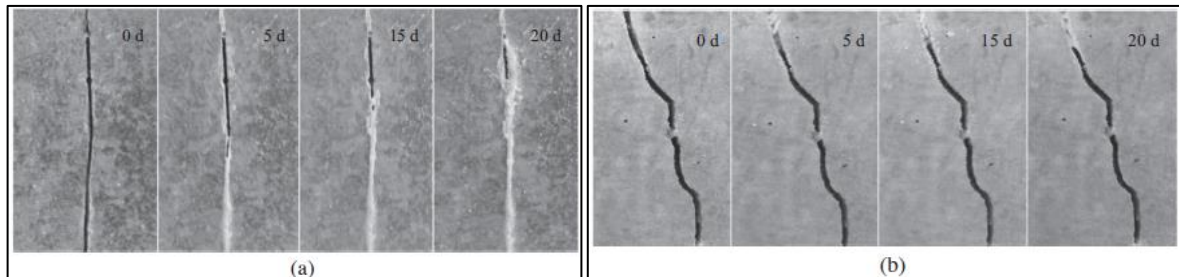
Figura 6 – Comparação do antes e depois de fissuras sem e com um agente de autocicatrização



Fonte: Wiktor e Jonkers (2011).

Como a incorporação bacteriana tem foco na autocicatrização de fissuras e melhoria da durabilidade de concretos e argamassas, Luo, Quian e Li (2015) estudaram a incorporação de esporos de bactérias alcali-resistentes, em pastas de cimento, e simularam fissuras para verificar a autocicatrização a partir da análise de imagens. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7 – Acompanhamento de fissuras de 0,3 mm (a) e 0,8 mm (b) durante 20 dias de cura



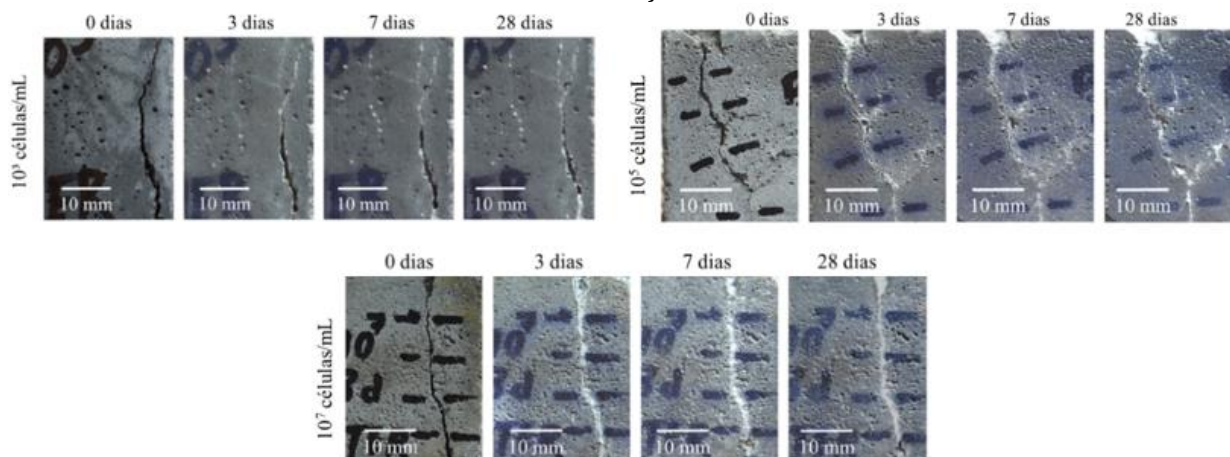
Fonte: Luo, Quian, Li (2015).

Luo, Quian e Li (2015) observaram que agentes bacterianos podem proporcionar a autocicatrização em materiais cimentícios. No entanto a capacidade de autocicatrização depende de muitos fatores, dentre eles a espessura da abertura e o tempo de análise. A bactéria utilizada pelos pesquisadores, em 20 dias foi capaz de fechar fissuras de 0,3 mm quase que completamente, porém em fissuras de 0,8 mm foram observadas poucas diferenças com o avanço do tempo.

Mondal e Ghosh (2018) estudaram diferentes concentrações de esporos de *B. subtilis* na autocicatrização de fissuras, conforme Figura 8, e observaram que com maiores concentrações a autocicatrização ocorria mais rapidamente. Estes pesquisadores estudaram

fissuras de 0,1 a 1,2 mm e armazenaram as amostras imersas em água durante o tempo de análise.

Figura 8 – Acompanhamento da autocicatrização de fissuras por imagem pela adição de diferentes concentrações de bactéria



Fonte: Mondal e Ghosh (2018).

Além destes pesquisadores, Alazhari *et al.* (2018) analisaram a autocicatrização em argamassas com a incorporação de *B. pseudofirmus* encapsulados em perlita expandida com nutrientes (extrato de levedura e acetato de cálcio). A perlita expandida substituiu 20% da areia. No Quadro 2 são apresentados a nomenclatura, os constituintes das argamassas estudadas e as proporções de nutrientes e esporos.

Quadro 2 – Nomenclatura e proporções de nutrientes e esporos estudadas por Alzhari e colaboradores

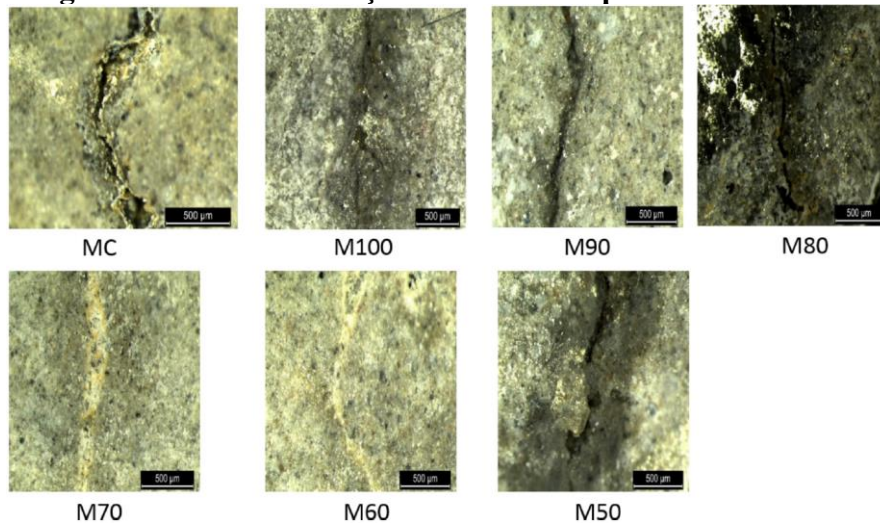
Nomenclatura	Constituintes (g)				
	Água	Cimento	Areia padrão	CPN ⁺	CPS ⁺⁺
MC	225	450	1350	-	-
M100			108	0	
M90			97	10	
M80			87	21	
M70			76	31	
M60			65	41	
M50			54	51	

*CPN: Perlita revestida com nutrientes; **CPS: perlita revestida com esporos.

Fonte: Alazhari *et al.*, (2018).

Os resultados da autocicatrização de fissuras após 165 dias de análise podem ser visualizados na Figura 9, sendo que até a idade de análise as amostras foram curadas imersas em água. Ressalta-se que as referências (sem adição de bactéria) foram denominadas de MC e M100, sendo que a MC foi a referência com areia e sem a incorporação de bactéria e a M100 possuía a substituição de 20% de areia por perlita expandida com nutrientes, mas sem bactéria. As amostras M90, M80, M70, M60 e M50 continham diferentes proporções nutrientes e esporos bacterianos, conforme apresentado no Quadro 2.

Figura 9 – Autocicatrização das fissuras após 165 dias de cura

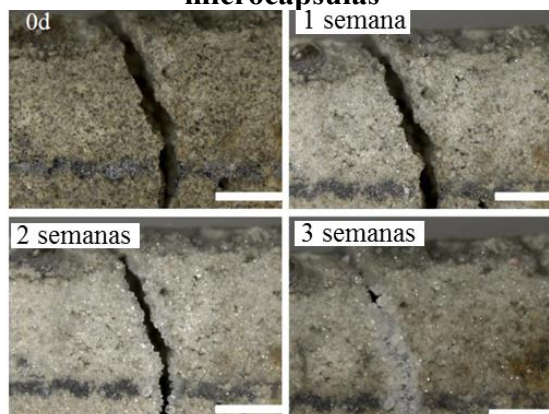


Fonte: Alazhari *et al.* (2018).

A partir da análise da Figura 9, pode-se verificar que após 165 dias nas amostras sem adição de bactérias (MC e M100), nenhuma autocicatrização visual foi observada, assim como nas amostras M90, M80 ou M50. No entanto as imagens de M70 e M60 mostraram um preenchimento completo na superfície das fissuras. Desta forma, os autores concluíram que existe uma proporção ótima entre a quantidade de esporos e o volume de nutrientes presentes para que os esporos possam germinar e precipitar o carbonato de cálcio (ALAZHARI *et al.* 2018).

Wang *et al.* (2014) estudaram argamassas com adição da bactéria *B. sphaericus* encapsulada em microcápsulas, na concentração de 10^9 células por grama de microcápsula. Estes pesquisadores adicionaram extrato de levedura, ureia e nitrato de cálcio no momento da mistura dos materiais e verificaram o fechamento de fissuras de 0,22 mm em três semanas, conforme ilustra a Figura 10.

Figura 10 – Autocicatrização de fissura por adição de bactérias e nutrientes em microcápsulas



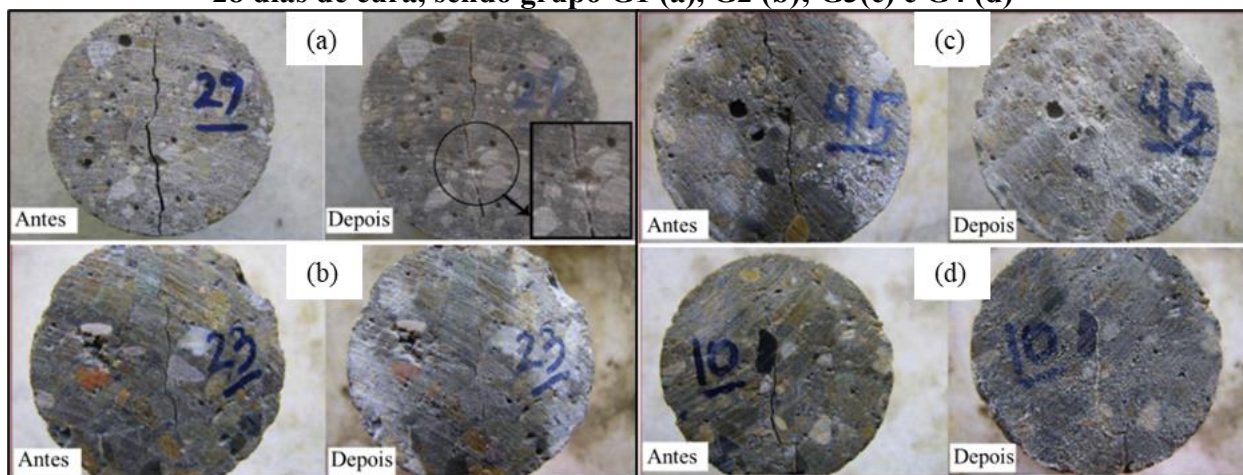
Fonte: Wang *et al.* (2014).

Além da análise por imagem, Wang e colaboradores (2014) avaliaram a permeabilidade a carga variável em corpos de prova fissurados durante 30 dias após a fissuração. A partir dos resultados os pesquisadores observaram que com o passar do tempo a permeabilidade tende a se estabilizar, sendo que as diminuições mais efetivas na permeabilidade aconteceram mediante a adição das bactérias em microcápsulas e armazenadas em ciclo intermitente (16 horas em água e 8 horas expostas ao ar).

Kalhari e Bagherpour (2017) estudaram a incorporação da bactéria *B. subtilis* em concreto projetado, avaliando diferentes condições de cura. Estes pesquisadores simularam fissuras a partir do ensaio de tração por compressão diametral e as acompanharam em quatro diferentes grupos de amostras.

O grupo G1 foi o concreto de referência, sem adição de bactérias e curado em água; o grupo G2 não possuía a adição de bactérias, mas foi curado em uma solução de ureia e cloreto de cálcio; o grupo G3 continha a adição de $2,2 \times 10^6$ células/mL, adicionadas à água de amassamento e curadas em solução de ureia e cloreto de cálcio e, por fim, o grupo G4 não continha bactérias na água de amassamento, mas a cura foi realizada em solução de ureia e cloreto de cálcio com a adição de bactérias. Vale destacar que não foi adicionado aditivo no traço do concreto. Os resultados da autocicatrização de fissuras estão ilustrados na Figura 11.

Figura 11 – Fechamento de fissuras em amostras de concreto projetado antes e depois de 28 dias de cura, sendo grupo G1 (a), G2 (b); G3(c) e G4 (d)



Fonte: Kalhari e Bagherpour (2017).

Como pode ser visto na Figura 11 (a e b) poucas mudanças foram observadas na fissura da amostra curada em água e com a solução de ureia e cloreto de cálcio, houve uma diminuição pequena na espessura da fissura, proveniente da cura autógena que é uma propriedade inerente aos materiais cimentícios. Em contraste, a Figura 11 (c e d) mostra a fissura fechada com depósitos brancos, em maior quantidade que visto anteriormente. De

acordo com os pesquisadores, o material é carbonato de cálcio que foi precipitado por ação das bactérias.

Kalhari e Bagherpour (2017), além de avaliarem a autocicatrização por imagem, também realizaram o ensaio de permeabilidade a carga constante em corpos de prova fissurados. A partir da análise dos resultados, os pesquisadores verificaram que as maiores diferenças entre a permeabilidade inicial (imediatamente após a fissuração) e final (após 28 dias) foram encontradas no grupo 3 e 4, corroborando com as análises de imagem.

Além destes pesquisadores Tan *et al.* (2020) estudaram a incorporação de esporos da bactéria *B. cohnii* encapsuladas em grânulos de concreto aerado, juntamente com extrato de levedura e nitrato de cálcio. Os grupos de amostra estudados foram chamados de:

- REF: Referência, sem nenhuma adição;
- CTRL: Controle, com adição de 1g de extrato de levedura e 4,55 g de nitrato de cálcio no momento da mistura;
- CaN-direct: Adição de grânulos de concreto aerado com bactéria encapsulada e de 1g de extrato de levedura e 4,55 g de nitrato de cálcio no momento da mistura;
- CaN-encap: Adição de grânulos de concreto aerado com bactéria encapsulada e de 1g de extrato de levedura e 4,55 g de nitrato, também encapsulado em grânulos;
- CaNY-encap: Adição de grânulos de concreto aerado com bactéria encapsulada e de 4g de extrato de levedura e 4,55 g de nitrato, também encapsulado em grânulos;

Estes pesquisadores curaram as amostras com e sem a adição dos esporos bacterianos imersas em água, sendo que parte das amostras foram encaminhadas para câmara de carbonatação (concentração de CO₂ de 20% e umidade relativa de 50%) aos 14 dias e ficaram armazenadas na câmara por mais 28 dias. As fissuras foram induzidas nas amostras aos 28 dias por ensaio de flexão em três pontos. Para evitar a ruptura dos corpos de prova, eles foram envolvidos com tiras de polímero reforçadas com fibra de carbono (TAN *et al.* 2020).

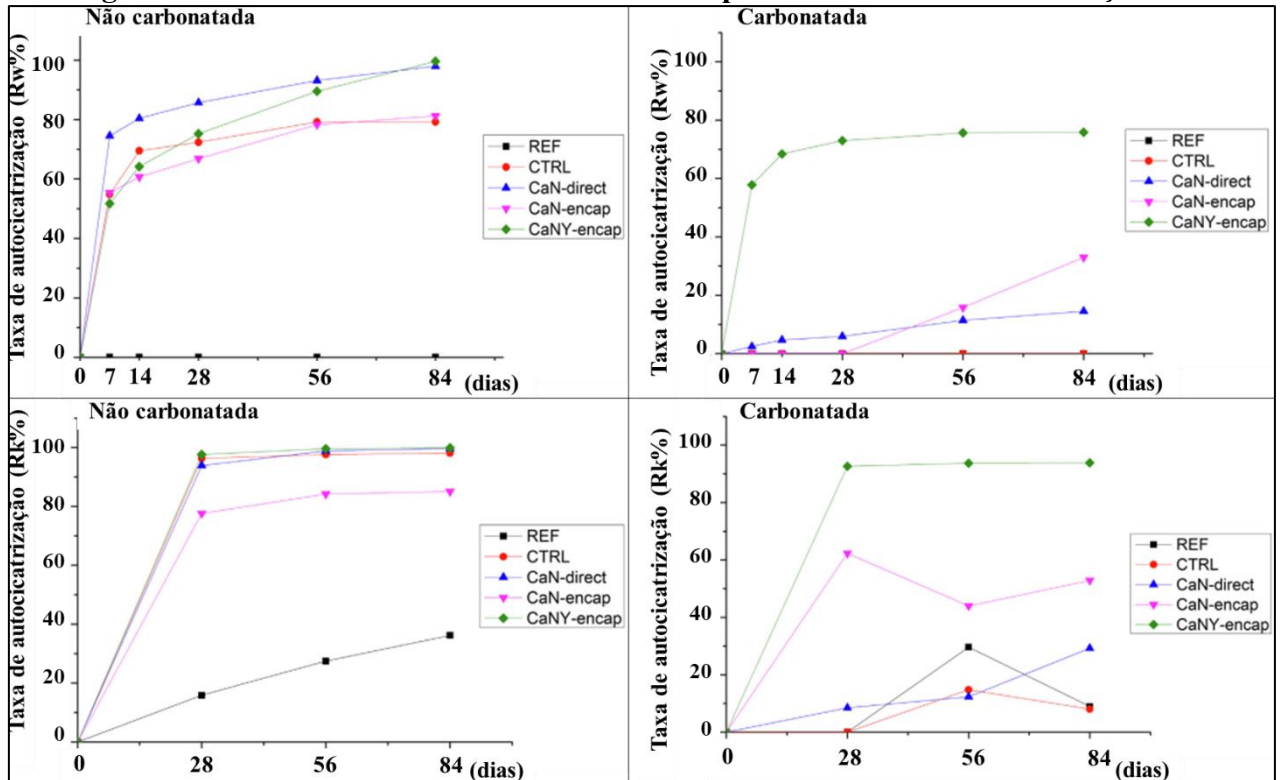
Tan e colaboradores (2020) avaliaram a taxa de autocicatrização a partir da análise de imagem e medição da espessura das fissuras (Rw) e a partir do ensaio de permeabilidade por carga variável (Rk - Figura 12). Os resultados obtidos para as amostras carbonatadas e não carbonatadas estão ilustrados na Figura 13.

Figura 12 – Ensaio de permeabilidade de carga variável



Fonte: Tan *et al.*, (2020)

Figura 13 – Resultados de Tan e colaboradores para a taxa de autocicatrização



Fonte: Adaptado de Tan *et al.*, (2020).

A partir da análise dos resultados os pesquisadores verificaram que nas amostras não carbonatadas sem bactérias e sem a fonte de cálcio e o extrato de levedura (REF), não houve autocicatrização quando analisada a taxa R_w . Quando o extrato de levedura e nitrato de cálcio foram adicionados (CTRL) a autocicatrização das fissuras foi de aproximadamente 70% durante o tempo de análise, mostrando que o nitrato de cálcio foi suficiente para que houvesse autocicatrização (TAN *et al.* 2020).

Quando as bactérias foram adicionadas, por sua vez, juntamente com o meio de cultivo, a taxa de autocicatrização R_w aumentou para 95%. A única amostra que ficou com um desempenho próximo as de referência e controle foi a CaN-encap, possivelmente pela abertura da fissura não ter rompido as cápsulas adicionadas no momento da mistura (TAN *et al.* 2020).

Em se tratando da taxa de autocicatrização obtida pela permeabilidade (R_k) observou-se que a referência (REF) teve uma autocicatrização de aproximadamente 38%, provavelmente pela autocicatrização autógena na maior profundidade da fissura, que não é quantificada por R_w . As argamassas CTRL, CaN-direct e CaNY-encap atingiram 100% de autocicatrização aos 28 dias e a CaN-encap atingiu aproximadamente 80% (TAN *et al.* 2020).

No entanto quando as amostras foram carbonatadas antes da fissuração a autocicatrização (R_w) não ocorreu nas amostras sem adição de microrganismos e caiu para em torno de 70% quando os estes foram adicionados juntamente com o meio de cultivo, de forma encapsulada (CaNY-encap). Nesta análise a adição da quantidade de extrato de levedura também influenciou na autocicatrização, pois a argamassa CaN-encap apresentou um desempenho inferior a CaNY-encap (TAN *et al.* 2020).

No caso da taxa de autocicatrização quantificada pela permeabilidade (R_k), nas amostras carbonatadas antes da fissuração, observou-se que a maior taxa de autocicatrização também foi atingida pela argamassa CaNY-encap e uma menor autocicatrização foi obtida pelas demais (TAN *et al.* 2020).

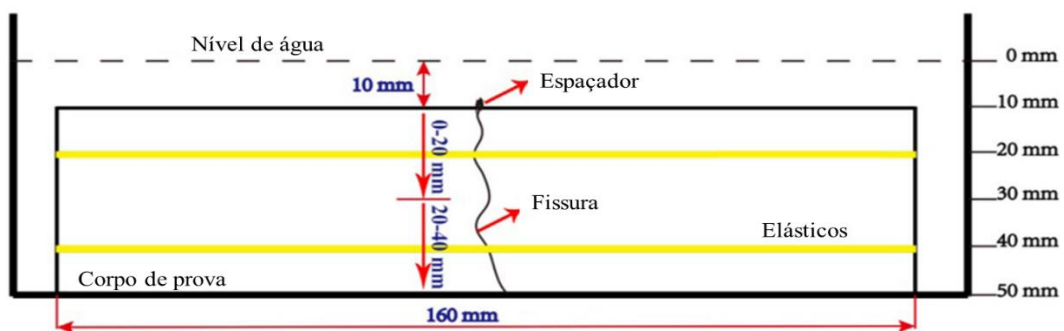
É interessante observar que, nesta análise, as argamassas REF, CTRL e CaN-encap sofreram um aumento seguido de uma diminuição da taxa de autocicatrização (R_k). Tal fato pode ter ocorrido por diferentes fatores, tais como: o manuseio do corpo de prova durante os intervalos de análise que pode ter resultado em um aumento da espessura da fissura; o desprendimento dos cristais frente a realização do ensaio ou até mesmo um problema relacionado a falta de impermeabilidade do permeâmetro no momento da realização do ensaio (TAN *et al.* 2020).

É importante destacar que as taxas de autocicatrização não devem ser comparadas, pois quantificam a fissura de maneira diferente (TAN *et al.* 2020). Enquanto a análise por imagem e cálculo da taxa de autocicatrização pela medição da espessura ou área da fissura analisa apenas a superfície da abertura, o ensaio de permeabilidade avalia toda sua geometria (espessura e profundidade).

Além destes pesquisadores Rong e colaboradores (2020) calcularam a taxa de autocicatrização em amostras de argamassa com a adição da bactéria *S. pasteurii*, nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 células/mL, de modo a analisar o impacto da bioprecipitação em aberturas com diferentes espessuras.

As aberturas foram realizadas a partir do rompimento do corpo de prova prismático, aos 7 dias de idade, e colocação de espaçadores de espessura conhecida, conforme ilustra a Figura 14. Para que o corpo de prova ficasse estável, elásticos foram utilizados (RONG *et al.* 2020).

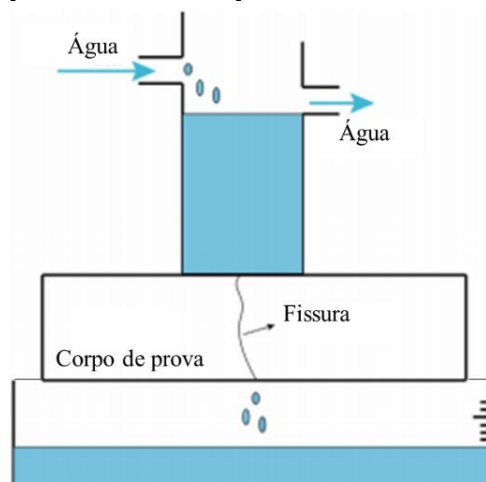
Figura 14 – Ilustração das aberturas formadas no estudo realizado por Rong *et al.*, (2020)



Fonte: Rong *et al.*, (2020).

Após a realização da abertura foi realizado o ensaio de permeabilidade a carga constante (Figura 15), na sequência as amostras foram armazenadas em água por 50 dias e após esse período foram ensaiadas novamente quanto à permeabilidade. Com base no resultado da permeabilidade a taxa de autocicatrização (R_K) foi determinada a partir da Equação 4.

Figura 15 – Esquema ensaio de permeabilidade de carga constante



Fonte: Rong *et al.*, (2020).

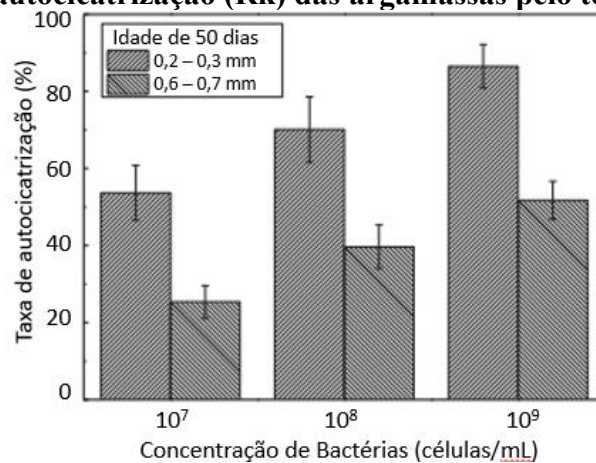
$$R_K = \frac{V_0 - V_{50}}{V_0} \times 100\% \quad \text{Eq. 4}$$

Onde:

- R_K é a taxa de autocicatrização, em porcentagem;
- V_0 é a taxa de infiltração inicial, medida após a fissuração;
- V_{50} é a taxa de infiltração medida no dia 50.

Através dos ensaios realizados, os pesquisadores observaram que ao aumentar a concentração bacteriana houve um aumento da taxa de autocicatrização, como pode-se visualizar na Figura 16. Além disso verificou-se que as aberturas de menor espessura tiveram uma taxa de autocicatrização maior (RONG *et al.* 2020).

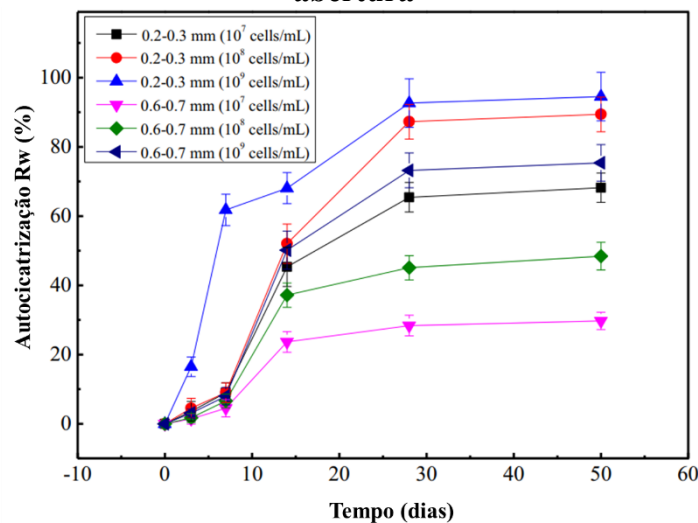
Figura 16 – Taxa de autocicatrização (R_K) das argamassas pelo teste de permeabilidade



Fonte: Rong *et al.*, (2020).

Os autores também calcularam a taxa de autocicatrização por meio da medição da área das aberturas ao longo do tempo. Na Figura 17 estes resultados podem ser visualizados.

Figura 17 – Taxa de autocicatrização (R_w) das argamassas pela medição da área da abertura



Fonte: Rong *et al.*, (2020)

A partir da Figura 17 nota-se que as maiores taxas de autocicatrização (próximas a 90%) foram obtidas nas menores fissuras frente a adição das duas maiores concentrações (10^8 e 10^9 células/mL). As aberturas de 0,6 a 0,7 mm foram 70% autocicatrizadas por meio da adição da concentração de 10^9 células/mL. Além disso a partir da análise do gráfico é possível observar que após os 28 dias a taxa de autocicatrização sofreu variações menores do que nas idades anteriores, apontando para uma estabilização (TAN *et al.*, 2020).

Em se tratando da autocicatrização por adição de bactérias, muitos pesquisadores questionam a eficácia deste tratamento em idades avançadas, por se tratar da adição de microrganismos adicionados a matriz cimentícia. Entretanto a literatura afirma que os esporos podem permanecer inativos, porém vivos, dentro da matriz cimentícia por mais de 100 anos (JONKERS *et al.*, 2007; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Além disso Skevi e colaboradores (2021) afirmam que mesmo em amostras fissuradas após 9 meses, os esporos adicionados foram capazes de autocicatrizarem 80% das fissuras analisadas. Desta maneira, a autocicatrização por adição de bactérias pode aumentar a vida útil das edificações.

Entretanto conforme as pesquisas avançam, observa-se a necessidade de uma compreensão mais profunda dos mecanismos e princípios básicos da autocicatrização promovida por microrganismos e os fatores que podem influenciar neste processo. Tal necessidade se deve ao fato de que várias bactérias são capazes de produzir minerais e biocimentar poros e fissuras por diferentes metabolismos, ainda não claros ou definidos na literatura (VAN TITTELBOOM *et al.*, 2012, ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

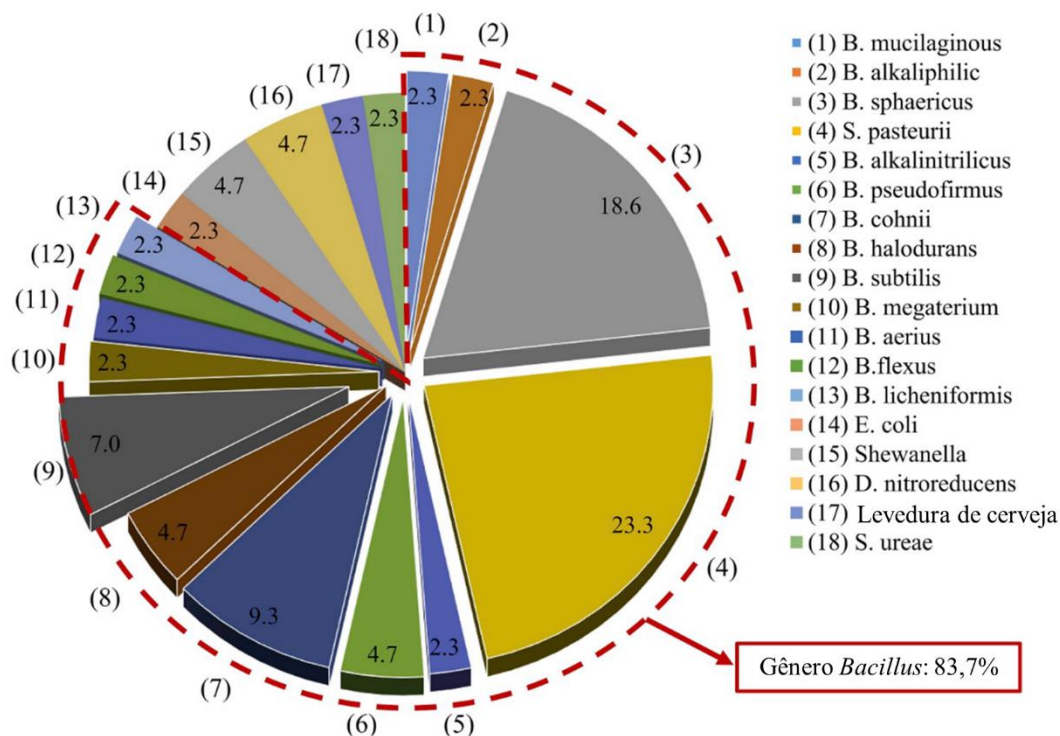
2.1.4 Bactérias utilizadas na bioprecipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3)

Existe uma variedade de microrganismos capazes de induzir a precipitação de CaCO_3 a partir de diferentes atividades fisiológicas (CASTANIER *et al.*, 1999; RIDING, 2000; MAIGNIEN *et al.*, 2011; DE MUYNCK *et al.*, 2013). Segundo González *et al.* (2014) as bactérias do gênero *Bacillus* são empregadas na bioprecipitação de CaCO_3 em materiais cimentícios, pois se reproduzem rapidamente e em grande escala, apresentam uma diversidade de metabolismos, se adaptam às mais diversas condições ambientais, produzem esporos e em sua maioria são álcali-resistentes.

Um levantamento realizado por Nguyen *et al.* (2019) relata que na última década 83,7% dos estudos envolvendo a autocicatrização por adição de bactérias utilizaram

cepas do gênero *Bacillus*, conforme ilustra a Figura 18. De acordo com estes pesquisadores, o uso de bactérias do gênero *Bacillus* se justifica pela facilidade de encontrá-las em ambientes naturais, pela sua capacidade de transformação em esporos em condições desfavoráveis ao crescimento e por poderem permanecer de maneira dormente nos materiais cimentícios por mais de 100 anos.

Figura 18 – Levantamento realizado por Nguyen *et al.*, (2019) sobre as bactérias utilizadas para autocatrização em materiais cimentícios



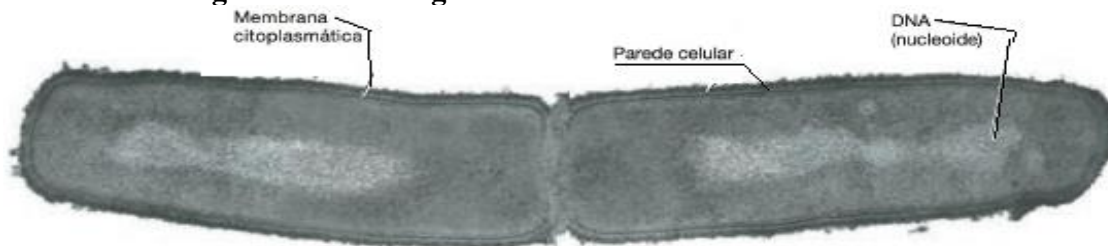
Fonte: Nguyen *et al.*, (2019)

Segundo Ramachandran *et al.* (2001) e Jonkers *et al.* (2010) a transformação em esporos é vital para a sobrevivência das bactérias nas matrizes cimentícias. Destaca-se que os materiais cimentícios são altamente alcalinos e não possuem os nutrientes necessários para a bactéria sobreviver. De acordo com Gomes (2013) a partir da transformação das células em esporos, as bactérias diminuem o seu metabolismo e ficam inativas, mas não estão mortas. Além disso os esporos são extremamente resistentes a agressões externas e elevadas temperaturas, podendo permanecer inativos por milhões de anos.

Dentre as bactérias do gênero *Bacillus*, a *B. subtilis* se destaca, pois é um microrganismo utilizado em diversas aplicações biotecnológicas e possui enzimas que desempenham papéis importantes em diversos processos industriais (MONTROYA *et al.*, 2005). Segundo Barabesi *et al.* (2007) a *B. subtilis* é uma bactéria que pode ser utilizada na produção de calcita em meios com uma fonte de cálcio.

B. subtilis são bactérias Gram positivas¹, aeróbias² ou anaeróbias facultativas³ e formadoras de esporos, apresentando estrutura de parede celular comum. O formato da sua célula é de bastonete, conforme representado na Figura 19. Esta espécie de bactéria é encontrada facilmente em vários ambientes naturais, como solos, vegetações e cavernas (MADIGAN *et al.*, 2010; PACHAIVANNAN *et al.*, 2020).

Figura 19 – Micrografia da divisão celular de *B. subtilis*.



Fonte: MADIGAN *et al.* (2010).

A parede celular desta bactéria é composta principalmente de peptidoglicano, que é carregado negativamente, atraindo os íons Ca^{2+} no momento da precipitação de CaCO_3 (FRIIS *et al.*, 2003). Outro fator importante de ser citado é que essa bactéria ao se encontrar em situações precárias de falta de água e nutrientes se transforma em esporos, uma estratégia de sobrevivência que as torna mais resistentes (OLIVEIRA, 2008).

Vale destacar que as condições ambientais em que as bactérias são submetidas influenciam diretamente nas atividades metabólicas que estas desenvolvem (DUPRAZ *et al.*, 2004). Portanto se uma bactéria estiver habituada a produzir CaCO_3 em um determinado ambiente, esta pode ter um potencial maior de precipitação deste cristal quando adicionada aos materiais cimentícios, sendo que o carbonato de cálcio pode ser produzido por microrganismos em diversos ambientes, como cavernas, solos, rios e mares (KRUMBEIN *et al.*, 2003; REEKSTING *et al.*, 2020; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

2.1.5 Bactérias isoladas de caverna

Pesquisadores têm procurado diligentemente por novas espécies bacterianas buscando potencializar a precipitação de CaCO_3 para autocicatrização em materiais

¹ Bactérias Gram positivas possuem maior afinidade pelo cristal violeta do que bactérias Gram negativas, durante o teste de coloração Gram.

² Bactérias que precisam do oxigênio para respiração celular.

³ Bactérias anaeróbicas facultativas utilizam oxigênio em seu metabolismo energético, mas também podem crescer na ausência de oxigênio.

cimentícios, e, por esse motivo diversas bactérias foram isoladas de vários ambientes e testados quanto ao seu potencial precipitação (CHUO *et al.*, 2020).

Dentre os materiais com esse potencial destacam-se as bactérias isoladas de caverna (ZHU e DITTRICH, 2016), pois diversos autores que estudaram bactérias isoladas de caverna observaram um potencial de formação de minerais de carbonato de cálcio em estudo *in vitro* (CANAVERAS *et al.*, 2001; GROTH *et al.*, 2001; CACCHIO *et al.*, 2003; SANCHEZ-MORAL *et al.*, 2003; CACCHIO *et al.*, 2004; ENGEL *et al.*, 2004).

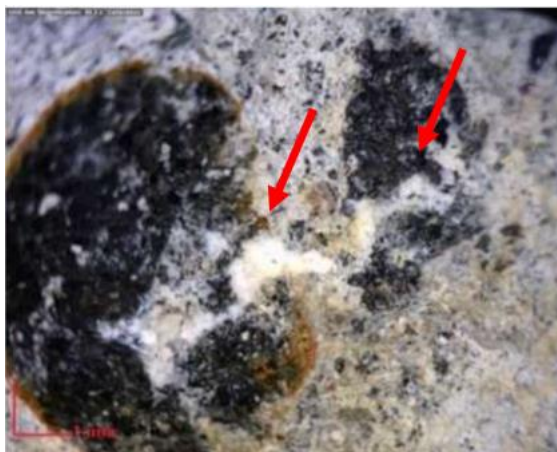
Outro fator interessante a ser mencionado é que, embora alguns autores acreditem que a formação de estalactites e estalagmites em cavernas seja um processo abiótico, estudos recentes sugerem que microrganismos atuam na sua formação (BANKS *et al.*, 2010). De acordo com Rusznyák *et al.* (2012) células bacterianas foram encontradas na superfície e no interior de estalactites e estalagmites em cavernas na Alemanha.

O primeiro estudo encontrado com a aplicação de bactérias isoladas de caverna para autocicatrização de materiais cimentícios foi publicado por Li *et al.* (2019). Estes pesquisadores isolaram bactérias do gênero *Acinetobacter* da caverna de Yixing Shanjuan, na província de Jiangsu (China) e verificaram que a partir desta adição em argamassas houve a bioconsolidação de uma abertura artificial, criada a partir da inserção de uma haste metálica no momento da mistura. Além disso vale destacar que a adição bacteriana resultou na melhoria da resistência à compressão e na diminuição da absorção de água.

Porém neste estudo não foi apresentado com clareza a concentração de bactéria adicionada à matriz cimentícia, o traço e a relação água/cimento estudados. Os autores apontam que o biocimento, que nada mais é do que os esporos da bactéria *Acinetobacter* liofilizados, foi adicionado às argamassas em uma relação e 1:3, misturado com a areia (Li *et al.*, 2019).

Além do estudo realizado por Li *et al.* (2019), Nugroho *et al.* (2019) estudaram a adição da bactéria *Lysinibacillus macroides*, isolada da caverna Jomblang na Indonésia, impregnada em cinzas vulcânicas. Estes pesquisadores observaram que a bactéria isolada de caverna foi capaz de fechar fissuras de até 0,3 mm após 60 dias em concreto, conforme ilustra a Figura 20.

Figura 20 – Autocicatrização promovida pela bactéria isolada da caverna Jomblang na Indonésia



Fonte: Nugroho *et al.* (2019).

Entretanto os pesquisadores observaram uma diminuição na resistência à compressão do concreto. Esta diminuição foi justificada pela concentração adotada, que segundo os autores pode não ter sido a ideal para melhoria do desempenho mecânico e apontam que mais estudos são necessários para avaliar a autocicatrização de fissuras maiores e também para reverter a influência deste tratamento na resistência à compressão (NUGROHO *et al.*, 2019).

Pesquisadores gregos também isolaram bactérias de caverna pelo seu potencial de precipitação de CaCO_3 . A bactéria *B. pumilus* foi isolada da caverna Paiania, na Grécia, no entanto esta bactéria não foi aplicada para autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios e sim para o tratamento de superfície em peças de mármore. Daskalakis *et al.* (2015) observaram a bioprecipitação de varita promovida pela ação bacteriana em peças de mármore por mais de um ano.

Frente ao apresentado, pôde-se verificar o potencial das bactérias isoladas de caverna na precipitação de CaCO_3 . Entretanto ainda existem poucos estudos da aplicação destes microrganismos na autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios, sendo que até o momento apenas dois artigos foram encontrados com este foco (LI *et al.*, 2019; NUGROHO *et al.*, 2019).

Além disso o entendimento sobre os mecanismos de precipitação de CaCO_3 é necessário para que se possa potencializar a atuação bacteriana e, conseqüentemente, a autocicatrização em materiais cimentícios frente a essa aplicação.

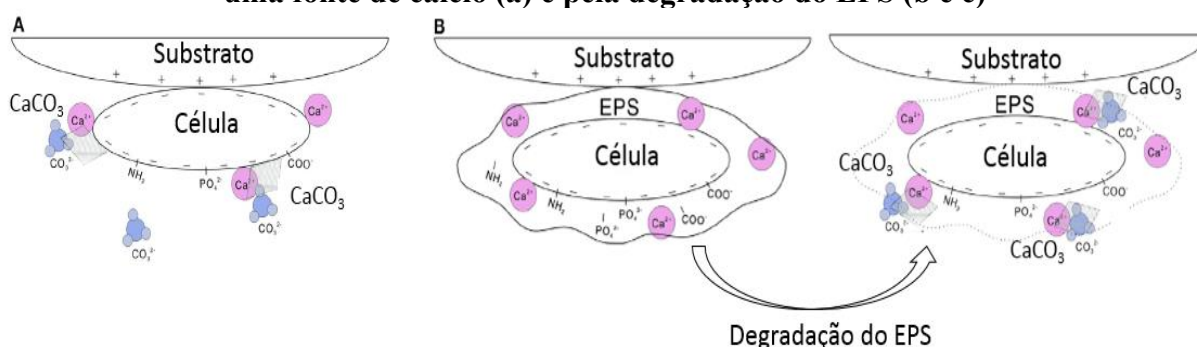
2.1.6 Mecanismos de precipitação de CaCO_3

Dependendo da bactéria utilizada pode-se ter diferentes mecanismos de precipitação de carbonato de cálcio. De acordo com Barabesi *et al.* (2007) a precipitação de CaCO_3 promovida por bactérias é classificada como um mecanismo de Mineralização Biologicamente Induzida (MBI). Este mecanismo utiliza uma atividade metabólica bacteriana e precursores biominerais incorporados aos materiais cimentícios, com o intuito de formar um composto inorgânico como potencial de autocicatrização (DE MUYNCH *et al.*, 2010 e SHARMA *et al.*, 2017).

Na MBI os cristais são formados a partir de uma atividade metabólica bacteriana involuntária, na presença de uma fonte de cálcio. Essa precipitação pode ocorrer nos materiais cimentícios de três maneiras: pela hidrólise de ureia, promovida por bactérias ureolíticas; pela oxidação de compostos orgânicos, que pode ser realizada por bactérias ureolíticas ou não ureolíticas; e a partir de bactérias nitrificantes (PARK *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2019; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Em todos os mecanismos de precipitação, os cristais são depositados ao redor da própria célula bacteriana, esporos, EPS⁴s e biofilmes, os quais atuam como locais de nucleação do CaCO_3 . A Figura 21 apresenta um esquema da precipitação de CaCO_3 . É importante ressaltar que, de acordo com De Belie (2010), as bactérias produzem biofilme e esporos para se proteger do ambiente hostil dos materiais cimentícios.

Figura 21 – Célula bacteriana como local de nucleação dos cristais de CaCO_3 em meio a uma fonte de cálcio (a) e pela degradação do EPS (b e c)



Fonte: Adaptado de ZHU e DITTRICH (2016).

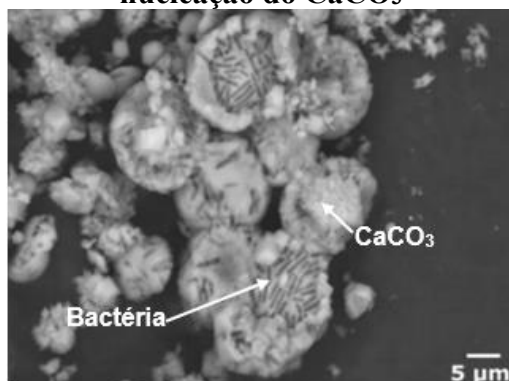
Conforme ilustra a Figura 21, além do cálcio presente na solução, que tende a se aproximar da parede celular bacteriana por atração iônica, o EPS formado por algumas

⁴ EPS são substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substances*) produzidas por algumas bactérias, que formam o biofilme.

bactérias também tem cálcio em sua composição, o qual a partir da degradação do EPS pode ser utilizado na precipitação de CaCO_3 (ZHU e DITTRICH, 2016).

Na sequência, a Figura 22 ilustra a Microscopia Eletrônica de Varredura de CaCO_3 precipitado pela bactéria *S. pasteurii* como local de nucleação, na qual pode-se observar que as bactérias estão no centro dos cristais precipitados.

Figura 22 – Representação de uma amostra de *B. pasteurii* atuando como local de nucleação do CaCO_3

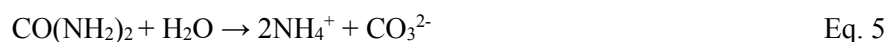


Fonte: DUPRAZ *et al.* (2009)⁽²⁾.

Segundo Barabesi *et al.* (2007) as bactérias e o meio em que as mesmas estão inseridas influenciam de forma direta na morfologia do cristal precipitado, pois as bactérias determinam o local de nucleação do cristal e o meio em que estão inseridas estabelece o metabolismo utilizado na precipitação, caso as bactérias tenham essa capacidade.

Vale destacar que a maioria dos estudos sobre a precipitação de CaCO_3 promovida por microrganismos são a partir da hidrólise da ureia (DE MUYNCK *et al.*, 2013; KUMARI *et al.*, 2014). Para que a precipitação ocorra por este metabolismo a bactéria precisa ter contato com a ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) e uma fonte de cálcio (DHAMI *et al.*, 2013; PHILLIPS *et al.*, 2013; ACHAL e MUKHERJEE, 2015).

Durante este processo metabólico, as bactérias hidrolisam a ureia, a partir da enzima urease, em carbonatos e amônia (XU e YAO, 2014). Sendo que para cada mol de CaCO_3 precipitado, são liberados dois mols de íon amônio (NH_4^+), conforme apresentado nas Equações 5 e 6 (DHAMI *et al.*, 2013; PHILLIPS *et al.*, 2013; ACHAL e MUKHERJEE, 2015).



De acordo com Justo-Reinoso e colaboradores (2021) as bactérias ureolíticas são capazes de precipitar cristais de CaCO_3 em maior velocidade do que as não ureolíticas. Reeksting e colaboradores (2020) reforçam que mesmo a velocidade de precipitação sendo

maior nas bactérias ureolíticas, as não ureolíticas são capazes de autocicatrizarem fissuras de maneira mais homogênea. Entretanto deve-se conduzir estudos para avaliar se a elevada carga de nitrogênio liberado na produção de amônio durante a hidrólise da ureia pode causar algum dano aos materiais cimentícios (DHAMI *et al.*, 2012; XU e YAO, 2014).

É importante observar que a produção de amônio levanta preocupações por seus efeitos negativos em materiais cimentícios, uma vez que contribui para a lixiviação do hidróxido de cálcio, semelhante a um ataque ácido (NEVILLE, 1995; DHAMI *et al.*, 2012; PORTLAND CEMENT ASSOCIATION, 2012; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021) e também pode resultar na corrosão da armadura em estruturas de concreto armado (NEVILLE, 2010; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). Além disso tem-se que o acúmulo de amônia na matriz cimentícia, com o tempo, pode inibir a precipitação de CaCO_3 (JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Existem, porém, bactérias que conseguem precipitar CaCO_3 sem hidrolisar a ureia (STOCKS-FISCHER, GALINAT e BANG, 1999; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). Esse tipo de bactéria pode metabolizar orgânicos em carbonato, sendo considerado um processo mais ecológico (ZHANG *et al.*, 2019). Entretanto a literatura ainda não é clara sobre os fatores ótimos para essa precipitação (REEKSTING *et al.*, 2020). Sabe-se que ela ocorre em meios com fonte de cálcio (BÄUERLEIN, 2003) de forma involuntária, pois as bactérias precipitam CaCO_3 com o intuito de diminuir o pH do meio em que estão inseridas como uma forma de proteção.

A precipitação de CaCO_3 pela oxidação de compostos orgânicos ocorre a partir de 3 reações bioquímicas, as quais estão descritas na sequência (Eq. 7 a 9) (STOCKS-FISHER, GALINAT e BANG, 1999).



De acordo com Stocks-Fisher, Galinat e Bang (1999) a precipitação de CaCO_3 ocorre quando a bactéria entra em contato com uma fonte de cálcio (Ca^{2+}), a qual por atração iônica, tende a se aproximar da parede celular bacteriana, que é carregada negativamente. O carbonato, por sua vez, é liberado na solução pela própria respiração celular, precipitando assim o CaCO_3 . Vale destacar que a fonte de cálcio utilizada pelas bactérias para a precipitação de CaCO_3 pode ser o próprio hidróxido de cálcio formado na matriz cimentícia (SOYSAL *et al.*, 2020).

De acordo com Tan *et al.* (2020) e Algaifi *et al.* (2020), embora a fonte de íons Ca^{2+} ideal a ser utilizada pelas bactérias durante a bioprecipitação não esteja clara na literatura, foi proposto que o hidróxido de cálcio é uma das fontes mais importantes para que o CaCO_3 seja precipitado.

Os pesquisadores ainda ressaltaram que em estudos anteriores, a autocicatrização foi testada em idades relativamente jovens (a maioria em apenas 28 dias de cura), onde o hidróxido de cálcio está presente como produto de hidratação e fornece um suprimento abundante de íons Ca^{2+} solúveis, não sendo necessária a adição de uma fonte de cálcio adicional. Entretanto fissuras formadas em idades mais avançadas podem necessitar de uma fonte de cálcio suplementar para que a autocicatrização aconteça (TAN *et al.*, 2020; ALAGAIFI *et al.*, 2020).

Essa precipitação envolve uma conversão metabólica onde sais orgânicos, através da respiração bacteriana, produzem dióxido de carbono. Na presença de água e um ambiente alcalino, o dióxido de carbono se dissolve e forma íons carbonato, que reagem com os íons cálcio e formam o carbonato de cálcio (SOYSAL *et al.*, 2020). De acordo com Ryparová e colaboradores (2021) a precipitação de CaCO_3 oriunda da obtenção de carbono por vias inorgânicas, sejam gasosas ou do dióxido de carbono dissolvido, de acordo com as seguintes reações (Equação 10 e 11):



Além do hidróxido de cálcio, o lactato de cálcio pode ser utilizado para a bioprecipitação de CaCO_3 . A Equação 12 apresenta a precipitação pela oxidação do lactato de cálcio. De acordo com Jonkers *et al.* (2010) e Mohammed *et al.* (2020) a grande vantagem do uso do lactato de cálcio é que além do CaCO_3 precipitado, apenas são liberados água e dióxido de carbono, podendo o CO_2 ser utilizado na precipitação em contato com o hidróxido de cálcio (Equação 13).



A precipitação de CaCO_3 realizada por bactérias nitrificantes acontece a partir da redução biológica de nitratos. Sendo que estas bactérias utilizam o nitrato no lugar no oxigênio durante a sua respiração. As bactérias mais conhecidas por essa capacidade de precipitação pela desnitrificação são *Pseudomonas aureginosa* e *Diaphorobacter nitroredens*.

Durante a desnitrificação, a bactéria produz dióxido de carbono, que em um meio aquoso produz carbonato que reage com os íons de cálcio para produzir CaCO_3 (Equação 14). As bactérias que atuam nesta reação também podem produzir NO_2 , que é conhecido como inibidor de corrosão (Equação 15) (ERŞAN, DE BELIE e BOON, 2015).



Pode-se observar que para que a precipitação de CaCO_3 ocorra, independentemente do mecanismo, o contato com uma fonte de cálcio é fundamental.

2.1.7 Fontes de cálcio adicionadas aos materiais cimentícios para a autocicatrização por adição de bactérias

Diferentes fontes de cálcio podem ser adicionadas aos materiais cimentícios para promover a autocicatrização mediante a bioprecipitação de CaCO_3 . O estudo e seleção da fonte de cálcio é importante pois ela pode afetar a autocicatrização, a fluidez e as propriedades mecânicas dos materiais cimentícios. Dentre as principais fontes de cálcio adicionadas aos materiais cimentícios para autocicatrização tem-se o lactato de cálcio, acetato de cálcio, nitrato de cálcio e o cloreto de cálcio (CHEN *et al.*, 2018; SCHREIBEROVÁ *et al.*, 2019).

Na Tabela 1 tem-se o custo por quilograma das possíveis fontes de cálcio levantadas. É importante mencionar que o levantamento dos dados foi realizado com produtos da mesma marca, no ano de 2021.

Tabela 1: Custo das possíveis fontes de cálcio comercializadas pela Synth

Material	Preço (R\$/kg)
Lactato de cálcio	98,99
Acetato de cálcio	137,44
Nitrato de cálcio	64,00
Cloreto de cálcio	68,38

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com Schreiberová e colaboradores (2019) cuidados maiores devem ser tomados na adição de cloreto de cálcio, pois esta adição pode resultar em corrosão da armadura em elementos de concreto armado. Frente a isso, Mors e Jonkers (2018) publicaram um artigo no boletim do RILEM sobre as interações entre os microorganismos e os materiais cimentícios. Neste artigo os pesquisadores apontaram que o acetato de cálcio pode ser prejudicial para a resistência à compressão de materiais cimentícios, enquanto o lactato de cálcio se mostrou mais vantajoso.

Além disso estes pesquisadores relataram que a adição de fontes de carbono em materiais cimentícios não deve exceder 5% em relação à massa de cimento, para que não se tenha efeitos adversos nas propriedades dos materiais (MORS e JONKERS, 2018).

Schreiberová e colaboradores (2019) apresentaram um levantamento bibliográfico de diferentes fontes de cálcio e quantidades de adições apresentadas na literatura. O levantamento bibliográfico apresentado pelos pesquisadores pode ser visualizado no Quadro 3 e foi complementado com artigos levantados pelo grupo de pesquisa. É importante destacar que a variação da resistência à compressão foi calculada considerando o valor de resistência da referência de cada estudo como 100%, logo os resultados com variação menor que 100% sofreram diminuição da resistência e os valores superiores a 100% tiveram um aumento dessa propriedade.

Quadro 3 – Levantamento bibliográfico das fontes de cálcio adicionadas em materiais cimentícios e sua influência na resistência à compressão

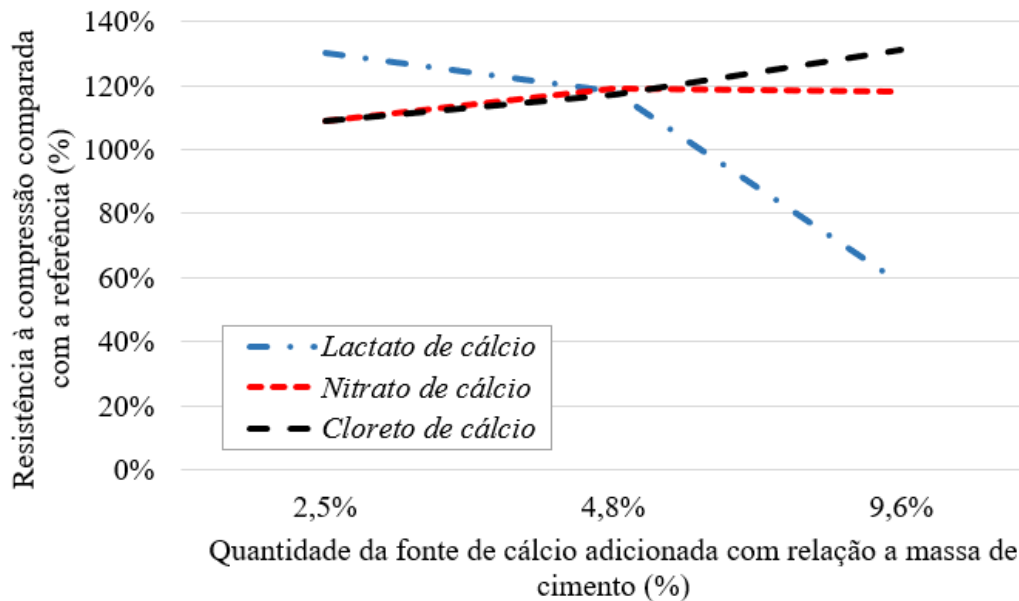
Fonte de Cálcio	Dosagem (% em relação à massa de cimento)	Variação na resistência à compressão em relação à referência (28 dias)	Referência	Comentários
Lactato de cálcio	9,6	58%	Chen <i>et al.</i> (2018)	Melhoria da resistência à compressão na maioria dos estudos. É normalmente aplicado como agente de autocicatrização para concretos e argamassas e sua eficiência foi comprovada no processo de bioprecipitação de CaCO ₃
	4,8	118%		
	3,0	122%	Luo e Qian (2016)	
	2,93	(1)	Liu <i>et al.</i> (2020)	
	2,5	130%	Chen <i>et al.</i> (2018)	
	2,0	116%	Luo e Qian (2016)	
	2,0	(1)	Luo <i>et al.</i> (2015)	
	1,0	103%	Luo e Qian (2016)	
	1,0	108%	Xu e Yao (2014)	
	1,0	118%	Jonkers <i>et al.</i> (2010)	
	1,0	83% (apenas fonte de cálcio e nutrientes) e 45% (fonte de cálcio, nutrientes e bactéria)	Jang <i>et al.</i> (2020)	
Formiato de cálcio	3,0	103%	Luo e Qian (2016)	Melhoria da resistência à compressão. Pode ser utilizado como um acelerador de hidratação
	2,0	105%		
	1,0	119%		
Nitrato de cálcio	9,6	118%	Chen <i>et al.</i> (2018)	Melhoria da resistência à compressão na maioria dos casos. Pode ser utilizado como um acelerador de hidratação e também pode ser utilizado no mecanismo de redução biológica de nitratos
	4,8	119%		
	3,0	79%	Luo e Qian (2016)	
	2,5	109%	Chen <i>et al.</i> (2018)	
	2,0	87%	Luo e Qian (2016)	
1,0	108%			
Glutamato de cálcio	1,0	103%	Xu e Yao (2014)	Material caro, inviabilizaria o produto autocicatrizante.
Acetato de cálcio	1,0	73%	Jonkers <i>et al.</i> (2010)	Diminuição da resistência à compressão
Cloreto de Cálcio	9,6	131%	Chen <i>et al.</i> (2018)	Aumento da resistência com o aumento da concentração. Cuidados adicionais relacionados à corrosão
	4,8	118%		
	2,5	109%		

(1) Não estudou a resistência à compressão, mas verificou a autocicatrização frente a adição da bactéria e da fonte de cálcio na quantidade indicada na tabela.

Fonte: Adaptado de Schreiberová *et al.*, (2019) e complementado pela autora.

Chen *et al.* (2018) estudaram dosagens baixas, médias e altas (aproximadamente 2,5, 4,8 e 9,6% em relação à massa de cimento, respectivamente) de diferentes fontes de cálcio e sua influência na resistência à compressão de materiais cimentícios. Os resultados de resistência à compressão aos 28 dias estão sintetizados na Figura 23.

Figura 23 – Resultados de resistência à compressão frente a variação da fonte de cálcio adicionada



Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados de Chen *et al.*, (2018).

A partir da Figura 23 é possível observar que a adição de dosagens elevadas de lactato de cálcio resultou na redução da resistência à compressão, enquanto dosagens baixas e médias apresentavam um resultado satisfatório. O nitrato e o cloreto de cálcio, por sua vez, se apresentaram satisfatórios em todas as dosagens estudadas, entretanto pode-se observar que o aumento na concentração de nitrato, de 4,8% para 9,6%, não resultou em aumento da resistência à compressão. Além disso a adição de 4,8%, em relação à massa de cimento, apresentou resultados semelhantes em todas as fontes de cálcio, com aumento de em média 20% da resistência à compressão com relação à referência (CHEN *et al.*, 2018).

É importante lembrar que a adição de cloreto de cálcio em materiais cimentícios deve ser realizada com cuidado, pois este pode resultar na corrosão do aço em elementos armados (MORS e JONKERS, 2018).

Além disso vale destacar que Chen e colaboradores (2018) estudaram o efeito isolado da adição bacteriana e das fontes de cálcio, e não o efeito combinado. Ou seja, estudaram argamassas com lactato, nitrato ou cloreto de cálcio e moldaram outra argamassa com a adição de bactéria, mas sem uma fonte complementar de cálcio. O estudo do efeito combinado destas adições é importante, pois a bactéria utilizará a fonte de cálcio na precipitação de CaCO_3 e tal fato pode potencializar a resistência à compressão, pois o CaCO_3 possui uma elevada resistência.

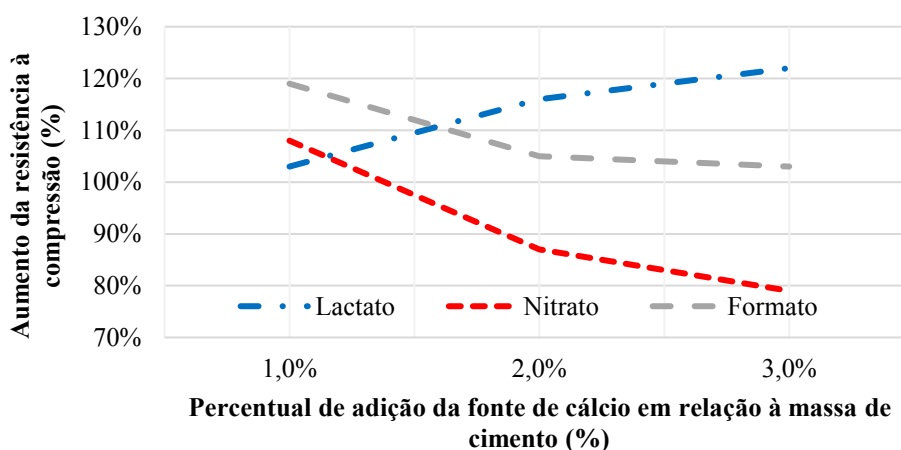
Levando em consideração a importância de se estudar o efeito combinado da adição bacteriana e da fonte de cálcio Xu e Yao (2014) analisaram a incorporação de bactérias

não ureolíticas em conjunto com a adição de uma fonte de cálcio e nutrientes para a autocicatrização de concretos. As fontes de cálcio estudadas foram o glutamato e o lactato de cálcio, os quais foram adicionados em 1% com relação à massa de cimento. Além da adição da fonte de cálcio, os pesquisadores incorporaram 0,055% de extrato de levedura, também em relação à massa de cimento.

Os pesquisadores observaram uma autocicatrização mais efetiva frente a adição combinada de glutamato de cálcio e a bactéria, tanto quando adicionadas na água de amassamento quanto como tratamento de superfície. Entretanto o glutamato de cálcio possui um elevado custo, o que pode inviabilizar o material autocicatrizante. Com relação à resistência à compressão, os pesquisadores observaram um aumento de 3% em relação à referência frente a adição bacteriana e o glutamato de cálcio (XU e YAO, 2014).

A ação combinada de microrganismos e fontes de cálcio também foi estudada por Luo e Qian (2016). Estes pesquisadores avaliaram a adição de lactato de cálcio, formiato de cálcio e nitrato de cálcio juntamente com a incorporação de uma bactéria álcali resistente em argamassas. Os resultados de resistência à compressão aos 28 dias, em comparação com a referência, estão plotados na Figura 24.

Figura 24 – Influência do percentual da fonte de cálcio na resistência à compressão de materiais cimentícios



Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados de Luo e Qian (2016).

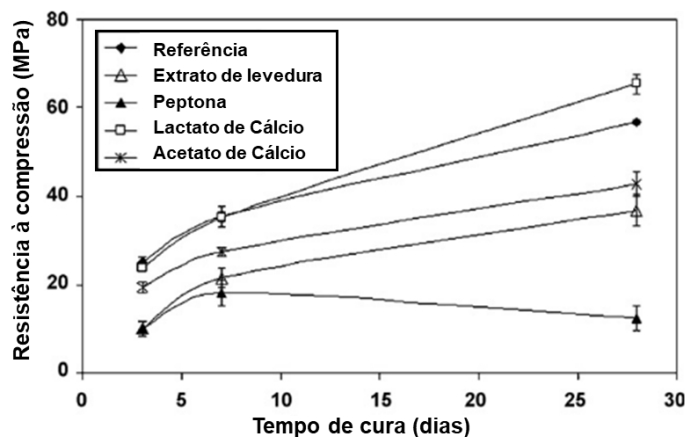
A partir da análise da Figura 24 verificou-se que para a adição de lactato de cálcio, a concentração que resultou na maior resistência à compressão foi de 3%, de formiato e nitrato de cálcio foi de 1% e de nitrato.

Além da resistência à compressão Luo e Qian (2016) estudaram aspectos reológicos das argamassas e verificaram que esta característica foi melhorada frente a adição das fontes de cálcio. A incorporação de agentes de autocicatrização aumentou a fluidez e

influenciou na cinética de hidratação, sendo que o lactato de cálcio retardou as reações de hidratação e o nitrato e formiato de cálcio aceleraram a hidratação.

Jonkers *et al.* (2010) estudaram pastas cimentícias com uma relação água cimento de 0,4 e a adição de 6×10^8 esporos/mL juntamente com diferentes fontes de cálcio. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 25. É importante destacar que a concentração bacteriana foi adicionada em toda a água de amassamento.

Figura 25 – Resultados de resistência à compressão obtidos por Jonkers e colaboradores



Fonte: Adaptado de Jonkers *et al.* (2010).

De acordo com a pesquisa realizada por Jonkers *et al.* (2010), a única fonte de cálcio que proporcionou um aumento na resistência à compressão com relação à referência foi o lactato de cálcio, sendo que o extrato de levedura e a peptona foram as adições que impactaram de maneira mais negativa nas pastas.

Vale destacar que quando se pensa na adição de uma fonte de cálcio, a maior preocupação das pesquisas está no efeito desta na resistência à compressão do material, pois o tratamento é considerado negativo caso prejudique esta propriedade. Por esse motivo, o foco dos artigos relacionados à adição de uma fonte de cálcio é a resistência à compressão. Entretanto a análise da autocicatrização frente a adição da fonte de cálcio também é fundamental e por isso será abordada na sequência.

O Quadro 4 apresenta os estudos que adicionaram uma fonte de cálcio e avaliaram a autocicatrização de materiais cimentícios. Entretanto observa-se que nenhuma das pesquisas citadas analisa diferentes dosagens da fonte de cálcio com relação à variação da autocicatrização, sendo o melhor resultado obtido por Liu *et al.* (2020), com a adição de 2,93% de lactato de cálcio com relação à massa de cimento.

Quadro 4 – Levantamento bibliográfico das fontes de cálcio adicionadas em materiais cimentícios para autocicatrização por adição de bactérias

Fonte de Cálcio	Dosagem (% em relação à massa de cimento)	Fez alguma análise relacionada a autocicatrização	Taxa de autocicatrização (%)	Referência
Lactato de cálcio	2,93	Sim	32% de autocicatrização aos 28 dias	Liu <i>et al.</i> (2020)
	2,0	Sim, por imagem	Não calculou	Luo <i>et al.</i> (2015)
	1,0	Sim, por imagem	Não calculou	Jang <i>et al.</i> (2020)
	1,0	Sim, por velocidade de propagação ultrassônica	10% de autocicatrização aos 30 dias	Xu e Yao (2014)
Glutamato de cálcio	1,0	Sim, por velocidade de propagação ultrassônica	14% de autocicatrização aos 30 dias	Xu e Yao (2014)

Fonte: Elaborado pela autora com base nas referências citadas.

Dentre as pesquisas levantadas, Liu e colaboradores (2020) analisaram a capacidade de autocicatrização da bactéria *B. pasteurii* adicionada em $2,8 \times 10^9$ células/mL, com lactato de cálcio. Estes pesquisadores observaram uma taxa de autocicatrização de 32% aos 28 dias. Entretanto a bactéria pode continuar atuando na precipitação de CaCO_3 durante períodos maiores, os quais devem ser analisados. Vale destacar que a taxa de autocicatrização foi calculada com base na espessura inicial das fissuras e a variação desta espessura durante o tempo de análise.

Luo *et al.* (2015) analisaram a adição de bactérias alcali resistentes em pastas cimentícias com a adição de 2% de lactato de cálcio no momento da mistura e observaram, por imagem, a autocicatrização das fissuras completas em até 80 dias. Entretanto estes pesquisadores não utilizaram nenhuma técnica para realizar o cálculo da taxa de autocicatrização.

Jang *et al.* (2020), por sua vez, estudaram o efeito da adição de esporos liofilizados em argamassas com 1% de lactato de cálcio com relação à massa de cimento. Estes pesquisadores observaram a autocicatrização das fissuras ao longo do tempo de análise, por imagem, entretanto também não calcularam a taxa de autocicatrização.

Xu e Yao (2014) estudaram a incorporação da bactéria *B. cohnii* na água de amassamento e como tratamento de superfície de argamassas, na concentração de 10^7 células/mL com a suplementação de glutamato de cálcio ou lactato de cálcio em 1%, com relação à massa de cimento, submetida a diferentes condições de exposição. Estes pesquisadores observaram taxas de autocicatrização de 10 e 14%, ocasionadas pela adição de

lactato e glutamato de cálcio, respectivamente. A taxa de autocicatrização analisada pelos pesquisadores foi calculada a partir da velocidade de propagação de onda ultrassônica.

Como pode-se observar, várias fontes de cálcio podem ser utilizadas para que a bactéria possa precipitar os cristais de CaCO_3 e desta forma autocicatrizas as fissuras. Dentre as fontes de cálcio estudadas, o lactato de cálcio se destaca por ser a fonte de cálcio com o melhor custo-benefício. Na sua atuação em conjunto com as bactérias, a adição de 3% em relação à massa de cimento se apresentou mais eficaz nos estudos realizados por Luo e Qian (2016). Além disso a adição de 2,93% de lactato também resultou em uma autocicatrização de 32% em estudos relatados por Liu *et al.* (2020).

De acordo com Xu e Yao (2014), fontes de cálcio distintas podem resultar em diferentes eficiências na autocicatrização, pois esta é relacionada com a cinética das reações bioquímicas. Estes pesquisadores ainda complementam que a fonte de cálcio pode influenciar na morfologia do CaCO_3 , pois a partir da adição de lactato de cálcio foi verificada uma maior incidência de cristais de calcita e com a adição de glutamato de cálcio de varita.

Os pesquisadores De Muynck *et al.*, (2008 e 2010) também observaram diferentes morfologias de CaCO_3 frente a variação da fonte de cálcio utilizada e a bactéria adicionada.

2.1.8 Morfologia do CaCO_3 precipitado por bactérias

A morfologia do cristal precipitado sofre interferências das condições ambientais em que as bactérias estão inseridas (BRAISSANT *et al.*, 2003). Normalmente a análise da morfologia dos cristais de carbonato de cálcio é avaliada por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), que tem capacidade de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. Para a confirmação de que a amostra é de CaCO_3 utiliza-se, junto ao MEV um Sistema de Energia Dispersiva (EDS), que determina os elementos químicos presentes na amostra.

Nesta técnica a imagem é formada pela incidência de um feixe de elétrons na superfície da amostra, que promove a emissão de elétrons secundários e retroespalhados. A imagem representa em tons de cinza a contagem destes elétrons secundários e retroespalhados, emitidos pelo material analisado (DUARTE *et al.*, 2003).

É importante destacar que na natureza, o carbonato de cálcio pode ser encontrado em três diferentes estruturas cristalinas: calcita, aragonita e varita, sendo a calcita

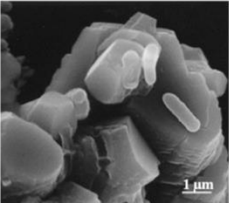
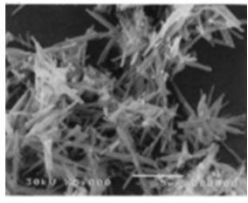
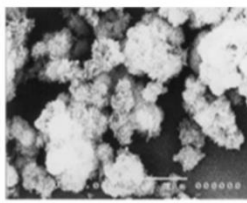

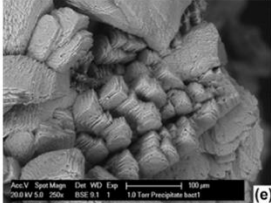
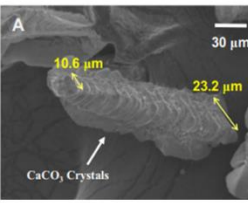
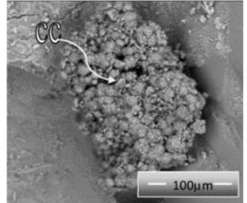
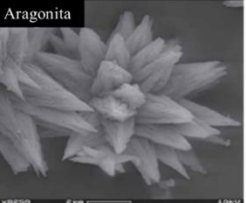
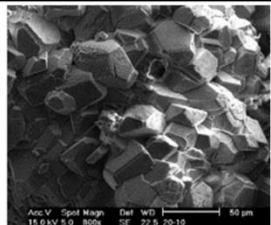
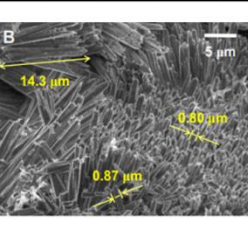
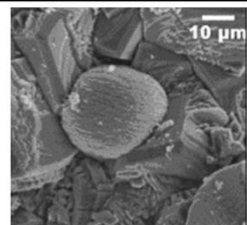
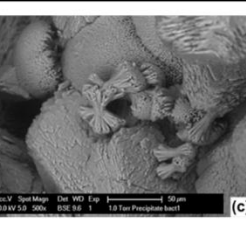
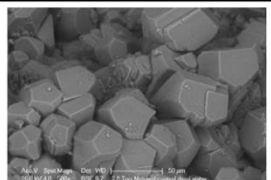
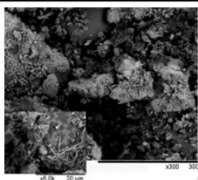
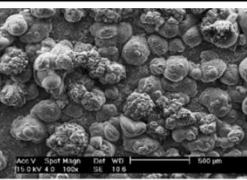
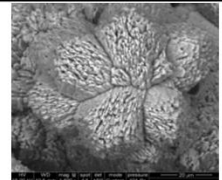
sua forma mais estável em condições ambientais (CHONG e SHEIKHOLESLAMI, 2001; XIANG *et al.*, 2002; WEN *et al.*, 2003).

Como a calcita é a forma mais estável do CaCO_3 o processo de precipitação de carbonato de cálcio por vias metabólicas bacterianas também pode ser chamado de Mineralização de Calcita Biologicamente Induzida (ACHAL *et al.*, 2015), sendo que os artigos que abordam sobre a autocicatrização comumente encontram o carbonato de cálcio na forma de calcita (TIANO *et al.*, 1999; RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; BACHMEIER *et al.*, 2002; DE MUYNCK *et al.*, 2008; JONKERS E SCHLANGEN, 2008; CHUNXIANG *et al.*, 2009; OKWADHA e LI, 2010; WIKTOR e JONKERS, 2011; ACHAL *et al.*, 2010; CHAHAL *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2012; ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013; PEI *et al.*, 2013; SCHLANGEN e SANGADJI, 2013; ACHAL *et al.*, 2013; CHAHAL e SIDDIQUE, 2013; XU e YAO, 2014; LUO *et al.*, 2015; KRISHNAPRIYA *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2017) e em poucos casos encontram varita (DE MUYNCK *et al.*, 2008; CHUNXIANG *et al.*, 2009; OKWADHA e LI, 2010; DHAMI *et al.*, 2013; XU e YAO, 2014; DASKALAKIS *et al.*, 2019) e aragonita (WIKTOR e JONKERS, 2011; DHAMI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019).

De acordo com Justo-Reinoso e colaboradores (2021) vários fatores influenciam na forma de precipitação do CaCO_3 , tais como: o pH, a concentração de cálcio adicionada e a fonte de cálcio utilizada, a bactéria adicionada e a disponibilidade de locais de nucleação.

As Figuras 26 e 27 foram elaboradas para ilustrar os polimorfos encontrados em várias pesquisas da área de autocicatrização com adição de bactérias. Nela pode-se observar cristais de forma cúbica, em vara ou agulha, esférica e em formato de flor.

Figura 26 – Morfologia dos polimorfos de CaCO₃ encontrados na literatura (continua)

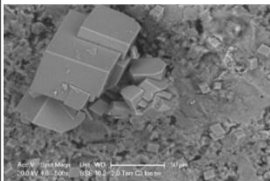
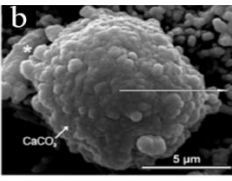
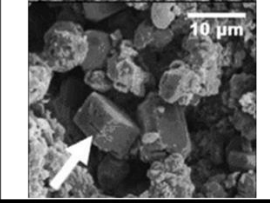
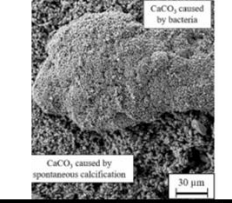
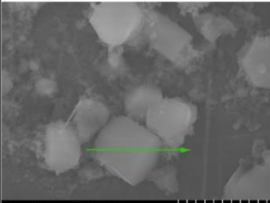
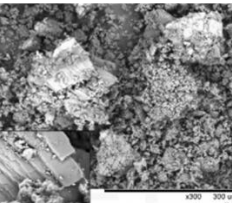
Polimorfismo do Carbonato de cálcio (CaCO ₃)				
Forma	Cúbica	Vara	Esfera	Flor
Imagens, polimorfos e referências				
	Calcita (Achal <i>et al.</i> , 2015)	Aragonita (Konno <i>et al.</i> , 2002)	Calcita (Konno <i>et al.</i> , 2002)	Varita (Dhami <i>et al.</i> , 2013)
				
	Calcita (Wiktor e Jonkers, 2011)	Aragonita (Zhang <i>et al.</i> , 2019)	Calcita (Abo-El-Enein <i>et al.</i> , 2013)	Aragonita (Dhami <i>et al.</i> , 2013)
				
	Calcita (De Muynck <i>et al.</i> , 2010)	Aragonita (Zhang <i>et al.</i> , 2019)	Calcita (De Muynck <i>et al.</i> , 2008)	Aragonita (Wiktor e Jonkers, 2011)
				
Calcita (Schlangen e Sangadji, 2013)	Aragonita (Stuckrath <i>et al.</i> , 2014)	Calcita (De Muynck <i>et al.</i> , 2010)	Varita (Choi <i>et al.</i> , 2017)	

Fonte: Autora.

Conforme pode-se visualizar na Figura 26, a calcita é mais encontrada na forma esférica ou cúbica, a aragonita é caracterizada por cristais esbeltos e alongados (vara), e a varita é encontrada na forma de flor. Vale destacar que os cristais de aragonita também pode-se apresentar na forma de flor, a partir da junção de vários cristais em forma de vara.

Como a calcita é a mais encontrada por ser a forma mais estável, a Figura 27 ilustra mais algumas imagens de cristais de calcita precipitados na forma cúbica e esférica.

Figura 27 – Morfologia dos polimorfos de CaCO₃ encontrados na literatura (continuação)

Polimorfismo do Carbonato de cálcio (CaCO ₃)		
Forma	Cúbica	Esfera
Imagens, polimorfos e referências		
	Calcita (Schlangen e Sangadji, 2013)	Calcita (Schwantes-Cezario <i>et al.</i> , 2017)
		
	Calcita (De Muynck <i>et al.</i> , 2008)	Calcita (Ryparova <i>et al.</i> , 2021)
		
Calcita (Pei <i>et al.</i> , 2013)	Calcita (Stuckrath <i>et al.</i> , 2014)	

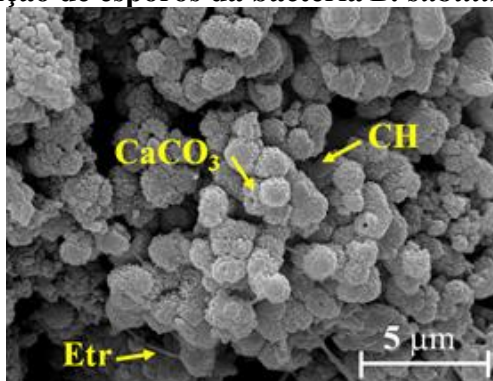
Fonte: Autora.

Além disso a temperatura em que as bactérias estiverem submetidas pode influenciar na estrutura cristalina do CaCO₃, mas a tendência é que este cristal seja encontrado com maior frequência na sua forma mais estável (calcita). Konno *et al.* (2002) verificaram diferentes morfologias de CaCO₃ precipitados em diferentes temperaturas e observou que a temperaturas de 25°C a formação de calcita era predominante, enquanto na temperatura de 50°C a aragonita foi mais frequente.

Vale destacar que a análise por MEV nos estudos de autocicatrização de materiais cimentícios é frequente, pois a partir das imagens pode-se analisar a morfologia do CaCO₃ e também verificar o fechamento de poros e fissuras nestes materiais. Schwantes-Cezario *et al.* (2017) estudaram a precipitação *in vitro* pela mudança de pH da bactéria *B. subtilis* AP91 no meio de precipitação B4. Os pesquisadores observaram a formação de cristais de CaCO₃ com características esféricas aglomeradas maiores que 5µm, com elevados picos de cálcio no EDS.

Após o estudo *in vitro* Schwantes-Cezario *et al.* (2019) adicionaram a mesma bactéria, na concentração de 10^5 esporos/mL, na água de amassamento de uma argamassa básica e observaram cristais de CaCO_3 com a mesma morfologia do estudo *in vitro* (Figura 27), conforme apresentado na Figura 28. Vale destacar que a seta indicada com CH se refere ao hidróxido de cálcio e Etr a etringita.

Figura 28 – CaCO_3 precipitado pela mudança de pH em uma argamassa básica por meio da adição de esporos da bactéria *B. subtilis* AP91

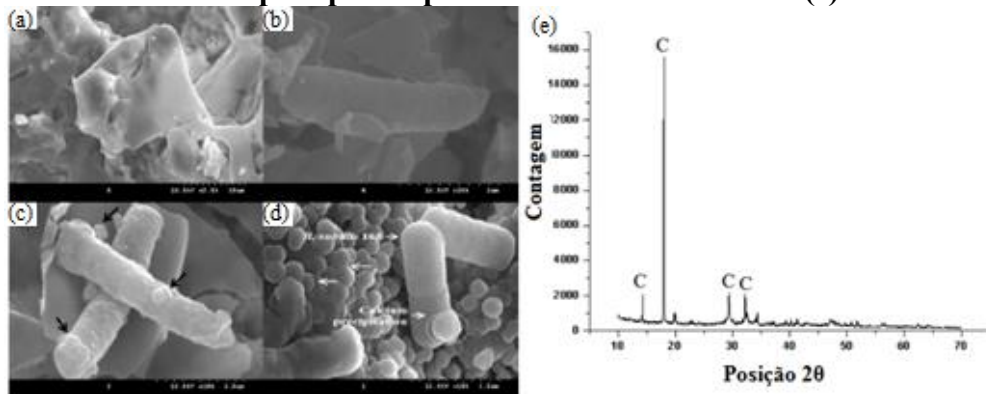


Fonte: SCHWANTES-CEZARIO *et al.* (2019).

Porém observou-se que a precipitação da bactéria *B. subtilis* AP91 no material cimentício ocorreu em maior quantidade e menor tamanho, mas com a mesma morfologia do apresentado *in vitro*. Mostrando que a alteração do meio em que a bactéria estava inserida tiveram capacidade de influenciar no tamanho do cristal precipitado, mas não na sua morfologia (SCHWANTES-CEZARIO *et al.* 2019).

Além destes autores, Park *et al.* (2012) também realizaram estudos *in vitro* com a bactéria *B. cereus* e *B. subtilis* 168 no meio de cultivo B4. Os pesquisadores utilizaram dois controles, primeiramente apenas o meio de cultivo, sem bactéria (Figura 29a) e o meio de cultivo com o inóculo da bactéria *E. coli*, que não precipita cristais (Figura 29b). Na sequência tem-se as bactérias testadas quanto à precipitação de CaCO_3 : *B. cereus* (Figura 29c) e *B. subtilis* (Figura 29d) e o difratograma do material precipitado pela bactéria *B. subtilis* 168 (Figura 29e).

Figura 29 – Análise da precipitação de CaCO_3 no meio de cultivo B4: apenas o meio de cultivo (a); inóculo das bactérias *E. coli* (b), *B. cereus* (c) e *B. subtilis* 168 (d) e o DRX da calcita precipitada pela bactéria *B. subtilis* 168 (e)

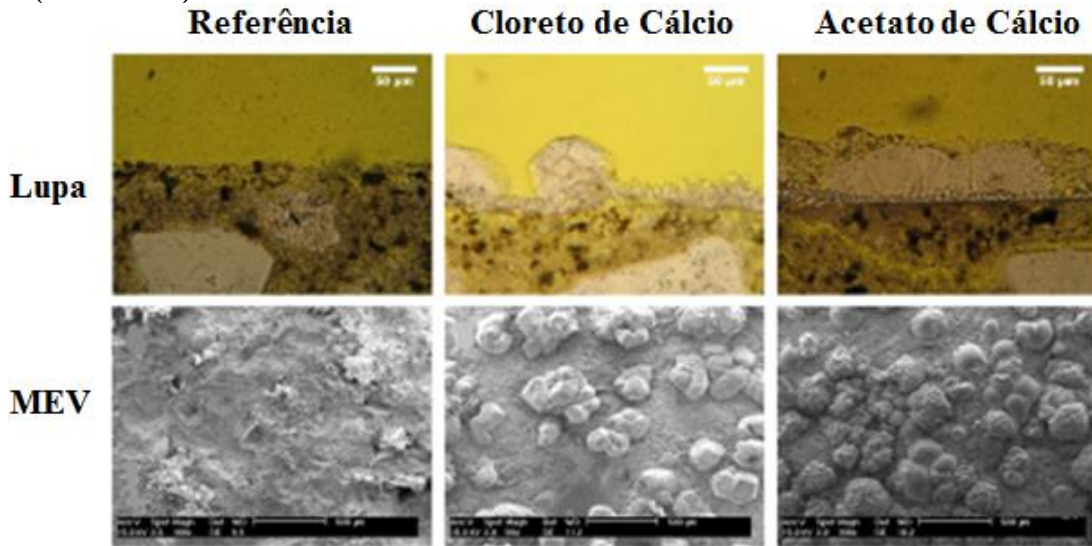


Fonte: Adaptado de Park *et al.* (2012).

A partir da análise das imagens, os pesquisadores verificaram que a bactéria *B. subtilis* tem maior capacidade de precipitação de CaCO_3 no meio B4, quando comparada à *B. cereus*. Além disso os autores comprovaram a precipitação de calcita (C) por Difração de Raio X (Figura 29e). A partir da análise da morfologia da calcita, observou-se também estruturas arredondadas, mas de menor tamanho do que o apresentado por Schwantes-Cezario *et al.* (2017).

Além do MEV, autores utilizam imagens de estereoscópio para analisar os cristais de carbonato de cálcio precipitado por bactérias nos materiais cimentícios. De Muynck *et al.* (2008), por exemplo, utilizaram a bactéria ureolítica *B. sphaericus* na concentração de 10^7 esporos/mL, adicionando essa bactéria como um tratamento de superfície, a partir da imersão das amostras em duas soluções, uma contendo a bactéria com cloreto de cálcio e outra com acetato de cálcio. Os resultados da análise por estereoscópio e MEV podem ser visualizados na Figura 30.

Figura 30 – MEV e estereoscópio do tratamento de superfície de amostras sem bactérias (referência) e com bactéria tratadas com cloreto de cálcio e acetato de cálcio.



Fonte: Muynck *et al.* (2008).

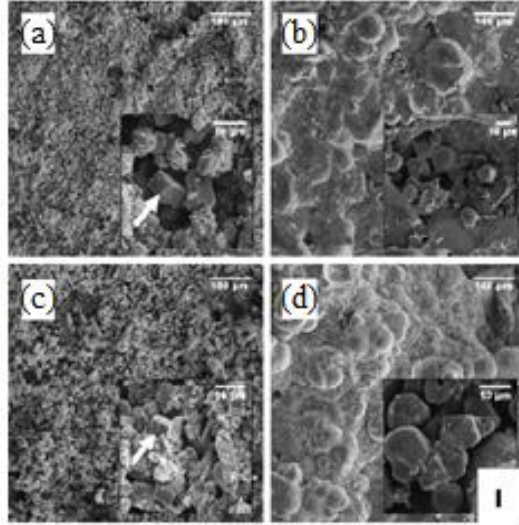
Pode-se observar que nas imagens da amostra de referência (sem adição de bactéria) não houve a precipitação de cristais. As amostras com adição de *B. sphaericus* na concentração de 10^7 esporos/mL a precipitação ocorreu, tanto para a adição com cloreto de cálcio quanto para adição com acetato de cálcio. Porém verificou-se que as amostras com acetato de cálcio precipitaram CaCO_3 de uma forma mais densa e homogênea ao longo de toda superfície, quando comparada a amostra contendo cloreto de cálcio (MUYNCK *et al.* 2008).

Zhang *et al.* (2019) verificaram a formação de calcita e aragonita a partir da incorporação da bactéria não ureolítica *B. cohnii* em concretos com a adição de duas fontes de cálcio: lactato de cálcio e nitrato de cálcio. Vale destacar que os pesquisadores observaram uma incidência maior de cristais de aragonita do que de calcita.

De acordo com Zhang *et al.* (2019) a morfologia cristalina da precipitação mineral caracterizou-se em cristais romboédricos lamelares, maços na forma de agulha e partículas cúbicas irregulares, morfologias típicas de aragonita nas duas primeiras situações e calcita na última.

Além destes pesquisadores, De Muynck *et al.* (2008) utilizaram a bactéria *B. sphaericus* na concentração de 10^7 esporos/mL para analisar a precipitação de CaCO_3 em diferentes meios de imersão. A Figura 31 ilustra os resultados obtidos na pesquisa, onde em (a) a bactéria *B. sphaericus* está em meio contendo cloreto de cálcio, em (b) em cloreto de cálcio com nutrientes, em (c) com acetato de cálcio e em (d) com acetato de cálcio e nutrientes.

Figura 31 – Precipitação de CaCO₃ promovida por *B. sphaericus* (a-d)



Fonte: Muynck *et al.* (2008).

Pode-se observar que houve a precipitação de cristais de CaCO₃ em todas as amostras, independente das adições que elas continham, apresentando apenas variações de morfologia ocasionadas pela mudança no meio em que elas estavam inseridas. De acordo com Zhang *et al.* (2019) ainda não está clara a real influência dos diferentes meios na produção de polimorfos de CaCO₃ distintos e se esses diferentes polimorfos podem apresentar diferentes potenciais de autocicatrização.

É importante destacar que a concentração em que as células bacterianas são incorporadas nos materiais cimentícios também podem ter influência na quantidade de CaCO₃ precipitado e nas propriedades dos materiais cimentícios, como a resistência à compressão, absorção de água, porosidade e taxa de autocicatrização.

2.2 A INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE BACTÉRIAS EM MATERIAIS CIMENTÍCIOS

As bactérias podem influenciar em diversas propriedades dos materiais cimentícios (ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013). A principal característica que se busca a partir desta adição é a diminuição da porosidade e fechamento de fissuras em concretos e argamassas, entretanto a resistência à compressão também pode sofrer influência.

2.2.1 Concentração de bactérias adicionadas aos materiais cimentícios

As bactérias podem ser adicionadas aos materiais cimentícios em diferentes concentrações, as quais podem interferir em algumas propriedades, principalmente no estado endurecido (JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). As concentrações adicionadas variam consideravelmente na literatura ($10^3 - 10^9$ células/mL), sendo que as mais estudadas estão 10^3

e 10^7 células/mL. Além da concentração a forma de adição destes microrganismos nos materiais cimentícios também pode variar, sendo que esta pode ser feita no amassamento, por aspersão ou imersão em solução contendo as bactérias.

O Quadro 5 apresenta um resumo dos dados dos artigos que serão apresentados na sequência, vale ressaltar que em todos os artigos apresentados neste quadro a adição das concentrações foi realizada na água de amassamento.

Quadro 5 – Estudos realizados sobre a concentração bacteriana adicionada aos materiais cimentícios

Referência	Bactéria estudada	Concentração adicionada	Condição de cura	Ensaio realizado
Ramachandran <i>et al.</i> (2001)	<i>S. pasteurii</i>	$2,6 \times 10^7$, $5,2 \times 10^7$ e $2,6 \times 10^8$ esporos/mL	Imerso em Ureia- CaCl_2 em temperatura ambiente	Resistência à compressão, MEV e DRX
Ghosh <i>et al.</i> (2005)	<i>Shewanella</i>	10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 células/mL	Cura ao ar em temperatura ambiente (+/-30°C)	Resistência à compressão e MEV
Ghosh <i>et al.</i> (2009)	<i>Shewanella</i>	10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 células/mL	Cura ao ar em temperatura ambiente (+/-30°C)	Resistência à compressão, MEV, DRX
Reddy <i>et al.</i> (2010)	<i>B. subtilis</i>	10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 células/mL	Imerso em água	Resistência à compressão e à tração, durabilidade à ataque ácido e MEV
Chahal <i>et al.</i> (2012)	<i>S. pasteurii</i>	10^3 , 10^5 e 10^7 células/mL	Imerso em água	Resistência à compressão, absorção de água, permeabilidade rápida e MEV
Chahal e Siddique (2013)	<i>S. pasteurii</i>	10^3 , 10^5 e 10^7 células/mL	Imerso em água	Resistência à compressão, DRX e MEV
Abo-El-Enein <i>et al.</i> (2013)	<i>S. pasteurii</i>	$3,34 \times 10^7$, $5,59 \times 10^7$ e $1,49 \times 10^8$	Referência imerso em água e bactéria imerso em solução de Ureia- CaCl_2	Resistência à compressão, absorção de água, MEV e DRX
Mondal e Ghosh (2018)	<i>B. subtilis</i>	10^3 , 10^5 e 10^7 células/mL	27°C imerso em água	Resistência à compressão, absorção de água, autocicatrização de fissuras, MEV e DRX
Chen <i>et al.</i> (2018)	<i>S. pasteurii</i>	10^7 , 10^8 e 10^9 células/mL	Imerso em água saturada com cal	Resistência à compressão
Jena <i>et al.</i> (2020)	<i>B. subtilis</i>	10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células/mL	Imerso em água	Resistência à compressão, resistência à tração, resistência à flexão e MEV
Algaifi <i>et al.</i> (2020)	<i>S. pasteurii</i>	5×10^6 , 10^7 , 2×10^7 e 10^8 células/mL	Imerso em água	Resistência à compressão, acompanhamento da fissura em estereoscópio, MEV e EDS

Fonte: Autora.

Ramachandran *et al.* (2001) estudaram argamassas com adição da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em três concentrações: $3,0 \times 10^7$; $6,0 \times 10^7$ e $1,8 \times 10^8$ esporos/mL. Os microrganismos foram adicionados na água de amassamento das argamassas, que foram

curadas por imersão em solução com ureia e cloreto de cálcio. Como resultado, os pesquisadores observaram que a resistência à compressão diminuiu com a primeira concentração estudada e teve um pico na concentração intermediária.

Abo-El-Enein *et al.* (2013) adicionaram a bactéria *S. pasteurii* nas concentrações de $3,34 \times 10^7$, $5,59 \times 10^7$ e $1,49 \times 10^8$ esporos/mL em argamassas e observaram um pico na resistência à compressão na concentração intermediária.

Ghosh *et al.* (2005 e 2009) utilizaram as concentrações de 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 células/mL da bactéria *Shewanella* e obtiveram um aumento de resistência à compressão de até 25% e a maior redução da porosidade aos 28 dias, com a adição da concentração de 10^5 células/mL.

A concentração de 10^5 também se apresentou ideal no estudo realizado por Reddy *et al.* (2010) e Jena *et al.* (2020), com a bactéria *B. subtilis* na água de amassamento de um concreto. O mesmo resultado foi encontrado por Chahal *et al.* (2012) e Chahal e Siddique (2013), os quais avaliaram as concentrações de 10^3 , 10^5 e 10^7 células/mL mostraram melhores resultados de resistência à compressão, absorção de água e permeabilidade rápida de cloretos, com a concentração de 10^5 células/mL.

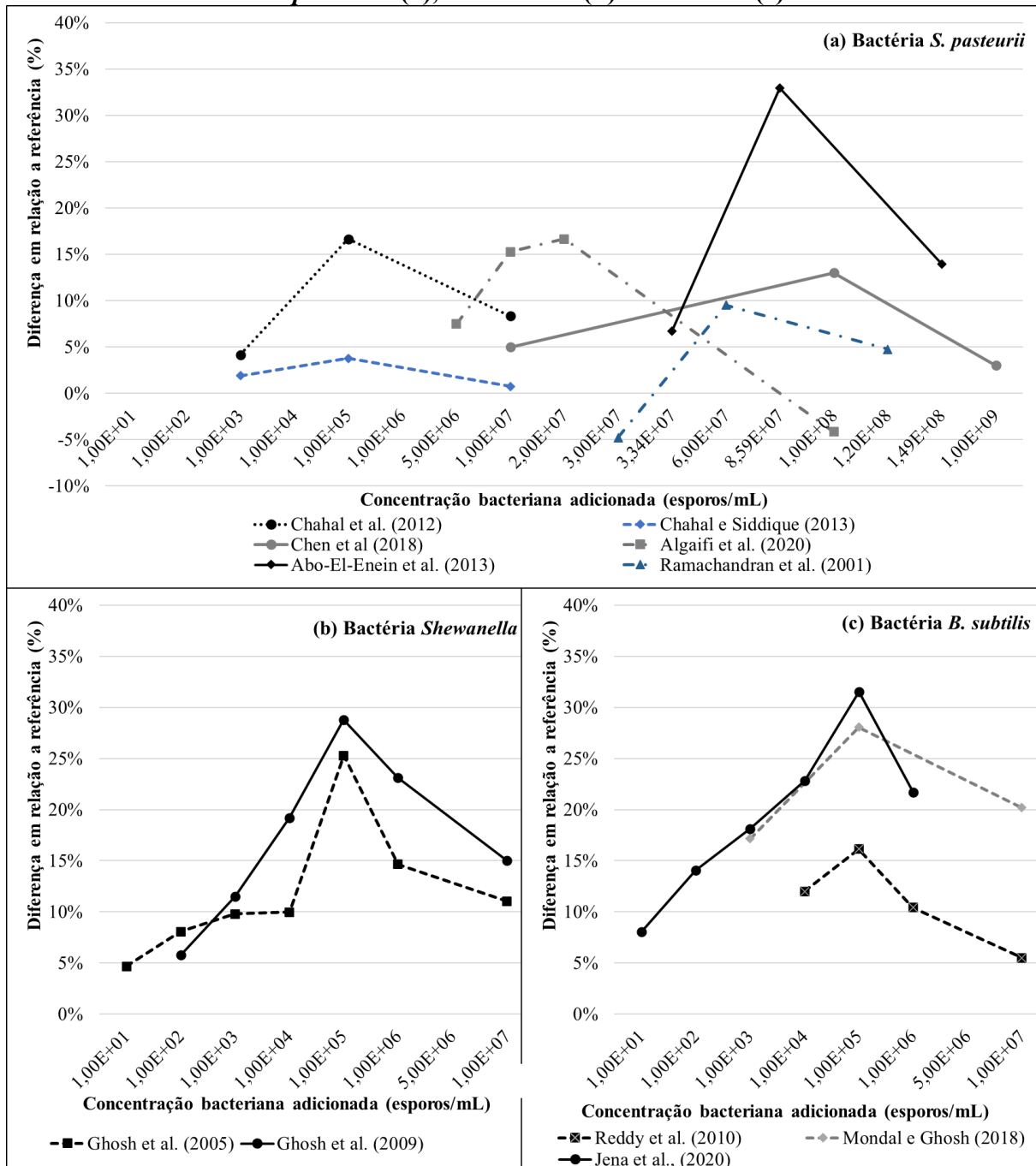
Além destes autores, Mondal e Ghosh (2018) ensaiaram argamassas a compressão e absorção de água, variando a concentração de *B. subtilis* adicionada na água de amassamento em: 10^3 , 10^5 e 10^7 células/mL. Estes pesquisadores obtiveram que a concentração de 10^5 esporos/mL apresentou o melhor resultado para a resistência à compressão, enquanto para absorção de água o melhor resultado foi obtido com a adição de 10^7 esporos/mL.

No mesmo ano Chen *et al.* (2018) estudaram a adição da bactéria *Sporosacina pasteurii* nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 células/mL e verificaram que a concentração que apresentou o melhor resultado na resistência à compressão foi a de 10^8 células/mL.

A mesma bactéria foi estudada por Algaiifi *et al.* (2020), em concretos, nas concentrações de 5×10^6 , 10^7 , 2×10^7 e 10^8 células/mL. Estes pesquisadores observaram que o melhor resultado de resistência foi obtido na concentração de 2×10^7 células/mL.

Os resultados da resistência à compressão aos 28 dias de cura obtidos nas pesquisas descritas anteriormente foram sintetizados nos gráficos apresentado na Figura 32, separados por bactéria. Para gerar o gráfico foram calculados os percentuais de aumento ou diminuição da resistência à compressão de cada pesquisa, frente às diferentes concentrações bacterianas, com relação às suas respectivas referências.

Figura 32 – Percentual de aumento ou diminuição da resistência à compressão das amostras com relação à referência em diferentes concentrações com a adição da bactéria *S. pasteurii* (a), *Shewanella* (b) e *B. subtilis* (c)



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da análise da Figura 32, verificou-se que diferentes intervalos de concentração foram estudados por diversos pesquisadores. Os estudos que variaram a concentração bacteriana entre 10^1 e 10^7 esporos/mL verificaram um pico na resistência à compressão na concentração de 10^5 esporos/mL.

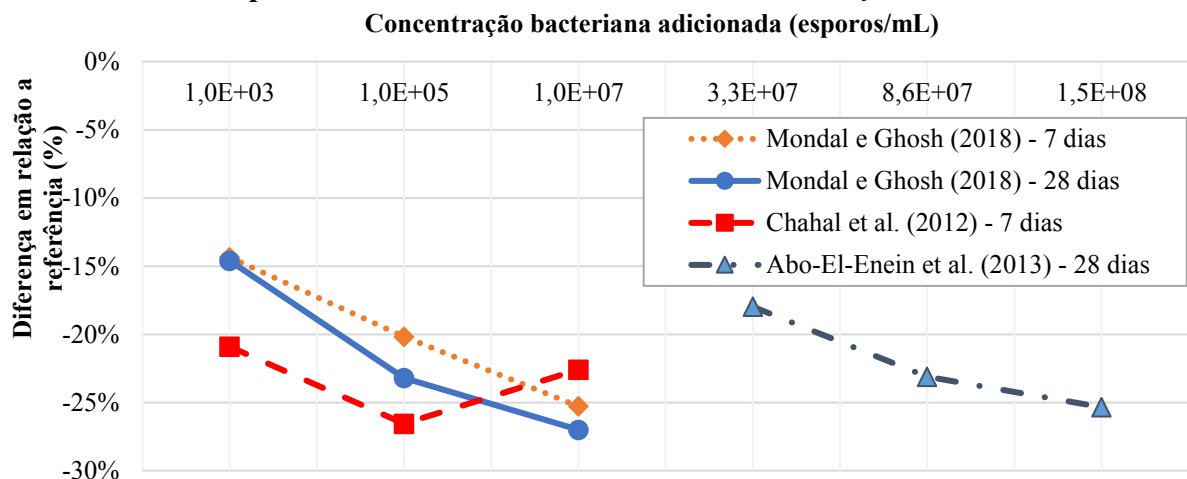
Em contrapartida, Okwadha e Li (2010) realizaram testes *in vitro* com a bactéria *Sporosarcina pasteurii* e obtiveram que a concentração ideal para potencializar a precipitação de CaCO_3 foi de 10^8 células/mL. Além destes pesquisadores, Zhang *et al.* (2016) investigaram a influência da concentração de esporos e *Bacillus sp.* na precipitação de carbonato de cálcio *in vitro* e o resultado da pesquisa mostrou que é necessária uma concentração de 10^7 esporos/mL para que a precipitação de CaCO_3 seja efetiva e apresente resultados significativos.

Ramachandran *et al.* (2001), Abo-El-Enein *et al.* (2013), Chen *et al.* (2018) e Algaifi *et al.* (2020) estudaram concentrações maiores (entre 5×10^6 e 10^9 células/mL) e verificaram um aumento máximo na resistência à compressão frente à adição das concentrações intermediárias. Esses resultados apontam que diferentes bactérias podem resultar em diferentes comportamentos frente a aplicação em materiais cimentícios, os quais podem ser atribuídos a diversos fatores, como por exemplo adição de meio de cultivo, fonte de cálcio, relação a/c, entre outros.

Além disso vale lembrar que o objetivo principal da adição bacteriana nos materiais cimentícios é a autocatrização de fissuras e fechamento de poros, a melhoria do desempenho mecânico é uma consequência (MORS e JONKERS, 2019). Entretanto pela importância desta propriedade a mesma deve ser estudada.

Além do estudo da resistência à compressão uma análise que é realizada com frequência e que reflete na porosidade de materiais cimentícios é a absorção de água. A Figura 33 ilustra os resultados apresentados na literatura que estudaram a absorção de água frente a diferentes concentrações bacterianas.

Figura 33 – Percentual de diminuição da absorção de água das amostras com relação às suas respectivas referências nas diferentes concentrações estudadas



Fonte: Elaborado pela autora.

Mondal e Ghosh (2018) e Abo-El-Enein *et al.* (2013) observaram a mesma tendência de diminuição da absorção de água frente ao aumento da concentração bacteriana, fato que também corrobora com estudos realizados *in vitro* (Zhang *et al.*, 2016). Apenas o estudo realizado por Chahal *et al.* (2012) verificou uma diminuição mais significativa na absorção de água frente a adição de 10^5 células/mL.

Além do ensaio de absorção de água e índice de vazios, a Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM) pode ser realizada. Essa técnica experimental destrutiva tem sido utilizada para caracterizar aspectos morfológicos de materiais e permite a apresentação da distribuição do tamanho de poros (GREGG & SING, 1982).

O mercúrio, por ser um fluido não molhante, não penetra espontaneamente em poros abertos ou fissuras dos materiais analisados, ao menos que se aplique uma pressão sobre ele (SCHMITT, 2009). Desta forma, por meio da aplicação de pressão o mercúrio adentra em poros cada vez menores e a partir da pressão o tamanho de poro é quantificado de acordo com a Equação 16 (Equação de Washburn):

$$D = \frac{-4*\gamma \cos\theta}{P} \quad \text{Eq. 16}$$

Onde:

- D é o diâmetro do poro;
- P é a pressão necessária para que o mercúrio adentre naquele tamanho de poro;
- γ é a tensão superficial e;
- θ é o ângulo de contato entre o mercúrio e a parede do poro.

Desta maneira, frente ao aumento da pressão e quantificação do mercúrio intrudido a curva da porosimetria é desenhada. De acordo com Porcheron & Monson (2004) este método de cálculo da porosidade traduz as pressões aplicadas em valores de distribuição de tamanho de poros do material.

É importante destacar que os resultados de PIM precisam ser avaliados com cautela, pois como o equipamento quantifica a intrusão cumulativa de mercúrio sob pressão, com o aumento da pressão, o mercúrio pode acessar poros menores. Entretanto nos materiais cimentícios pode-se ter poros maiores que são acessados apenas por capilares, o que pode influenciar na quantificação da porosidade, levando a uma interpretação errônea. Além disso é possível haver uma interligação dos poros fechados devido à destruição das paredes dos poros capilares durante a intrusão, ocasionada pelo aumento da pressão (DIAMOND, 2000; MATTANA JR, 2010).

Ghosh *et al.* (2005) avaliaram a distribuição dos poros em argamassas com adição de diferentes concentrações da bactéria *Shewanella* e observou que frente a adição dos microrganismos houve uma diminuição dos poros, sendo que a menor intrusão acumulativa foi observada a partir da adição de 10^5 células/mL.

Xu e Wang (2018) avaliaram argamassas com adição de bactérias juntamente com nitrato de cálcio e ureia e observaram uma diminuição da quantidade de poros frente ao tratamento bacteriano, principalmente na faixa de 0,01 a 0,6 μm . Uma diminuição no tamanho de poros também foi observada em uma pesquisa anterior frente a adição da bactéria *B. subtilis* AP91 (SCHWANTES-CEZARIO *et al.*, 2020).

Além destes pesquisadores De Muynck *et al.* (2010) realizaram estudos de PIM em amostras de calcário com adição de bactérias a partir da imersão das amostras em culturas crescidas de *Bacillus sphaericus* durante um dia de idade e observou que após esse período de exposição não houve diferenças significativas entre a PIM das amostras com e sem o tratamento com bacteriano. Entretanto a precipitação de cristais através da adição bacteriana pode levar mais tempo para ocorrer e, por esse motivo, a análise em períodos maiores é fundamental.

Frente às divergências apresentadas na literatura e também ao fato de que cada bactéria pode se comportar de uma maneira diferente quando adicionada aos materiais cimentícios, é de substancial importância o estudo da concentração bacteriana a ser aplicada a estes materiais para que se obtenha a maior precipitação de CaCO_3 e como consequência o maior fechamento de poros e fissuras.

Outro fator que pode influenciar na precipitação de CaCO_3 por ação bacteriana são as condições ambientais em que o material cimentício estará submetido, por esse motivo a condição de exposição também precisa ser estudada.

2.3 CONDIÇÕES DE CURA E DE EXPOSIÇÃO

De acordo com Neville e Brooks (2013) a cura dos materiais cimentícios é o nome dado aos procedimentos realizados para promover a hidratação do cimento e consequentemente o desenvolvimento de sua resistência. Desta forma, as condições de cura podem influenciar de forma direta nas propriedades de materiais cimentícios, principalmente relacionadas a porosidade e a resistência mecânica.

Quando as bactérias são adicionadas aos materiais cimentícios para que atuem na autocicatrização, existem diversos parâmetros que podem influenciar na precipitação de

CaCO₃ e na autocicatrização (OKWADHA e LI, 2010). A condição de exposição que as amostras estiverem em contato é um destes parâmetros, pois dependendo do ambiente em que a bactéria estará submetida, a autocicatrização pode ser maior ou menor. Sendo assim, entender a influência das condições de exposição na autocicatrização de fissuras por adição de bactérias é fundamental.

De acordo com Justo-Reinoso *et al.*, (2021) diferentes condições ambientais podem ser encontradas em todo o mundo, as quais inevitavelmente afetarão a germinação, o crescimento e a capacidade de precipitação de CaCO₃ por ação bacteriana.

Existem autores que separam os estudos em condição de cura e condição de exposição após a fissuração, mas nem todos os trabalhos fazem esta distinção. Vale destacar que a condição de cura é aquela em que as amostras são submetidas nas primeiras idades para garantir as propriedades mecânicas e a condição de exposição está relacionada com a exposição do material até as idades de ensaio, a qual normalmente ocorre após a fissuração em análises laboratoriais.

Para a redação deste tópico várias buscas exploratórias foram realizadas com o foco na adição de bactérias para melhoria do desempenho de materiais cimentícios. Estas buscas resultaram em um portfólio de 83 artigos, dos quais 14 eram de revisão e 69 realizaram procedimentos experimentais.

Dos artigos de revisão levantados apenas Zhang *et al.* (2020) apresentou um levantamento bibliográfico sobre diferentes condições de cura e de exposição que foram avaliadas por diferentes autores. Zhang e colaboradores dividiram estas condições de cura em estágio inicial e estágio de cicatrização (condição de exposição) (Figura 34).

Figura 34 – Condições de cura levantadas no estudo de Zhang e colaboradores



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2020).

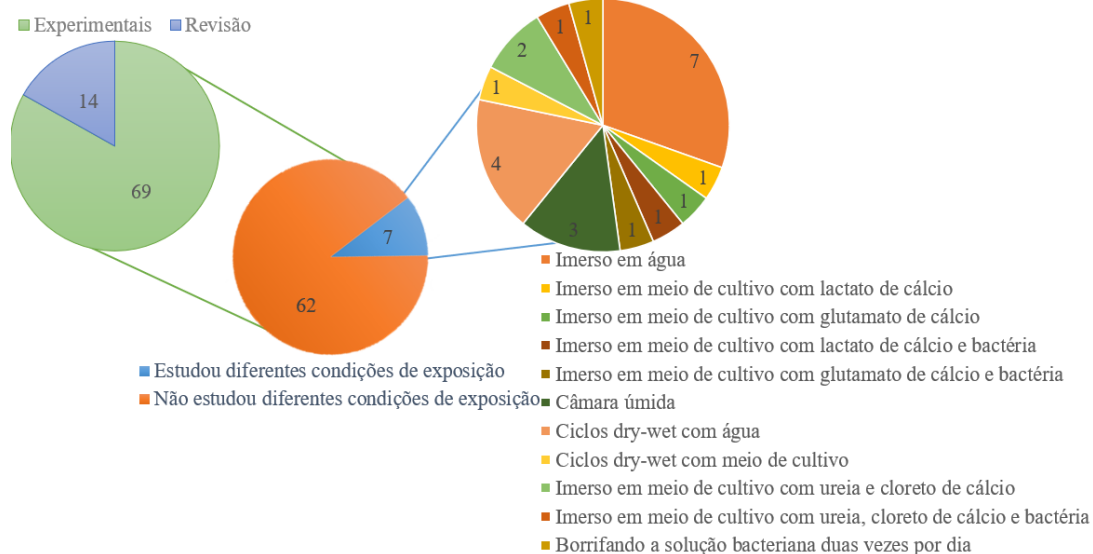
De acordo com os pesquisadores, as diferentes condições de cura e de exposição são fundamentais para avaliar os efeitos destes ambientes na autocicatrização de materiais cimentícios. A partir do levantamento bibliográfico, os autores chegaram à conclusão de que a presença de água é fundamental para que a autocicatrização aconteça, tanto pelo mecanismo autônomo como pelo mecanismo autógeno. Além disso verificaram que o simples contato entre o material cimentício e a umidade pode não ser suficiente para que a autocicatrização aconteça. Vale destacar ainda que estes pesquisadores levantaram dados de diferentes materiais autocicatrizantes, não apenas à base de bactérias (ZHANG *et al.*, 2020).

Outro fator interessante relatado pelos pesquisadores é que a maioria dos trabalhos que avaliaram ciclos intermitentes (*seco/úmido* ou *dry-wet*) observaram uma maior autocicatrização. Os autores atribuem este resultado a dois fatores principais, primeiramente relacionado a evaporação da água durante a fase de secagem que resultava em um aumento na concentração de íons nas fissuras, proporcionando a precipitação de cristais. O outro fator está relacionado com a penetração de CO₂ nas fissuras durante o período de secagem, o que facilita a formação de carbonatos (ZHANG *et al.*, 2020).

Entretanto os pesquisadores também verificaram que a cura imersa em água pode auxiliar a autocicatrização por adição de bactérias, apresentando em alguns casos resultados de fechamento de fissuras superiores aos atingidos em regimes intermitentes (ZHANG *et al.*, 2020).

Dentre os 69 artigos que realizaram procedimentos experimentais, apenas 7 estudaram diferentes condições de cura ou de exposição, as quais estão apresentadas na Figura 35, juntamente com a sistematização do portfólio.

Figura 35 – Sistematização do portfólio



Fonte: Autora.

Dentre os procedimentos de cura e exposição mais adotados nos artigos do portfólio, tem-se a cura imersa em água e intermitente com água, os quais apareceram em 7 e 4 artigos, respectivamente. As amostras foram submetidas a câmara úmida em 3 dos artigos e foram imersas em soluções com ureia e cloreto de cálcio em dois deles. As demais condições ocorreram apenas em um dos artigos estudados.

Vale ressaltar que os 62 artigos que não estudaram diferentes condições de cura ou de exposição submeteram as amostras a um único ambiente, não avaliando a influência deste na atuação bacteriana para autocicatrização. Para sistematizar os dados dos artigos que analisaram diferentes condições de exposição elaborou-se o Quadro 6.

Quadro 6 - Estudos realizados sobre diferentes condições de cura e exposição quando bactérias foram adicionadas à materiais cimentícios

Referência	Bactéria estudada	Forma de adição	Condição de cura inicial	Condições de exposição
Xu e Yao (2014)	<i>B. cohnii</i>	Na água de amassamento e como tratamento de superfície	Câmara úmida (20°C +/- 2°C e umidade relativa de 90% +/- 10%) durante 28 dias	Imerso em água, imerso em meio de cultivo com lactato de cálcio, imerso em meio de cultivo com glutamato de cálcio, imerso em meio de cultivo com lactato de cálcio e bactéria, imerso em meio de cultivo com glutamato de cálcio e bactéria
Wang <i>et al.</i> (2014)	<i>B. sphaericus</i>	Por microencapsulação	Câmara úmida (20°C +/- 2°C e umidade relativa de 90% +/- 10%) durante 28 dias	Câmara úmida, imerso em água, ciclo intermitente com água e com meio de cultivo
Luo, Qian e Li (2015)	Esporos de bactérias alcali-resistentes	Na água de amassamento	Câmara úmida padrão durante 21 dias	Imerso em água, câmara úmida e ciclo intermitente
Tziviloglou <i>et al.</i> (2016)	<i>Bacillus</i> alcali-resistentes	Impregnada em agregado leve	Câmara úmida (20°C +/- 2°C e umidade relativa maior que 95%) durante 28 dias	Imerso em água e em regime intermitente
Kalhari e Bagherpour (2017)	<i>B. subtilis</i>	Imersão e água de amassamento com nutrientes	As amostras são fissuradas imediatamente após a desmoldagem e já encaminhadas para as condições de exposição	Imersão em água, Imersão em meio de cultivo com ureia e CaCl ₂ e imersão com o meio de cultivo com ureia e CaCl ₂ e bactéria
Joshi, Goyal e Reddy (2018)	<i>Bacillus sp. CT-5</i>	Na água de amassamento	Após a desmoldagem as amostras foram encaminhadas para a condição de exposição	Imersão em água, imersão em meio de cultivo com ureia e CaCl ₂ e borrifou solução com bactéria duas vezes ao dia
Van Mullen <i>et al.</i> (2020)	Bactéria anaeróbica com capacidade de esporulação	Na água de amassamento em um aditivo denominado de MUC	Câmara úmida (20°C e umidade relativa maior que 90%) durante 35 dias	Em ciclo intermitente, submersa em água e ambiente úmido

Fonte: Autora.

De acordo com Alazhari *et al.* (2018), muito ainda precisa ser estudado para que se entenda completamente o mecanismo de precipitação de CaCO₃. A princípio, para que a precipitação de CaCO₃ ocorra a bactéria precisa estar em contato com uma fonte de cálcio (que pode ser o hidróxido de cálcio) e ter contato com o CO₂ atmosférico, para que possa respirar e precipitar o CaCO₃. Desta forma, a autocicatrização será mais lenta quando o material estiver em cura submersa. Segundo Tziviloglou *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2014) condições de cura intermitentes (*dry-wet*) demonstraram um aumento no crescimento bacteriano e da precipitação de CaCO₃, quando comparado às condições úmidas.

Xu e Yao (2014) estudaram a adição da bactéria *B. cohnii*, que é uma cepa não ureolítica, adicionada na água de amassamento e como tratamento de superfície na concentração de 10⁷ células/mL, juntamente com uma fonte de cálcio e extrato de levedura.

As amostras estudadas por estes pesquisadores foram mantidas em câmara úmida (20°C +/- 2°C e umidade relativa de 90% +/- 10%) durante 28 dias e em seguida foram fissuradas. Após a fissuração as amostras foram separadas em grupos e submetidas a diferentes condições de exposição, tais como: imersão em água, imersão em meio de cultivo com lactato de cálcio, imersão em meio de cultivo com glutamato de cálcio, imersão em meio de cultivo com lactato de cálcio e bactéria, imersão em meio de cultivo com glutamato de cálcio e bactéria (XU e YAO, 2014).

A partir da análise dos resultados, os pesquisadores concluíram que a autocicatrização foi mais eficaz quando se adicionou glutamato de cálcio, tanto na autocicatrização (adicionado a água de amassamento e curado em água) quanto no tratamento de superfície (imerso em solução com glutamato de cálcio e bactéria). Desta forma, Xu e Yao (2014) evidenciaram que o glutamato de cálcio foi uma fonte de cálcio mais eficiente do que o lactato de cálcio para a autocicatrização frente a adição da bactéria *B. cohnii*.

Wang *et al.* (2014) estudaram a bactéria *B. sphaericus* encapsulada e adicionada no momento da mistura, em argamassas, as quais foram mantidas em câmara úmida por 28 dias antes de serem fissuradas. Após a fissuração as amostras foram encaminhadas para diferentes condições de exposição para avaliar a autocicatrização. As condições de exposição estudadas foram: seca (temperatura de 20 °C), em câmara úmida, imersa em água, imersa em meio de cultivo, ciclos intermitentes (*dry-wet*) em meio de cultivo e em água. Vale destacar que no ciclo intermitente as amostras foram imersas em meio de cultivo ou água durante 16 horas e expostas ao ar durante 8 horas e este procedimento foi repetido até as idades de ensaio.

Os pesquisadores verificaram que a cura intermitente (*dry-wet*) foi a melhor condição de exposição para as amostras com bactérias, averiguando que a água livre é um componente chave para se obter a autocicatrização. Como a água participa das reações de hidratação de partículas e de precipitação de carbonato de cálcio, sem a sua presença essas reações não aconteceriam, logo a autocicatrização também não ocorreria. Além disso a bioprecipitação não aconteceria sem a água, pois os esporos necessitam desta para sua germinação (WANG *et al.*, 2014).

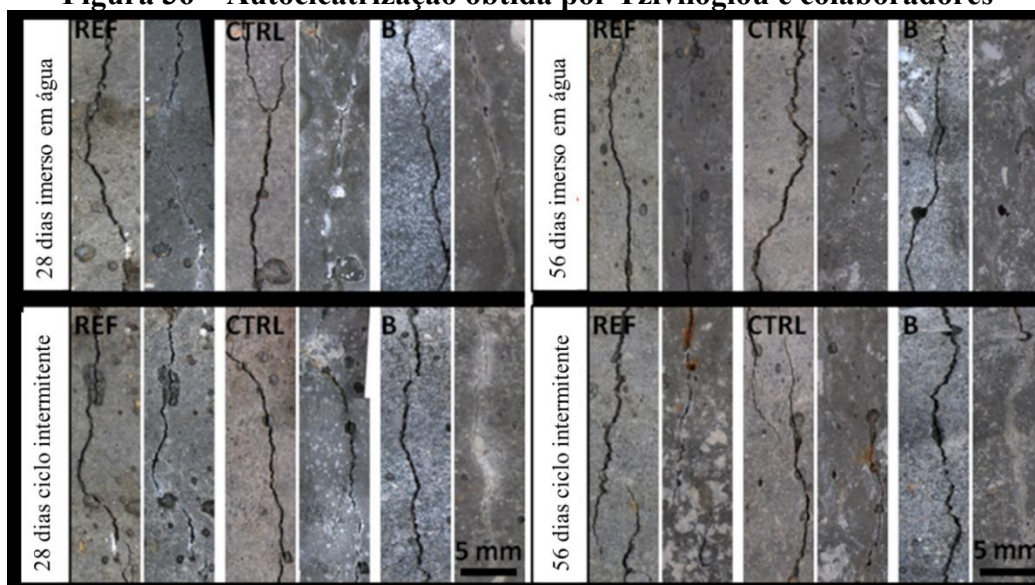
Em contrapartida Luo, Qian e Li (2015) armazenaram as amostras em câmara de cura padrão durante 21 dias, na sequência fissuraram as amostras e as encaminharam para três diferentes condições de exposição: imerso em água, em câmara úmida e ciclos intermitentes (*dry-wet*). A partir dos resultados obtidos os pesquisadores verificaram que a cura imersa em água apresentou melhores resultados de autocicatrização. O ciclo intermitente avaliado pelos pesquisadores foi de 12 horas submerso em água e 12 horas exposto ao ar.

Tziviloglou *et al.* (2016) estudaram a adição de uma bactéria alcali-resistente do gênero *Bacillus* incorporada em partículas de argila expandida, juntamente com lactato de cálcio e extrato de levedura. Estes pesquisadores estudaram argamassas com e sem a adição de agregado leve com a impregnação da solução bacteriana.

As amostras estudadas foram desmoldadas após 24 horas e mantidas em câmara úmida (20°C +/- 2°C e umidade relativa maior que 95%) durante 28 dias. Após esse período as amostras foram fissuradas a partir do ensaio de flexão em três pontos e encaminhadas para duas diferentes condições de exposição: imersa em água e em ciclos intermitentes (*dry-wet*) de 12 horas seco e 12 horas submerso (TZIVILOGLOU *et al.*, 2016).

Após a fissuração, as amostras foram encaminhadas para as condições de exposição e foram analisadas após 28 e 56 dias. Os ensaios realizados demonstraram que a autocicatrização foi mais rápida quando as amostras foram submetidas ao ciclo intermitente, mas na idade de 56 dias as fissuras foram seladas independentemente da condição de exposição (Figura 36). Vale apontar que amostra de referência (REF) não continha o agregado leve, a amostra de controle (CTRL) possuía o agregado leve, mas sem a incorporação das bactérias e a amostra B continha o agregado leve com as bactérias incorporadas (TZIVILOGLOU *et al.*, 2016).

Figura 36 – Autocicatrização obtida por Tziviloglou e colaboradores



Fonte: Tziviloglou *et al.* (2016).

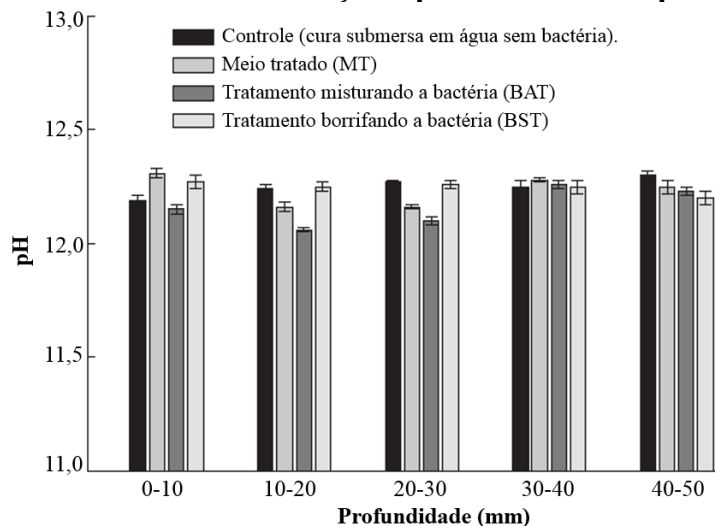
Além destes pesquisadores Kalhori e Bagherpour (2017) estudaram a incorporação da bactéria *B. subtilis* em concreto projetado, avaliando diferentes condições de exposição. Estes pesquisadores realizaram ensaios de resistência à compressão e absorção de água em quatro grupos de amostra e observaram que a absorção de água aumentou e a resistência à compressão diminuiu quando a cura foi realizada em solução de ureia e cloreto de cálcio, sem a adição de bactérias. Porém quando as bactérias foram adicionadas, houve uma diminuição da absorção de água e um aumento da resistência à compressão (tanto na água de amassamento como na solução de imersão). Por esse motivo, os autores consideraram a adição do microrganismo benéfica para as propriedades analisadas, durante o tempo de análise.

El-Turki *et al.* (2010) e Alazhari *et al.* (2018) complementam que a autocicatrização promovida por bactérias não deixa de ser uma carbonatação, portanto é provável que a cura intermitente seja benéfica para a bioprecipitação de CaCO_3 , pois a carbonatação tem se mostrado mais rápida em tais ambientes. Vale destacar que a carbonatação de acordo com Neville e Brooks (2013), nada mais é do que a reação de dióxido de carbono (CO_2) presente na atmosfera com o hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), que na presença de umidade forma carbonato de cálcio (CaCO_3).

Pelo fato da bioprecipitação de CaCO_3 ser uma forma de carbonatação, Joshi, Goyal e Reddy (2018) analisaram o pH das amostras frente as diferentes condições de exposição, em diversas profundidades, aos 28 dias de cura. O resultado obtido está apresentado na Figura 37. Vale destacar que na amostra MT o meio de cultivo foi adicionado no lugar da água de amassamento (sem bactérias), na amostra BAT a adição de bactérias de *Bacillus sp.* foi

na água de amassamento com meio de cultivo e essa amostra foi curada imersa também no meio de cultivo contendo bactérias e, por fim, na amostra BST a bactéria diluída no meio de cultivo e borrifada nos corpos de prova 2 vezes por dia. Vale destacar que as bactérias utilizadas na pesquisa são ureolíticas, necessitando de ureia para que a precipitação de CaCO_3 aconteça.

Figura 37 – Resultados de mudança de pH em diferentes profundidades



Fonte: JOSHI, GOYAL e REDDY (2018).

A partir da Figura 37, constatou-se que os valores de pH em todas as amostras foram na faixa de 12,0 a 12,4, indicando que as bactérias, a precipitação de CaCO_3 , o meio de cultivo, a ureia ou o CaCl_2 tiveram efeito significativo sobre o pH do concreto, durante o tempo de análise. Porém análises com maiores idades precisam ser conduzidas, pois a autocatrização pode ocorrer em períodos maiores e ter capacidade de alterar o pH.

Joshi, Goyal e Reddy (2018) estudaram ainda a resistência à compressão das amostras. A partir da análise dos resultados observaram que a resistência à compressão das amostras tratadas com meio de cultivo (MT), sem bactérias, registrou uma redução de aproximadamente 15% em comparação com a mistura de controle, corroborando com os resultados apresentados por Erşan, de Belie e Boon (2015), Bundur, Kirisits e Ferron (2015) e Williams, Kirisits e Ferron (2016).

Estes pesquisadores verificaram que a adição de matéria orgânica no concreto influencia no grau de hidratação, pois o meio de cultivo atua como um agente retardador e resulta na diminuição da resistência à compressão (ERŞAN, DE BELIE e BOON, 2015; BUNDUR, KIRISITS e FERRON, 2015 e WILLIAMS, KIRISITS e FERRON, 2016).

Entretanto quando a bactéria foi adicionada juntamente com o meio de ureia e CaCl_2 (BAT), houve um aumento de 29% na resistência à compressão quando comparado com a amostra de referência. Além disso as amostras de bactérias borrifadas (BST) também

registraram um leve aumento na resistência à compressão em torno de 8% em comparação com a referência (JOSHI, GOYAL e REDDY, 2018).

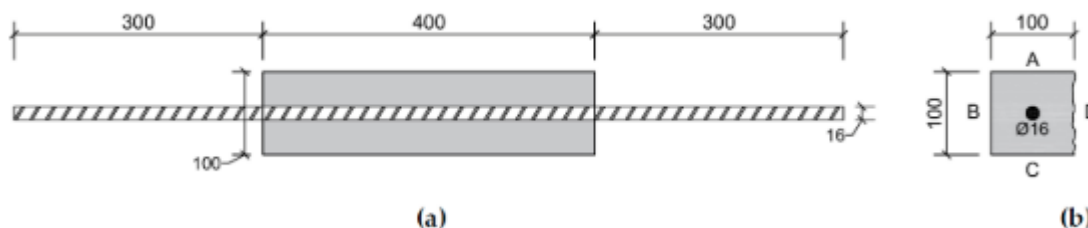
Frente a isso, os autores verificaram que a adição de bactérias juntamente com a matéria orgânica não prejudicou a resistência à compressão e permeabilidade do concreto, assim como não alterou significativamente o pH das amostras. Desta forma, os pesquisadores concluíram que o efeito adverso da introdução de nutrientes na hidratação do concreto pode ser superado pela precipitação de carbonato de cálcio realizada pelas bactérias (JOSHI, GOYAL e REDDY, 2018).

Apesar dos resultados apresentados, deve-se ter em mente que a adição de matéria orgânica em concretos e argamassas pode resultar em manifestações patológicas no futuro, que podem comprometer a durabilidade destes materiais, por isso análises considerando idades mais longas devem ser efetuadas.

Para finalizar o tópico das condições de cura e exposição, em 2020, Van Mullem e colaboradores estudaram a aplicação de um aditivo bacteriano chamado de MUC⁺ em uma estrutura real na Bélgica. O concreto foi utilizado para elaboração de uma laje de cobertura de uma câmara de inspeção dos tubos de drenagem na cidade de Antuérpia, que é a maior cidade da Bélgica. O aditivo utilizado é constituído de uma cultura ureolíticas mista, com bactérias granulares anaeróbicas e formadoras de esporos. No concreto também foi adicionado ureia e nitrato de cálcio (VAN MULLEN *et al.*, 2020).

Além de analisar a formação de fissuras nessa estrutura real, corpos de prova de 100x100x400 mm foram moldados com uma barra de aço de 16 mm de diâmetro centralizada, conforme ilustra a Figura 38. Os corpos de prova foram desmoldados após 5 dias e armazenados em câmara úmida (20°C e umidade relativa maior que 90%) durante 30 dias. Após esse período, os corpos de prova foram fissurados a partir da aplicação de um esforço de tração na barra metálica (VAN MULLEM *et al.*, 2020).

Figura 38 – Corpo de prova utilizado para fissuração das amostras de concreto. Visão lateral (a) e corte (b)



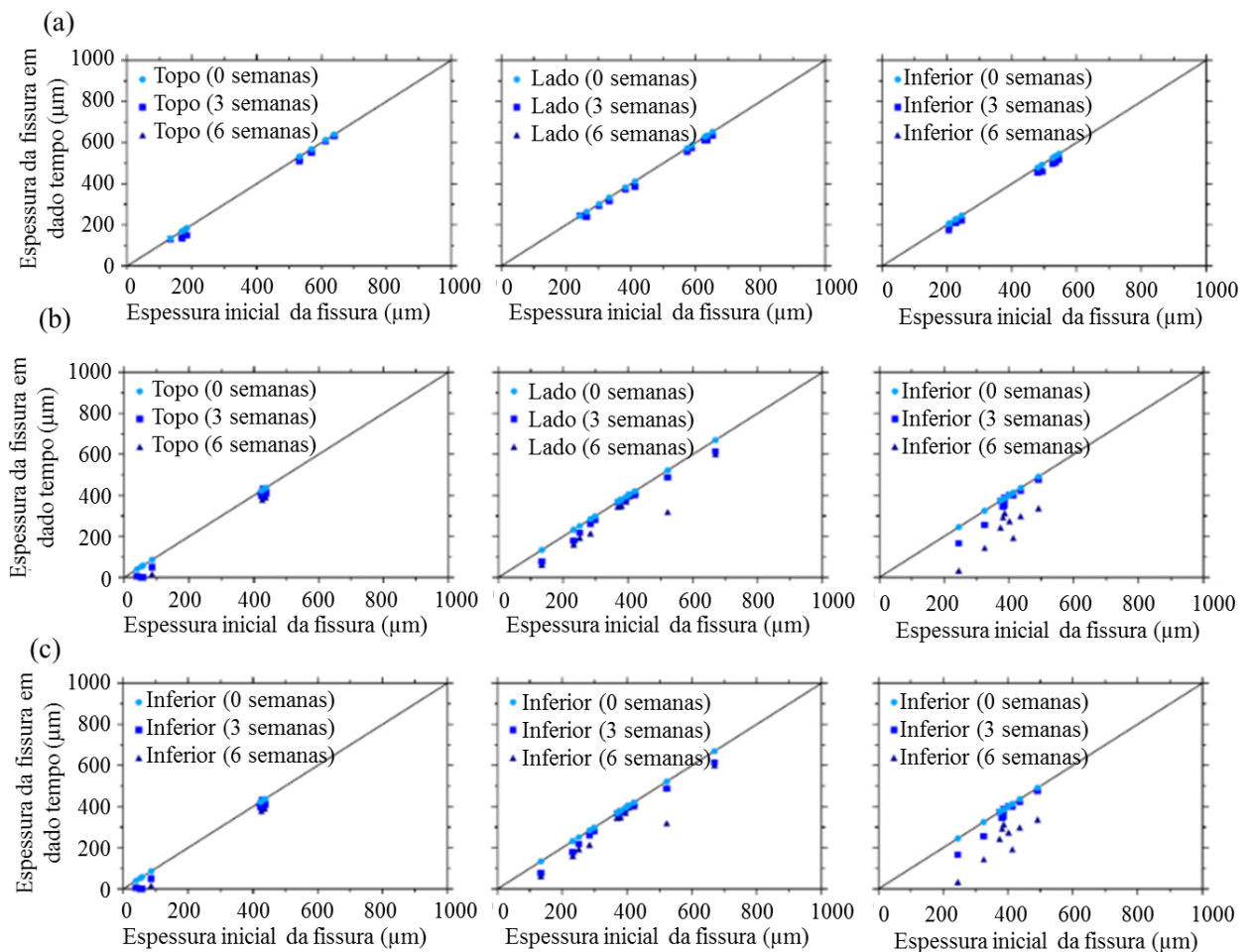
Fonte: Van Mullem *et al.* (2020).

Frente a aplicação de tração na barra, fissuras foram geradas em todas as faces da amostra, as quais foram quantificadas utilizando um estereoscópio e as amostras foram encaminhadas para três diferentes condições de exposição (VAN MULLEM *et al.*, 2020):

- câmara úmida a temperatura de 20°C e umidade relativa do ar a 95%.
- ciclo intermitente: 4 horas imerso e 2 horas seco, sendo em ambos os ciclos a temperatura foi mantida a 20°C e no período seco a umidade relativa do ar foi mantida a 60%;
- submersa em água a temperatura de 20°C;

Os resultados de autocatrização foram quantificados ao longo do tempo em todas as faces dos corpos de prova, os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 39, sendo que em (a) tem-se os resultados das amostras submetidas à câmara úmida, em (b) das amostras imersas em (c) do ciclo intermitente (VAN MULLEM *et al.*, 2020).

Figura 39 – Evolução da espessura da fissura em diferentes condições de exposição: câmara úmida (a), imersa (b) e ciclo intermitentes (c)



Fonte: Van Mullem *et al.* (2020).

É interessante observar que durante o período de exposição, os pesquisadores sempre armazenaram as amostras na mesma posição e observaram que uma fissura em diferentes faces da amostra pode resultar em diferentes velocidades de autocicatrização. No ciclo intermitente, por exemplo, verificou-se que ao final do ciclo úmido, o carbonato de cálcio é movido para o fundo da fissura, por ação do fluxo de água, fazendo com que as fissuras da parte inferior do corpo de prova apresentassem maior autocicatrização (VAN MULLEM *et al.*, 2020).

Frente a análise dos resultados, obsevou-se que a condição de exposição que proporcionou a maior autocicatrização foi a condição intermitente, seguida pela condição imersa e com piores resultados para as amostras submetidas à câmara úmida. Além disso os pesquisadores concluíram que existe a necessidade de água líquida para que a precipitação de CaCO_3 por ação bacteriana se inicie (VAN MULLEM *et al.*, 2020).

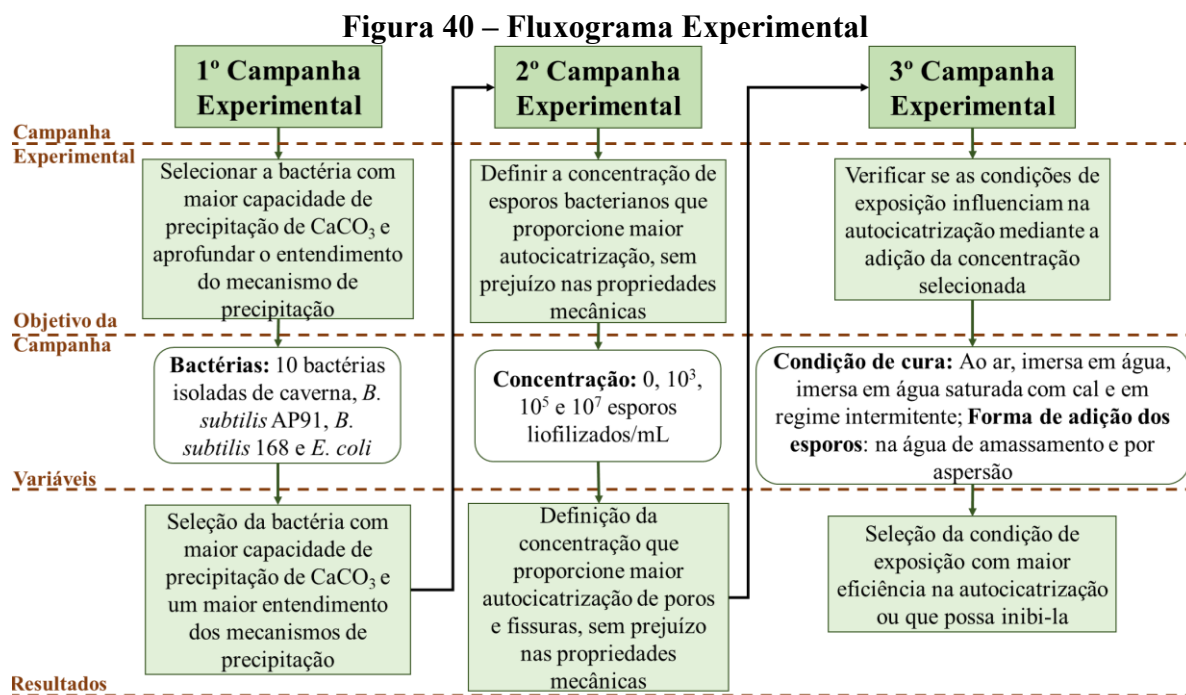
Os resultados obtidos por Wang *et al.* (2014) e Luo, Quian e Li (2015) corroboram com a pesquisa de Van Mullem *et al.* (2020), pois estes pesquisadores também verificaram que a autocicatrização foi insignificante em condições úmidas, enfatizando a necessidade de fornecer água líquida para garantir uma boa atividade bacteriana.

Van Mullem *et al.* (2020) justificam a maior autocicatrização em ciclos intermitentes à presença de CO_2 atmosférico durante os ciclos secos, que não precisa se dissolver na água e está disponível na fissura que está secando lentamente. Esse CO_2 é utilizado pelas bactérias na respiração, fazendo com que a precipitação de CaCO_3 aconteça na presença de uma fonte de cálcio.

Frente ao levantamento bibliográfico apresentado, pode-se verificar que ainda existem divergências na literatura sobre a condição de exposição que possa potencializar ou inibir a atuação bacteriana na autocicatrização. Além disso é importante citar que o tipo de bactéria e o meio em que ela está em contato também pode influenciar no processo de autocicatrização e por esse motivo, estudos laboratoriais são relevantes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para atingir os objetivos do trabalho o experimento foi dividido em três campanhas experimentais. Na Figura 40 as campanhas estão ilustradas de forma sintetizada, apontando o objetivo de cada uma delas, as variáveis estudadas e os resultados esperados.



Fonte: Autora.

A primeira campanha experimental tem por objetivo selecionar a bactéria com maior capacidade de precipitação de CaCO₃, em meio específico. A escolha da bactéria foi realizada a partir de análises de quantificação de CaCO₃ precipitado por meio da quantificação de massa retida em filtro. A partir do resultado a morfologia e composição química dos cristais precipitados pela bactéria selecionada foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS). Para um maior entendimento dos mecanismos de precipitação da bactéria selecionada foram conduzidos testes de produção da enzima urease, crescimento e precipitação em meio alcalino e identificação do genoma completo.

Do resultado da primeira campanha experimental, iniciou-se a segunda que teve como objetivo a determinação da concentração de bactérias que proporcionasse maior fechamento de poros e fissuras, sem prejuízo às propriedades mecânicas de argamassas. Esta campanha foi dividida em duas etapas, na primeira realizou-se o crescimento da bactéria e sua preparação para aplicação nas argamassas. Na segunda etapa, diferentes concentrações de bactérias foram testadas nas argamassas de traço 1:3 quanto à resistência à compressão,

absorção de água e índice de vazios, Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM), análise de poros por estereoscópio e fechamento de fissura acompanhado por imagem.

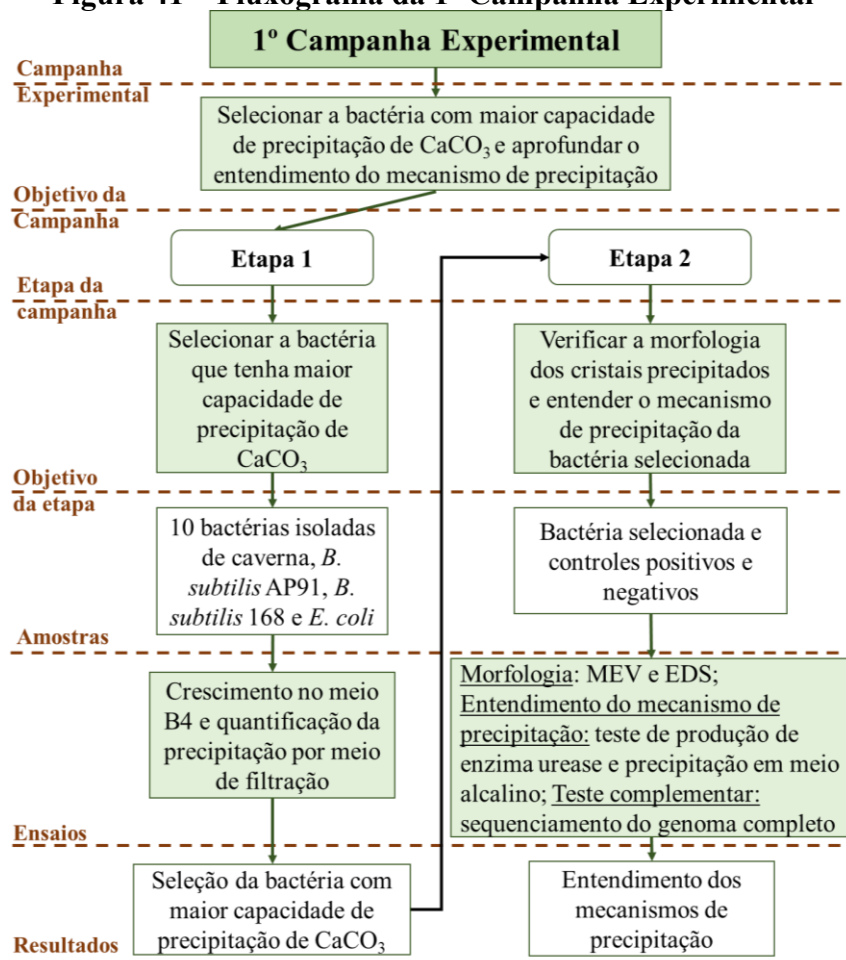
Na última Campanha Experimental a bactéria selecionada, na concentração ideal, foi aplicada ao mesmo traço 1:3 para a análise da influência da condição de exposição no fechamento de poros e na autocicatrização de fissuras. O objetivo desta última etapa é analisar o fechamento de poros e fissuras e os efeitos da adição bacteriana nas propriedades da argamassa, quando submetida a diferentes condições de exposição. Esta campanha experimental foi dividida em três etapas. Na Etapa 1 a influência das diferentes condições de exposição na autocicatrização de fissuras foi estudada. Na Etapa 2 o foco foi no fechamento de poros e, por fim, na Etapa 3 foi verificado se o tratamento bacteriano submetido a diferentes condições de exposição é capaz de influenciar na resistência a compressão e o avanço da carbonatação das argamassas.

Na sequência estão apresentados os procedimentos metodológicos de cada uma das campanhas experimentais.

3.1 PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL

Na primeira campanha experimental avaliou-se a eficiência da precipitação de carbonato de cálcio promovida por diferentes bactérias, com o intuito de selecionar a que apresenta maior potencial de precipitação para posteriormente realizar sua aplicação no material cimentício. A Figura 41 ilustra o objetivo da campanha, as etapas experimentais e seus objetivos, as amostras analisadas em cada etapa, os ensaios realizados e resultados obtidos.

Figura 41 – Fluxograma da 1ª Campanha Experimental



Fonte: Autora.

3.1.1 Etapa 1: Seleção da bactéria

O objetivo da primeira etapa foi selecionar a bactéria que apresentasse maior capacidade de precipitação de CaCO_3 . Para atingir esse objetivo, várias bactérias foram testadas, sendo estas: 10 isoladas da caverna Pedra da Cachoeira (denominadas de *L10*, *CV16*, *L14*, *L19*, *L22*, *L26*, *L29*, *L33*, *L36* e *L39*), a *B. subtilis* AP91 (utilizada pela autora em estudos anteriores) e a *B. subtilis* 168 (cepa utilizada mundialmente na precipitação de CaCO_3). Como controle negativo da precipitação de CaCO_3 a bactéria *E. coli* DH5 α foi utilizada, pois não precipita CaCO_3 .

Vale destacar que as bactérias isoladas de caverna foram disponibilizadas pelo professor Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior, do departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. As bactérias foram isoladas da Caverna Pedra da Cachoeira, na cidade de Altamira no estado do Pará, por professores da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa).

Para o teste de precipitação de CaCO₃ o meio de cultivo B4 foi utilizado. Este meio é bastante aplicado na literatura para testes *in vitro* de precipitação de CaCO₃ (MARVASI *et al.*, 2013).

3.1.1.1 Preparação do meio B4 e inóculo das bactérias

O meio de precipitação B4 foi elaborado na proporção de 2.000 mL, os constituintes estão apresentados na Tabela 2 e os procedimentos de mistura seguiram os parâmetros apresentados por Marvasi *et al.* (2013). O meio foi vertido em frascos de vidro de 150 mL, sendo que em cada frasco foram inseridos 50 mL do meio B4. As bactérias isoladas de caverna, a *B. subtilis* AP91, *B. subtilis* 168 e *E. coli* DH5 α foram inoculadas em triplicata e armazenadas durante 7 dias em agitador a 37°C, com agitação constante de 170 rpm, para posterior quantificação do material precipitado.

Tabela 2 – Constituintes do meio B4

Constituintes	Quantidade/L
Água destilada	962,5 mL
Extrato de levedura	4 g
Glicose	12,5 mL a 40%
Acetato de cálcio	25 mL a 10%

Fonte: Marvasi *et al.*, (2013).

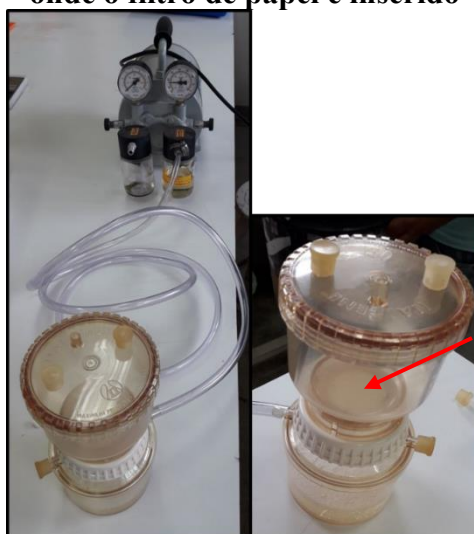
Para garantir a mesma quantidade de bactéria inoculada em cada um dos frascos, foi realizada uma padronização com a escala de Escala McFarland (SWERTS, COSTA e FIORINI, 2005).

3.1.1.2 Quantificação do material precipitado

Após o período de crescimento, os meios com as bactérias foram vertidos em tubos de poliestireno de 50 mL, os quais foram centrifugados a uma rotação de 2.500 rpm durante 5 minutos. Este procedimento resultou na separação dos cristais e da matéria orgânica, pois os cristais precipitados vão para o *pellet* e a matéria orgânica fica dispersa no sobrenadante.

Em seguida, descartou-se o sobrenadante e nos tubos de poliestireno foram inseridos 25 mL de hipoclorito de cálcio saturado e 25 mL de água ultrapura. Esta nova solução sofreu homogeneização em vórtex durante 1 minuto, para então ser filtrada em filtro de papel com abertura de 2 μ m, com o auxílio de uma bomba a vácuo, conforme ilustra a Figura 42.

Figura 42 – Sistema de filtração com bomba a vácuo com seta apontando para o local onde o filtro de papel é inserido



Fonte: Autora.

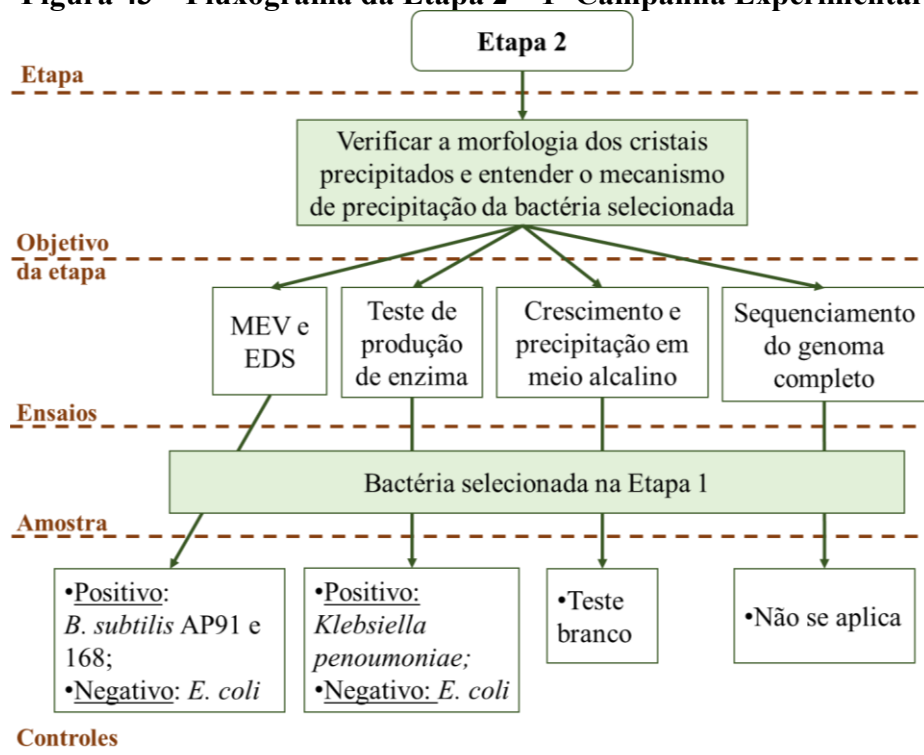
A massa de cada filtro foi quantificada em balança de precisão, antes e depois do procedimento de filtração, para quantificação do material precipitado. Com o resultado desta etapa selecionou-se a bactéria que apresentou maior precipitação de CaCO_3 para utilizá-la na Etapa 2, buscando um aprofundamento no entendimento dos mecanismos de precipitação de CaCO_3 da bactéria selecionada.

3.1.2 Etapa 2: Morfologia e entendimento dos mecanismos de precipitação

O objetivo principal da segunda etapa foi verificar a morfologia dos cristais precipitados e entender sobre os mecanismos de precipitação. Para verificar a morfologia, análises em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) foram conduzidas. O entendimento do mecanismo de precipitação da bactéria selecionada foi realizado por testes de produção da enzima urease e crescimento bacteriano e precipitação de CaCO_3 em ambiente alcalino. Além disso nesta etapa o sequenciamento do genoma completo da bactéria selecionada foi realizado, com o intuito de aprofundar o conhecimento nos genes envolvidos no processo de precipitação de CaCO_3 .

O fluxograma detalhado desta etapa está ilustrado na Figura 43 e os ensaios realizados estão descritos na sequência.

Figura 43 – Fluxograma da Etapa 2 – 1º Campanha Experimental



Fonte: Autora.

3.1.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS)

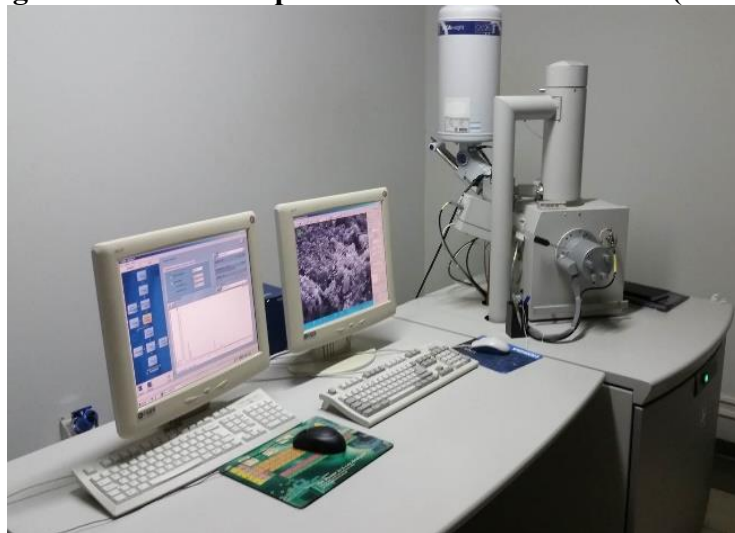
Para avaliar a composição química do material precipitado e sua morfologia, o meio B4 foi formulado novamente, na quantidade de 50 mL, agora com o inóculo da bactéria selecionada. As bactérias *B. subtilis* AP91 e *B. subtilis* 168 também foram inoculadas como controles positivos da precipitação de CaCO_3 e a bactéria *E. coli* como controle negativo. Além disso o meio de cultivo sem inóculo de bactéria (teste branco) foi formulado, para verificação da ausência de contaminação. O meio B4 com os inóculos e o teste branco foram submetidos à temperatura de 37°C e agitação de 170 rpm durante 7 dias (MARVASI *et al.*, 2013).

Após o período de crescimento e precipitação iniciou-se a preparação das amostras para MEV e EDS. Para tanto, retirou-se 20 μL de cada cultura e 20 μL da solução fixadora (glutaraldeído 2,5% e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M). Esse material foi inserido em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, USA) dentro de uma placa de 24 poços. Após 30 minutos, o volume total foi completado para 500 μL utilizando a solução fixadora e então as amostras sofreram fixação química por 18 horas. Posteriormente as amostras foram pós fixadas em tetróxido de ósmio por 1 hora.

Na sequência, as amostras foram desidratadas em um gradiente crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%), secas ao ponto crítico com CO₂ (BALTEC CPSD 030), metalizadas com ouro (BALTEC SDC 050) e observadas em MEV.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise – LMEN, da Universidade Estadual de Londrina – UEL, no Microscópio Eletrônico de Varredura modelo FEI Quanta 200 (Figura 44).

Figura 44 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)



Fonte: Autora.

Após as análises em MEV, a bactéria selecionada foi testada quanto à produção da enzima urease, com o intuito de verificar se a precipitação de CaCO₃ poderia ocorrer também pela hidrólise da ureia.

3.1.2.2 *Teste de produção da enzima urease*

O teste de produção de urease foi realizado a partir do meio ágar ureia de Christensen. O resultado desta análise se dá por diferença de coloração, onde o meio muda para cor rosa caso haja a degradação, por ação bacteriana, da ureia por meio da enzima urease e fica amarelo caso a bactéria não produza a enzima. A bactéria testada foi a selecionada na Etapa 1.

Para a garantia de um resultado satisfatório a análise foi realizada com um controle positivo e um negativo. No controle positivo incubou-se a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, que é produtora de urease, e no controle negativo a bactéria *E. coli* DH5 α , que não produz a enzima.

Na Tabela 3 estão apresentados os constituintes do meio ágar ureia de Christensen, o qual foi diluído de acordo com a orientação do fabricante (2,4 gramas em 95 mL de água destilada). O meio foi fervido para a completa dissolução, na sequência foi esterilizado

à temperatura de 115°C por 20 minutos e resfriado até 50°C. Nessa condição adicionou-se 5 mL de solução de ureia a 40%. Por fim, distribuiu-se o meio em tubos estéreis, inoculando as bactérias e armazenando em estufa à temperatura de 37°C durante 24 horas.

Tabela 3 – Constituintes meio ágar ureia de Christensen

Constituintes	Quantidade (g/L)
Peptona	1,000
Glicose	1,000
Cloreto de sódio	5,000
Fosfato dissódico	1,200
Fosfato monopotássico	0,800
Vermelho de fenol	0,012
Ágar	15,000
Ureia	*

* Deve ser adicionado 5 mL de ureia em solução 40%, após o meio ser autoclavado.

Após o período de 24 horas, foram tiradas fotos das amostras, pois o resultado do ensaio se dá por diferença de coloração.

3.1.2.3 *Crescimento bacteriano e precipitação de CaCO₃ em ambiente alcalino*

Para este teste o meio B4 foi formulado com uma diferença do descrito por Marvasi *et al.* (2013), pois substituiu-se a solução de acetato de cálcio por uma solução de hidróxido de cálcio. O intuito foi verificar se, em contato com um meio alcalino, haveria a inibição do crescimento da bactéria selecionada.

Neste sentido, preparou-se 100 mL do meio B4 dividindo-o em dois frascos de 50 mL, um para o inóculo da bactéria e outro para a referência (teste branco). Os frascos foram armazenados durante 7 dias em agitador a 37°C, com agitação constante de 170 rpm para posterior análise do crescimento bacteriano e da precipitação do CaCO₃.

Para a análise do crescimento bacteriano, uma alíquota do meio crescido foi passada para uma placa de petri com meio de cultivo e armazenada em estufa à temperatura de 37°C durante 24 horas, para posterior verificação do crescimento.

Para a análise da precipitação do CaCO₃, não foi possível realizar a quantificação por filtração, pois rapidamente havia a colmatação dos poros e o rompimento do papel filtro. Entretanto a morfologia dos cristais foi analisada em Microscópio Eletrônico de Varredura com Sistema de Energia Dispersiva repetindo o procedimento de preparação das amostras e desidratação citado em 3.1.2.1.

3.1.2.4 Sequenciamento do genoma completo

Para um maior entendimento dos genes envolvidos no processo de precipitação, o sequenciamento do genoma completo foi realizado. Este ensaio é o primeiro passo para obter uma descrição completa da composição molecular de cada microrganismo, pois todas as informações destes estão inseridas no DNA genômico. A partir deste dado, pode-se comparar diferentes microrganismos quanto à presença de genes, anomalias, características, entre outros, permitindo um melhor entendimento do comportamento dos microrganismos.

Este ensaio foi realizado pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana, da Universidade Estadual de Londrina, apenas para a bactéria que apresentou o maior potencial de precipitação de CaCO₃, por ser um ensaio oneroso.

Para sequenciamento completo do genoma uma amostra do microrganismo foi enviada para a empresa BPI, na cidade de Botucatu-SP, que realizou o sequenciamento em plataforma Illumina Mi-Seq de leituras pareadas. Os dados brutos foram avaliados no programa FastQC (ANDREWS, 2010), sendo que foi realizada uma montagem dos *contigs* que foram alinhados com a cepa referência *Bacillus subtilis* 168 no programa CONTIGuator (GALARDINI *et al.*, 2011) para formar os *scaffolds*. Os *gaps* presentes na sequência foram inicialmente tratados pelo programa GapCloser e em seguida tratados manualmente por mapeamento recursivo das leituras nas bordas e alinhamento com genomas de referência. A anotação do genoma foi realizada na plataforma RAST (AZIZ *et al.*, 2008).

Para determinação da espécie do isolado foram utilizadas as ferramentas orthoANI da plataforma EzBioCloud (LEE *et al.*, 2016) para cálculo da identidade média de nucleotídeos (ANI) (RICHTER & ROSSELLO-MORA, 2009; CIUFO *et al.*, 2018). A comparação foi realizada com as espécies *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* e *B. amyloliquefaciens* disponíveis no banco de dados GenBank (BENSON *et al.*, 2007) e atualizadas após 2015 (BELBAHRI *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2015; DUNLAP *et al.*, 2016). Para reforçar os dados de ANI também foi utilizada a ferramenta *Genome to Genome Distance Calculator* (GGDC) (MEIER-KOLTHOFF, 2013) que calcula um valor de Hibridização Digital DNA-DNA (dDDH) entre dois isolados. Para definição de espécie se aceita valores acima de 95% para ANI e acima de 70% para dDDH.

Por fim, para minerar o genoma em busca de genes ligados com a formação e regulação de biofilme e também para precipitação de carbonato de cálcio foi utilizada a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) com genes encontrados na literatura relacionados a estas funções.

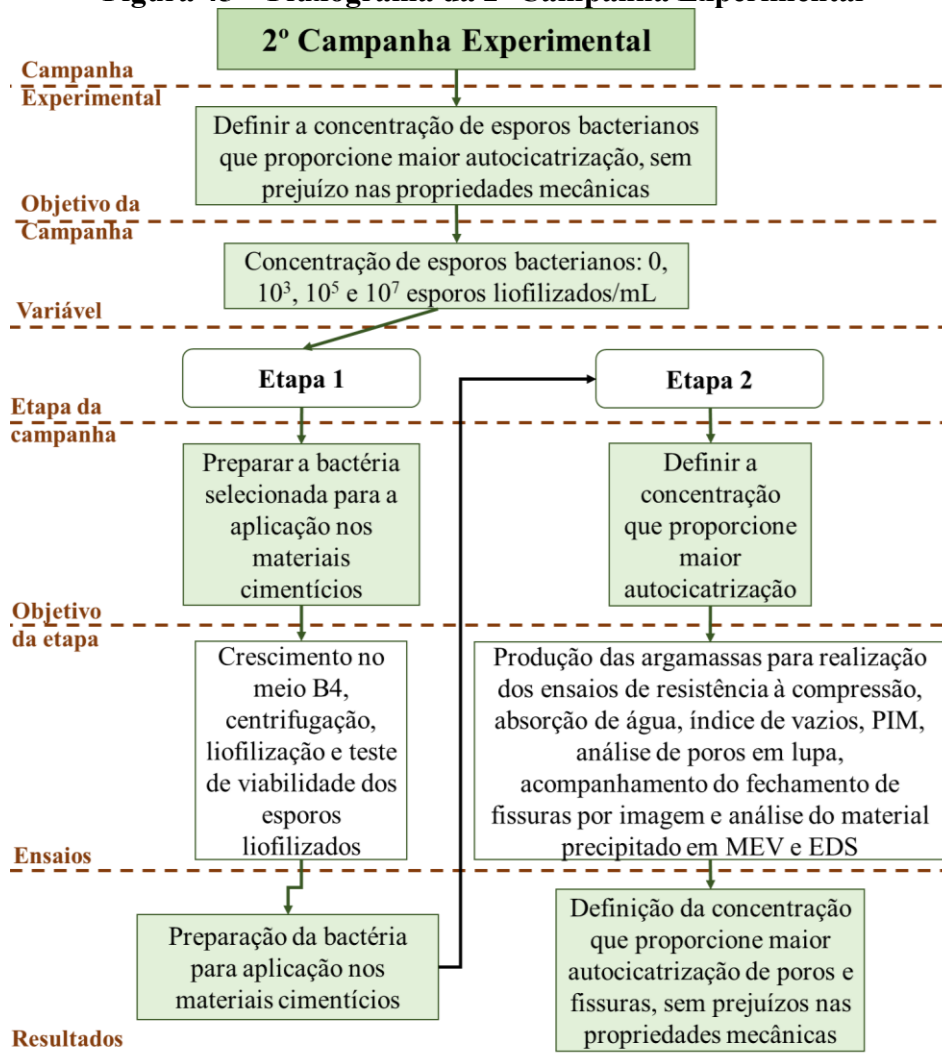
Finalizada a análise do genoma completo da bactéria selecionada, iniciou-se a segunda campanha experimental.

3.2 SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL

O objetivo principal da segunda campanha experimental é a seleção da concentração bacteriana a ser empregada na água de amassamento de uma argamassa, de traço 1:3 (em massa) e relação água/cimento (a/c) de 0,54, buscando potencializar o fechamento de poros e a autocicatrização de fissuras, sem prejuízos nas propriedades mecânicas dos materiais cimentícios. O traço adotado foi conforme apresentado por Abo-El-Enien *et al.* (2013), Ghosh *et al.* (2009), Achal *et al.* (2013) e Xu e Yao (2014).

A Segunda Campanha Experimental foi dividida em duas etapas, os quais estão ilustradas no fluxograma da Figura 45 e descritas na sequência.

Figura 45 – Fluxograma da 2ª Campanha Experimental



Fonte: Autora.

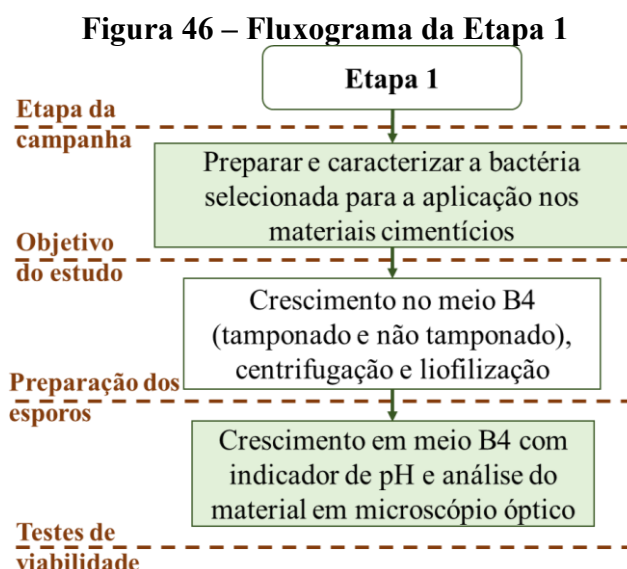
3.2.1 Etapa 1: Preparo da bactéria para aplicação nos materiais cimentícios

Buscando o desenvolvimento de um produto e pensando na aplicabilidade das bactérias em materiais cimentícios, a primeira etapa desta campanha experimental teve como foco a preparação dos esporos para a aplicação a partir do processo de liofilização, que facilita o transporte e aplicação do material (TAN *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2021). Vale destacar que o processo de liofilização consiste no congelamento dos esporos e remoção da água por sublimação (JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Para o processo de liofilização, as bactérias foram crescidas no meio B4 (MARVASI *et al.*, 2013), sem a fonte de cálcio, para que não ocorresse a precipitação de CaCO_3 . A escolha do procedimento de liofilização foi baseada na pesquisa de Pungrasmi *et al.* (2019), que comprovou que esporos liofilizados possuem a capacidade de germinar e fechar fissuras em concretos e argamassas, enquanto esporos secos por *spray drier* apresentaram um desempenho inferior.

Além disso Jang *et al.* (2020) e Feng *et al.* (2021) verificaram que esporos liofilizados são capazes de germinar e atuar na autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios sem nenhuma proteção por imobilização, o que facilita também o processo produtivo da solução bacteriana para aplicação em materiais cimentícios.

Para o desenvolvimento da Etapa 1, seguiu-se o procedimento ilustrado na Figura 46.



Fonte: Autora.

O meio B4 foi elaborado de duas maneiras: tamponado e não tamponado, com o intuito de verificar qual apresentaria o maior crescimento bacteriano, visto que algumas

bactérias se reproduzem mais rapidamente em meios tamponados. Os componentes dos meios estão descritos na Tabela 4.

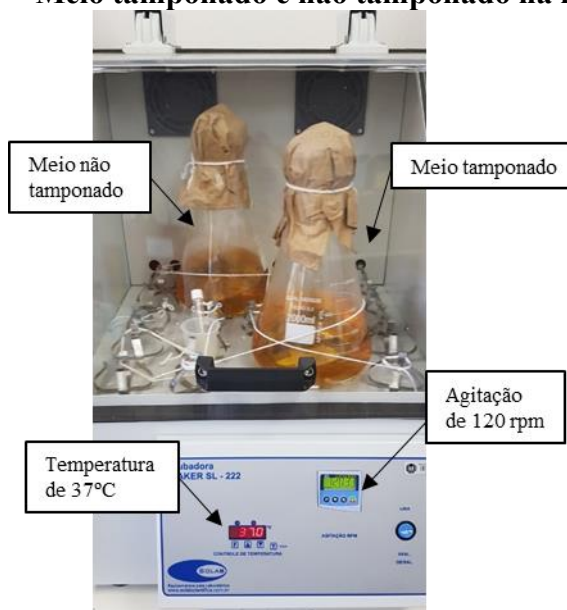
Tabela 4 – Constituintes do meio B4 utilizado nesta etapa

Meio	Constituintes	Quantidade
Não tamponado	Extrato de levedadura	4 g/L
	Glicose à 30%	22 mL
	Água destilada	978 mL
Tamponado	Extrato de levedadura	4 g/L
	Glicose à 30%	22 mL
	Fosfato dissódico	6g
	Fosfato monopotássico	3g
	Água destilada	978 mL

Fonte: Autora.

As bactérias foram inoculadas e armazenadas na incubadora Shaker SL 222 durante 48 horas, sob agitação constante de 120 rpm a temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, conforme ilustra a Figura 47.

Figura 47 – Meio tamponado e não tamponado na incubadora



Fonte: Autora.

Posteriormente, armazenou-se as bactérias em câmara fria, à temperatura de 10°C por 48 horas para produção de esporos. Na sequência, transferiu-se o meio para recipientes de 250 mL para realização do processo de centrifugação, que resulta na separação da matéria orgânica (sobrenadante) e esporos (*pellet*) (GAO *et al.*, 2020). Para tal, utilizou-se a centrífuga Himac CR21 à 7.650 rpm (9.000 g) durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e no seu lugar foi inserido 100 mL de água destilada, os esporos foram homogeneizados e centrifugados novamente, com o intuito de retirar qualquer matéria orgânica aderida aos esporos (ALGAIPI *et al.*, 2020). Para finalizar, descartou-se o sobrenadante e foi inserido 50

mL de água destilada em um dos recipientes. Os esporos foram diluídos nessa água e repassados para os outros recipientes, resultando em uma solução concentrada para cada um dos meios.

As duas soluções concentradas foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro com leitura a 600 nm e a Equação 17 (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; JENA *et al.*, 2020):

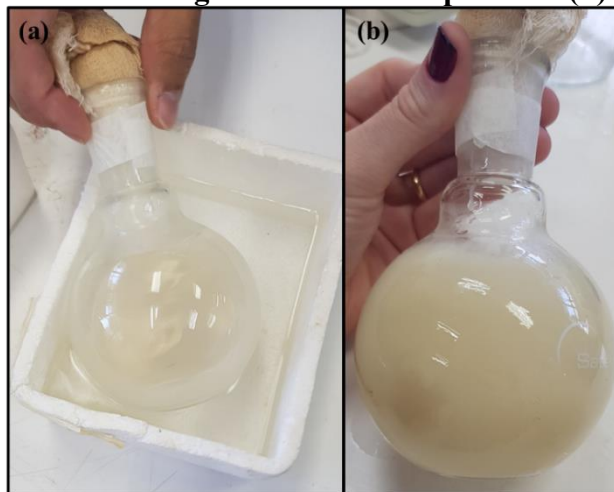
$$X=8,59*10^7*Y^{1,3627} \quad \text{Eq. 17}$$

Onde:

- X é a concentração de esporos/mL e;
- Y é a absorbância lida em espectrofotômetro, a 600 nm.

Na sequência, transferiu-se as soluções para balões de 250 mL para serem congeladas. Este procedimento foi realizado rotacionando os balões dentro de uma caixa térmica com álcool absoluto, à temperatura de -80°C , conforme ilustra a Figura 48(a). Desta forma, os esporos foram congelados na superfície do balão, aumentando a área de superfície, o que agiliza o processo de liofilização. Na Figura 48(b) pode-se visualizar o material congelado na superfície do balão.

Figura 48 – Solução concentrada das bactérias sendo congelada em álcool à -80°C (a) e material congelado ao final do processo (b)



Fonte: Autora.

Por fim, armazenou-se as amostras congeladas no Liofilizador L101 durante 48 horas, para total desidratação. Na Figura 49 pode-se visualizar as amostras sendo liofilizadas.

Figura 49 – Amostras (apontadas pelas setas) sendo liofilizadas



Fonte: Autora.

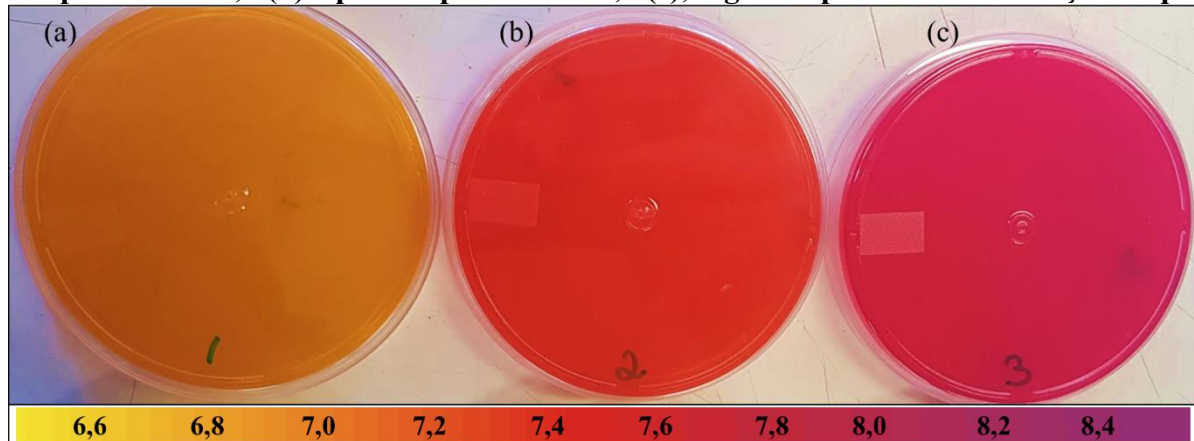
As amostras liofilizadas foram encaminhadas para MEV para caracterização, o equipamento utilizado foi o mesmo da primeira campanha experimental. Além disso para avaliar a quantidade real dos esporos, 3 mg do pó liofilizado foram diluídos em 1 mL de solução salina, que na sequência foi encaminhada para análise em espectrofotômetro. A partir da leitura da absorbância a 600 nm e da aplicação da Equação 17 apresentada no item anterior, obteve-se a quantidade real dos esporos liofilizados.

Com o intuito de avaliar a capacidade de reprodução e precipitação de cristais de CaCO_3 dos esporos liofilizados pela mudança oxidação de compostos orgânicos, foram preparadas placas de petri com o meio B4 com o indicador de pH vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, EUA). Os meios foram preparados em três condições diferentes (MARVASI *et al.*, 2010 e 2013):

- meio 1: B4 padrão, sem tamponar, com pH de 6,7;
- meio 2: B4 neutro, tamponado com pH de 7,2;
- meio 3: B4 alcalino, tamponado com pH de 8,2.

A Figura 50 ilustra os meios prontos, antes do inóculo dos esporos liofilizados e não liofilizados da bactéria selecionada. O pH das placas do meio 2 e 3 foi mantido tamponando o meio com Tris 1,2% e incubado a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 dias.

Figura 50 – Meio B4 com indicador vermelho de fenol padrão, sem tamponar (a), pH tamponado em 7,2 (b) e pH tamponado em 8,2 (c), seguidos pela fita de indicação do pH



Fonte: Autora.

Vale destacar que nesta campanha experimental apenas o teste com o meio B4 com indicadores de pH foi realizado pois não havia a necessidade de testar a bactéria liofilizada pelos mesmos ensaios da 1ª Campanha Experimental, pois o intuito era apenas de verificar se o processo de liofilização inibiria o crescimento bacteriano e a precipitação de cristais.

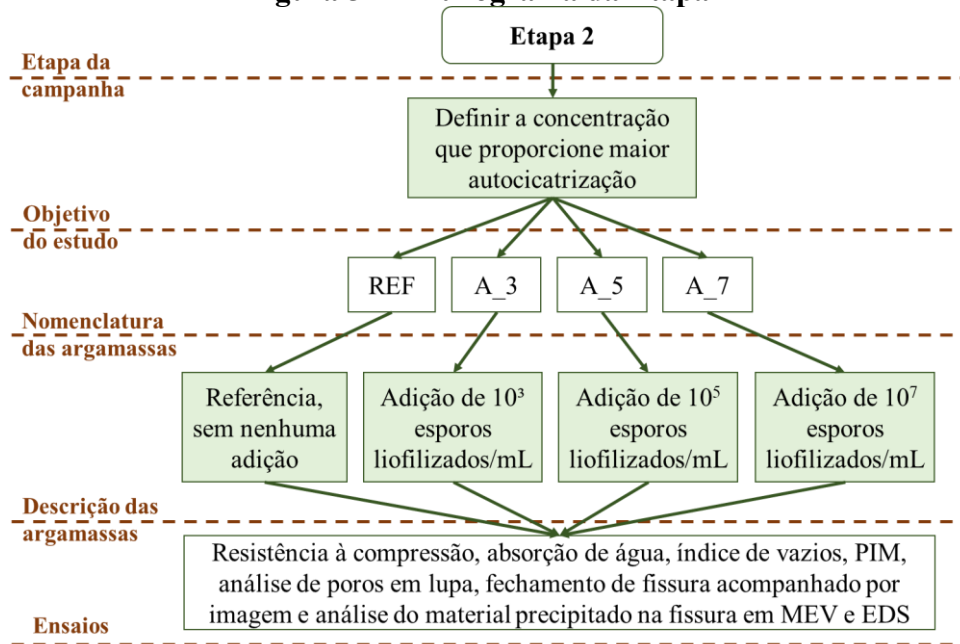
Na sequência, as placas foram analisadas quanto ao crescimento bacteriano e precipitação de CaCO_3 , a partir de análise visual. Das placas crescidas também foram tiradas alíquotas, as quais foram dissolvidas em solução salina para análise no microscópio óptico da marca Motic BA410E com 40 vezes de ampliação.

Realizadas as análises da Etapa 1 com a preparação dos esporos, iniciou-se a Etapa 2.

3.2.2 Etapa 2: Definição da concentração

Na segunda etapa, foi estudada a concentração de bactérias adicionadas às argamassas. O traço utilizado foi de 1:3 (em massa), com relação a/c de 0,54, variando a concentração dos esporos bacterianos em 0 (referência), 10^3 , 10^5 e 10^7 esporos/mL na água de amassamento. A Figura 51 ilustra o objetivo da etapa, a nomenclatura das argamassas estudadas, suas respectivas descrições e os ensaios realizados.

Figura 51 – Fluxograma da Etapa 2



Fonte: Autora.

3.2.2.1 Materiais

Os materiais utilizados nesta etapa foram:

- cimento CP V – ARI;
- areia quartzosa;
- água potável;
- esporos liofilizados da bactéria selecionada na primeira campanha experimental e preparados na Etapa 1.

O cimento CP V – ARI foi selecionado por ser o mais puro e por apresentar maior teor de CaO e MgO, os quais podem ser utilizados pela bactéria na precipitação de carbonato de cálcio (CaCO₃) e dolomita (CaMg(CO₃)₂). Na Tabela 5 tem-se os teores descritos na ficha técnica.

Tabela 5 – Teores de CaO, MgO e CaO livre

Cimento	Teores (%)		
	CaO	MgO	CaO livre
CP V – ARI	61,81	2,80	1,11

Fonte: Fabricante (Setembro/2019).

As características do agregado miúdo empregado foram determinadas de acordo com as normas descritas na Tabela 6. A areia utilizada é quartzosa, proveniente do Rio Paraná.

Tabela 6 – Caracterização do agregado miúdo

Ensaio	Normas	Resultados obtidos
Massa específica	NBR NM 52/2009	2,64 g/cm ³
Massa unitária	NBR NM 45/2006	1,66 g/cm ³
Teor de material pulverulento	NBR NM 46/2003	2,00%
Absorção de água	NBR NM 30/2001	0,56%
Análise granulométrica	NBR NM 248/2003	Módulo de finura: 2,46; Dimensão máxima característica: 4,8 mm

Fonte: Autora.

3.2.2.2 Métodos

Nesta etapa experimental foram estudadas quatro argamassas de traço 1:3 (em massa) e relação a/c de 0,54. Cabe ressaltar que não foi objetivo do trabalho estudar o traço a ser adotado, e sim analisar a autocicatrização promovida pelos esporos em um material cimentício. Sendo assim, o traço adotado foi conforme apresentado por Abo-El-Enien *et al.* (2013), Ghosh *et al.* (2009), Achal *et al.* (2013) e Xu e Yao (2014).

Vale destacar que argamassas foram estudadas por razões de escala, pois de acordo com Tan *et al.*, (2020) as fissuras em concreto geralmente se formam e se propagam na fase da argamassa, desta forma os resultados podem ser aplicáveis na autocicatrização de concretos e outros compósitos cimentícios.

No Quadro 7 estão apresentadas as nomenclaturas das argamassas e suas respectivas descrições e na sequência tem-se a descrição da elaboração das argamassas e dos ensaios realizados.

Quadro 7 – Nomenclatura das argamassas

Nomenclatura	Descrição das argamassas
REF	Argamassa de referência sem nenhuma adição.
A_3	Argamassa com adição de esporos na água de amassamento na concentração de 10 ³ esporos liofilizados/mL.
A_5	Argamassa com adição de esporos na água de amassamento na concentração de 10 ⁵ esporos liofilizados/mL.
A_7	Argamassa com adição de esporos na água de amassamento na concentração de 10 ⁷ esporos liofilizados/mL.

Fonte: Autora.

3.2.2.3 Elaboração das argamassas e ensaios realizados

Para a moldagem dos corpos de prova foi necessário um volume de 4L de argamassa por tratamento, as quais foram elaboradas em misturador planetário. Na Tabela 7

estão apresentadas as quantidades dos materiais utilizados, seguida pelo procedimento de mistura realizado.

Tabela 7 – Quantidades dos materiais da Etapa 2

Argamassas	Cimento (g)	Areia (g)	Água (mL)	Esporos liofilizados (g)
REF	2.252	6.756	1.216	0
A 3				0,0000168*
A 5	2.252	6.756	1.216	0,00168*
A 7				0,168

*Pelas pequenas quantidades do material liofilizado, as soluções de 10^3 e 10^5 foram obtidas por meio de diluição da concentração de 10^7 .

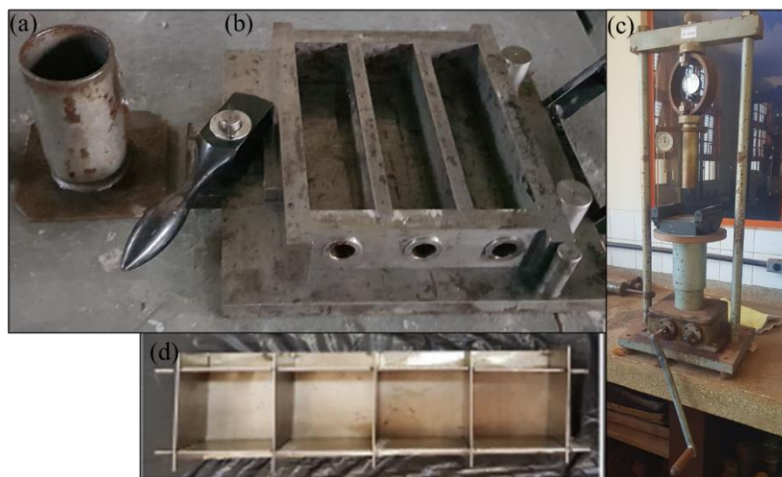
Fonte: Autora.

1. Em um recipiente metálico foram homogeneizados o cimento e a areia;
2. No misturador planetário foram homogeneizadas metade da mistura de cimento e areia com a metade da água de amassamento durante 30 segundos em velocidade baixa,
3. Na sequência adicionou-se o restante do material e da água, ligando o misturador durante 30 segundos em velocidade baixa;
4. A superfície do recipiente foi razada e a argamassa foi misturada por mais 1 minuto, sendo 30 segundos em velocidade alta e 30 segundos em velocidade baixa.
5. Novamente razou-se o recipiente procedeu-se a mistura durante 1 minuto em velocidade baixa, 1 minuto em velocidade alta e 30 segundos em velocidade baixa para finalizar.

Após a mistura, foram realizados os seguintes ensaios no estado fresco: índice de consistência (NBR 13276/2016) e a massa específica (NBR 9833/2009). Em seguida, os corpos de prova foram moldados (Figura 52), sendo que:

- os corpos de prova cilíndricos (Figura 52a) foram adensados em 4 camadas com 30 golpes em cada, conforme prevê a NBR 7215/2019;
- os corpos de prova prismáticos de 40x40x160 mm (Figura 52b) foram adensados em mesa vibratória durante 30 segundos em uma única camada;
- os corpos cúbicos de 40x40x40 mm (Figura 52d) foram adensados em duas camadas, com aplicação de 5 golpes em cada;
- as fissuras foram simuladas nas amostras de 40x40x160 mm a partir do ensaio de flexão em três pontos (LIU *et al.*, 2020), na idade de 7 dias, utilizando uma prensa manual (Figura 52c).

Figura 52 –Moldes e prensa manual utilizada para a fissuração na Etapa 2



Fonte: Autora.

É importante destacar que a fissuração realizada nesta campanha experimental resultou na perda por ruptura de quatro corpos de prova e, por esse motivo, na próxima campanha experimental as amostras a serem fissuradas serão reforçadas com *silver tape* de maneira adaptada ao trabalho realizado por Tan *et al.* (2020) e Skevi *et al.* (2021). Além disso o processo de adensamento em mesa vibratória gerou poros na superfície do corpo de prova e, por esse motivo, na próxima etapa este foi realizado de maneira diferente.

No Quadro 8 tem-se o planejamento experimental desta etapa, com os ensaios realizados, a dimensão dos corpos de prova utilizados, as idades analisadas, o número de corpos de prova por idade e as normas que regem os ensaios.

Quadro 8 – Planejamento experimental da Etapa 2

Ensaio	Dimensão do corpo de prova (mm)	Idades de ensaio (dias)	Nº de corpos de prova por idade	Normas
Resistência à compressão	50x100	7, 28, 63 e 168	5	NBR 7215/2019
Absorção de água e índice de vazios	50x100	28, 63 e 168 dias	3	NBR 9778/2009
Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)	10x10x10 ¹	7 e 168	1	-
Análise de poros em estereoscópio	40x40x40	28 e 168	1	-
Fechamento de fissura	40x40x160 ²	7, 28, 63 e 168	1	-
MEV e EDS do material precipitado na fissura	Amostra retirada da fissura por raspagem ³	168	1	-

¹ As amostras foram retiradas de corpos de prova cilíndricos de 50x100mm, os quais foram rompidos por tração na compressão diametral para a retirada das amostras da parte central do corpo de prova, com o uso de um martelo e pontalete.

² O mesmo corpo de prova foi analisado em todas as idades.

³ As amostras foram obtidas por meio de raspagem, utilizando um bisturi (STUCKRATH *et al.*, 2014).

Fonte: Autora.

Para verificar se houve diferenças significativas entre os resultados dos ensaios de resistência à compressão, absorção de água e índice de vazios o *software* Statistica foi utilizado para realização do teste Tukey.

A PIM, por sua vez, foi realizada no Porosímetro Micromeritics Autopore IV (Figura 53), com pressão de aproximadamente 0,52 a 33.000 psi. Para esta análise, as amostras foram retiradas dos corpos de prova de 50x100 mm após um dia de cura. Para tal, o corpo de prova foi rompido por tração na compressão diametral e as amostras foram retiradas da parte central do corpo de prova, com o uso de um pontalete e martelo. Na sequência as amostras foram armazenadas nos tanques de cura até as idades de ensaio, que foram de 7 e 168 dias.

Figura 53 – Porosímetro Micromeritics Autopore IV



Fonte: Autora.

Para as análises, secaram-se as amostras em estufa à temperatura de 70°C até atingirem constância de massa. Após isso, foram seladas com filme plástico até atingir a temperatura ambiente, para em seguida serem ensaiadas no porosímetro. Vale destacar que para este ensaio apenas uma amostra foi analisada em cada idade pelo ensaio ser demorado e oneroso.

Além da PIM foram capturadas imagens dos poros em estereoscópio. O equipamento utilizado foi da marca Leica (Figura 54) e a análise foi efetuada em amostras de 40x40x40mm nas idades de 28 e 168 dias.

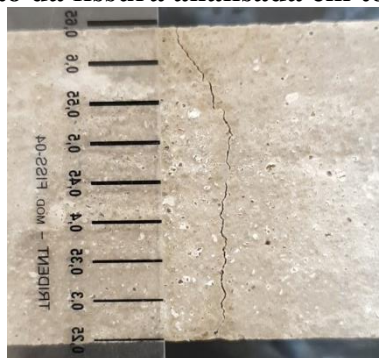
Figura 54 – Lupa Leica



Fonte: Autora.

Concomitantemente aos ensaios relatados, ao longo do período de cura as fissuras foram analisadas por imagem fotográfica. Toda a extensão da fissura foi analisada (Figura 55), sendo que a primeira imagem foi obtida aos 7 dias, imediatamente após a fissuração e acompanhada até a idade de 168 dias. Após esse período, as fissuras foram raspadas para retirada do material precipitado, seguindo o procedimento apresentado por Stuckrath *et al.*, (2014), utilizando um bisturi. Na sequência as amostras retiradas da fissura foram encaminhadas para análise em MEV e EDS, utilizando o mesmo equipamento da primeira campanha experimental.

Figura 55 – Foto da fissura analisada em toda sua extensão



Fonte: Autora.

Vale relatar que, em um primeiro momento, ao invés da fissuração por flexão em 3 pontos uma abertura foi induzida a partir da colocação de uma chapa metálica de 0,42 mm no momento da moldagem dos corpos de prova. Entretanto a abertura formada nesta situação apresentava uma superfície lisa e não porosa, em decorrência da exudação da argamassa ao redor da chapa metálica, se diferenciando de fissuras reais que ocorrem em edificações.

Por esse motivo, os resultados obtidos a partir da abertura induzida pela chapa metálica foram inseridos no Anexo 1, o experimento foi repetido e a fissura foi induzida a partir do ensaio de flexão em 3 pontos. Entretanto os ensaios realizados nestas fissuras foram apenas

de análise visual por imagem, pois as amostras foram moldadas durante o início pandemia de COVID-19, quando o acesso ao laboratório que contém a estereoscópio estava bastante limitado.

Frente ao relatado, ao final desta etapa, a concentração que apresentou o melhor resultado em termos de diminuição da porosidade e fechamento da fissura, sem prejuízos à resistência à compressão, foi selecionada para a aplicação na Terceira Campanha Experimental.

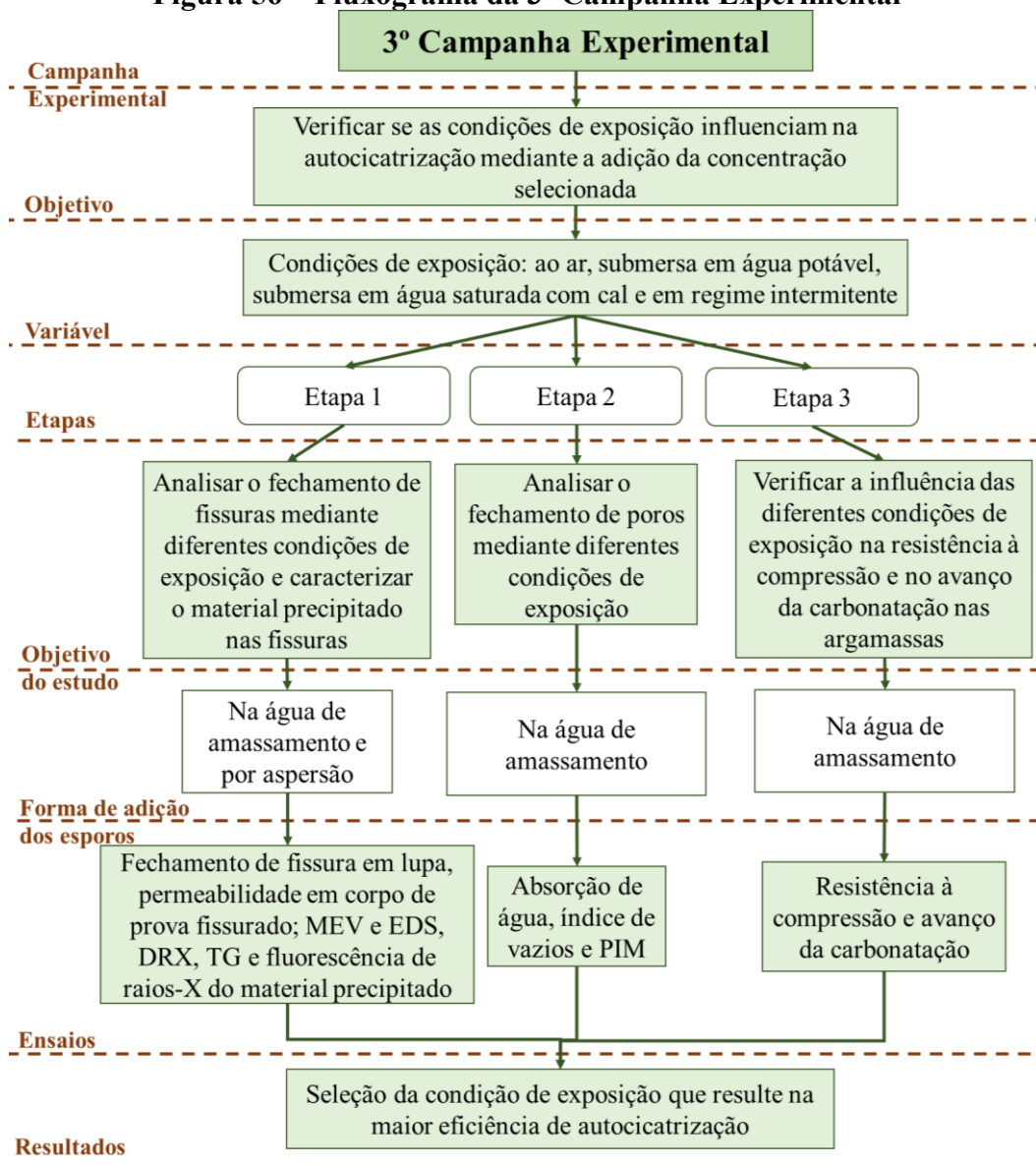
3.3 TERCEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL

A terceira campanha experimental tem como objetivo avaliar a influência da condição de exposição no fechamento de poros e autocicatrização de fissuras. As condições de exposição analisadas foram: ao ar, imersa em água potável, imersa em água saturada com cal e em regime intermitente. Nesta etapa, a bactéria utilizada foi a selecionada na primeira campanha experimental e a concentração adicionada foi a selecionada na segunda campanha, mantendo o traço 1:3 (em massa), relação a/c de 0,54 e materiais utilizados na Segunda Campanha Experimental.

Além disso foi adicionada a esta argamassa uma fonte de cálcio complementar, pois os resultados verificados na segunda campanha experimental apontaram uma diminuição da atuação bacteriana após os 63 dias, possivelmente pela ausência de uma fonte de cálcio. A fonte de cálcio selecionada foi o lactato de cálcio, sendo adicionado em 3% com relação à massa de cimento, com base no levantamento bibliográfico apresentado no item 2.1.7.

Esta última campanha está dividida em três etapas que foram realizadas concomitantemente, conforme ilustra a Figura 56. A Etapa 1 focou na análise do fechamento das fissuras e analisou o material precipitado nelas, enquanto a Etapa 2 estudou o fechamento de poros. A Etapa 3, por fim, está voltada à verificação da resistência à compressão e avanço da carbonatação das argamassas.

Figura 56 – Fluxograma da 3ª Campanha Experimental



Fonte: Autora.

A adição dos esporos como tratamento de superfície (aspersão) foi estudada apenas no do fechamento de fissuras e na análise dos materiais precipitados (Etapa 1), pois em estudos anteriores foi verificado que a adição dos esporos como tratamento de superfície pouco interfere nas demais propriedades das argamassas (SCHWANTES, 2017).

O tratamento de superfície foi realizado a partir da aspersão de uma solução de esporos bacterianos com dispositivo borrifador duas vezes ao dia. A solução possui a mesma concentração de esporos e de lactato de cálcio das amostras que receberam esse tratamento na água de amassamento. O que difere é que as amostras ensaiadas não receberam os esporos e o lactato de cálcio no momento da mistura, mas como tratamento da superfície. Este tratamento

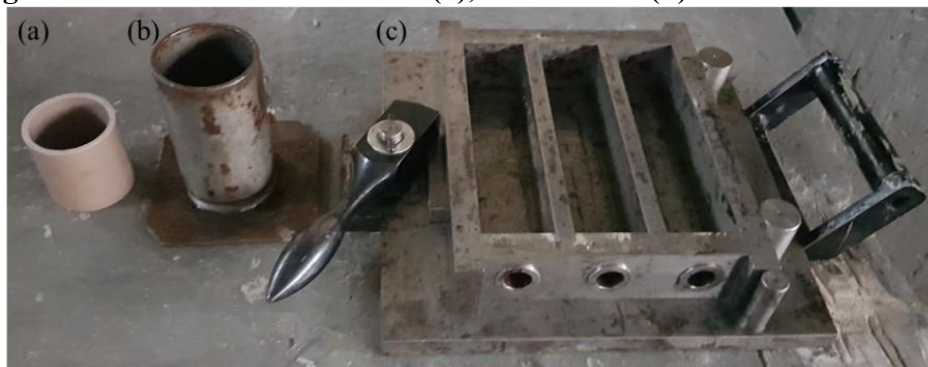
foi estudado apenas na condição de exposição ao ar, por ser a que mais se aproxima da condição real. Vale destacar que também foram moldados corpos de prova de referência para essa análise, os quais não continham lactato e nem esporos na água de amassamento e não foram submetidos ao tratamento de superfície.

A seguir tem-se o detalhamento da Terceira Campanha Experimental, iniciando pela elaboração das argamassas e moldagem dos corpos de prova e na sequência estão apresentados os ensaios no estado fresco e endurecido e o detalhamento das condições de exposição analisadas.

3.3.1 Elaboração das argamassas e moldagem dos corpos de prova

O procedimento de mistura seguiu os mesmos parâmetros e tempos da segunda campanha experimental, sendo realizado em misturador mecânico. No tópico 3.3.2.1 o consumo de materiais será apresentado. Após a elaboração das argamassas os corpos de prova foram moldados e os ensaios no estado fresco foram realizados. Três diferentes moldes foram utilizados, conforme ilustra a Figura 57.

Figura 57 - Moldes de 50x50 mm (a), 50x100 mm (b) e 40x40x160 mm (c)



Fonte: Autora.

Os corpos de prova cilíndricos foram moldados segundo a ABNT NBR 7215/1997, sendo as amostras de avanço de carbonatação, de maneira adaptada, em 2 camadas com 30 golpes em cada camada e os de 50x100 mm adensados em 4 camadas com a aplicação de 30 golpes em cada camada, conforme prevê a norma.

Os corpos de prova prismáticos, por sua vez, foram adensados conforme a ABNT NBR 13279 (2005), utilizando moldes triplos adensados na mesa de consistência. A fixação do molde à mesa foi realizada de maneira adaptada, com o uso de sargentos, conforme ilustra a Figura 58. O adensamento foi realizado em 2 camadas, com a aplicação de 30 golpes em 30 segundos em cada camada, conforme indica a norma.

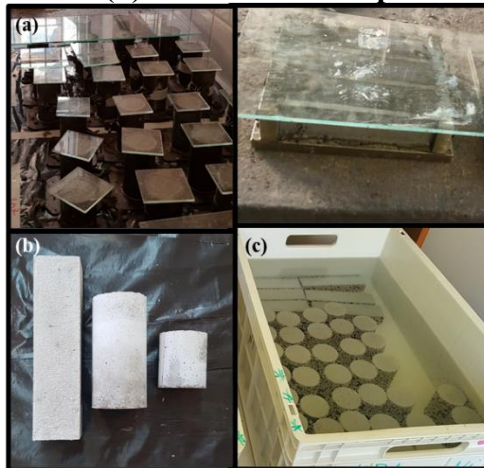
Figura 58 – Adaptação de fixação para o adensamento dos corpos de prova prismáticos



Fonte: Autora.

Após a moldagem dos corpos de prova o material permaneceu nos moldes por 24 horas (Figura 59a) e depois foram desmoldados (Figura 59b), sendo encaminhados para a condição de cura inicial (Figura 59c), submersa em água saturada com cal, por 7 dias. Esta condição de cura inicial foi selecionada por ser a indicada nas normas ABNT NBR 5739 e 7215. Tal procedimento foi adotado para garantir as reações de hidratação do cimento em todas as amostras, evitando variação nos resultados.

Figura 59 – Corpos de prova confinados nos moldes após a moldagem (a), corpos de prova desmoldados (b) e encaminhados para a cura inicial (c)



Fonte: Autora.

Vale destacar que para a condição de cura inicial foram utilizados dois tanques, um para as amostras de referência e outro para as amostras com adição de esporos na água de amassamento, de maneira a evitar a contaminação das mesmas.

Após estes ensaios, os corpos de prova foram moldados, desmoldados após 24 horas e encaminhadas para a cura inicial, submersas em água saturada com cal até a idade de 7 dias e na sequência foram conduzidos para as diferentes condições de exposição a serem estudadas.

Vale destacar que a separação entre cura inicial e condição de exposição foi baseada no levantamento bibliográfico realizado por Zhang *et al.* (2020), que estudaram

diversos artigos sobre autocicatrização e observaram que as amostras eram submetidas a uma condição de cura inicial (normalmente submersa) e depois de fissuradas eram encaminhadas para as condições de exposição, conforme apresentado no item 2.3 da revisão bibliográfica.

3.3.2 Ensaios no estado fresco e no estado endurecido

No estado fresco as argamassas foram ensaiadas quanto ao índice de consistência (ABNT NBR 13276/2005) e a massa específica (ABNT NBR 9833/2009). Com relação aos ensaios no estado endurecido, no Quadro 9 tem-se o planejamento experimental, mostrando os ensaios realizados em cada etapa, as dimensões dos corpos de prova, as idades de ensaio, o número de corpo de provas avaliados por idade e as normas que regem os ensaios.

Quadro 9 – Planejamento experimental dos ensaios no estado endurecido da 3ª Campanha Experimental

	Estudo	Ensaio	Amostras	Idades de ensaio (dias)	Nº de corpos de prova por idade	Normas
Etapa 1	Fechamento de fissuras	Análise do fechamento de fissura em estereoscópio	40x40x160 mm	7, 14, 28, 63 e 168	1 ¹	-
		Permeabilidade em corpo de prova fissurado	40x40x160 mm	7, 14, 28, 63 e 168	2 ¹	-
		MEV e EDS	10x10x10 mm ²	7, 28 e 168	1	-
		MEV e EDS ³	50 mg	168	1	-
		Fluorescência de Raio X ³	50 mg	168	1	-
		DRX ³	50 mg	168	1	-
		Termogravimetria (TG) ³	50 mg	168	1	-
Etapa 2	Fechamento de poros	Absorção de água e Índice de vazios	50x100 mm	28 e 168	3	NBR 9778/2009
		PIM	~10x10x10 mm ²	7 e 168	1	-
Etapa 3	Resistência à compressão e avanço de carbonatação	Resistência à compressão	50x100 mm	7, 28, 63 e 168	5	NBR 5739/2018
		Avanço de carbonatação	50x50 mm ⁴	7, 28, 63 e 168	2	Recomendação CPC – 18 RILEM

¹ A mesma amostra foi analisada no fechamento de fissura ao longo do tempo.

² As amostras foram retiradas de corpos de prova de 50x100 mm, logo após a desmoldagem, com o uso de um martelo e um pontalete. As amostras foram extraídas do centro do corpo de prova, que foi rompido por tração na compressão diametral.

³ As amostras foram retiradas da fissura por raspagem, após 168 dias.

⁴ As amostras cilíndricas foram moldadas em um cano de PVC de 50 mm de diâmetro nominal (44,3 mm de diâmetro interno) sobre uma placa de vidro.

Fonte: Autora.

Vale destacar que as idades de ensaio foram selecionadas com base em experimentos anteriores realizadas pelo grupo de pesquisa e próximas as idades analisadas por Alazhari *et al.* (2018), Nugroho *et al.* (2019) e Tan *et al.* (2020).

É importante mencionar que apenas três corpos de prova prismáticos foram elaborados por condição de exposição decorrente da limitação de moldes disponíveis no laboratório, sendo então um destes para análise do fechamento de fissura em estereoscópio e os outros dois para análise da permeabilidade. Após os 7 dias de cura os corpos de prova prismáticos foram fissurados e todos foram encaminhados para as respectivas condições de exposição, as quais serão detalhadas na sequência.

3.3.2.1 Condições de exposição

As condições de exposição estudadas foram:

- Ao ar (GHOSH *et al.*, 2005 e 2009);
- Submersa em água potável (REDDY *et al.*, 2010; CHAHAL *et al.*, 2012; CHAHAL E SIDDIQUE, 2013; MONDAL e GHOSH, 2018; JENA *et al.*, 2020; ALGAIFI *et al.*, 2020);
- Submersa em água saturada com cal (CHEN *et al.*, 2018);
- Regime intermitente de 12 horas imerso em água potável e 12 horas ao ar (LUO, QIAN e LI, 2015; TZIVILOGLOU *et al.*, 2016; VAN MULLEN *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2020).

Para facilitar a apresentação dos resultados, nomenclaturas foram elaboradas para cada condição de exposição, conforme pode-se visualizar no Quadro 10. As argamassas foram separadas em três grandes grupos, as de referência (sem esporos), as com os esporos bacterianos na água de amassamento (E) e as com esporos no tratamento de superfície (TS).

Quadro 10 – Nomenclatura das argamassas estudadas

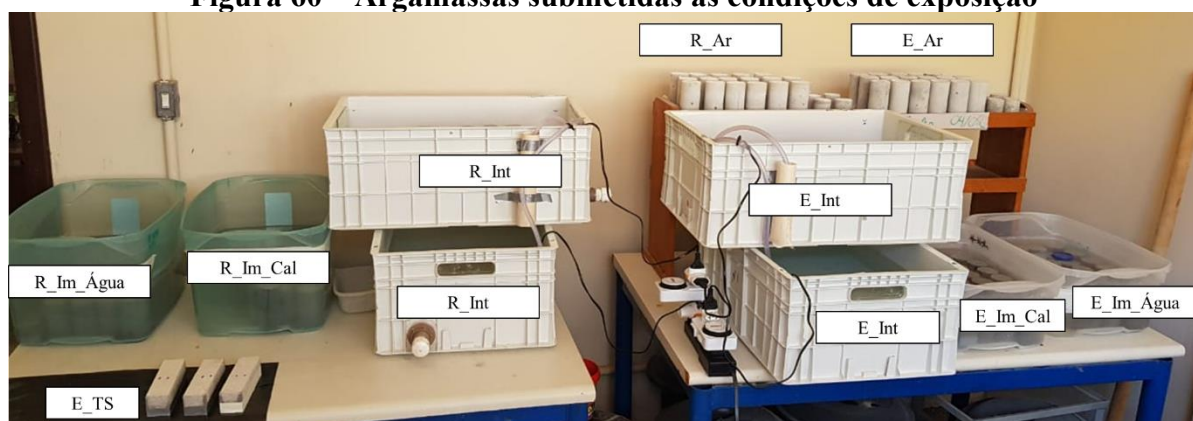
Grupo	Nomenclatura	Amostra
Referência (R)	R_Ar	Argamassa de referência exposta ao ar
	R_Im_Água	Argamassa de referência imersa em água potável
	R_Im_Cal	Argamassa de referência imersa em água com cal
	R_Int	Argamassa de referência submetida ao regime intermitente (12h seco/12h imerso em água)
Esporos bacterianos na água de amassamento (E)	E_Ar	Argamassa com adição de esporos na água de amassamento exposta ao ar
	E_Im_Água	Argamassa com esporos na água de amassamento imersa em água destilada
	E_Im_Cal	Argamassa com esporos na água de amassamento imersa em água com cal
	E_Int	Argamassa com esporos na água de amassamento submetida ao regime intermitente (12h seco/12h imerso em água)
Tratamento de Superfície (TS)	R_TS	Argamassa de referência, exposta ao ar, sem tratamento de superfície
	E_TS	Argamassa exposta ao ar com tratamento de superfície por aspersão de solução bacteriana com lactato de cálcio

Fonte: Autora.

Vale destacar que todas as amostras receberam a adição do lactato de cálcio, no momento da mistura, em 3% com relação à massa de cimento, com exceção das argamassas R_TS e E_TS. Estas duas argamassas ficaram expostas ao ar, por essa condição ser a mais próxima das edificações reais que apresentam fissuras. As argamassas R_TS e E_TS foram elaboradas apenas para análise de fechamento de fissura (Etapa 1), pensando na aplicabilidade da solução bacteriana para o tratamento de fissuras em edificações existentes.

Todas as amostras submetidas as diferentes condições de exposição foram armazenadas em ambiente fechado, no laboratório do NUDE/UEL (Figura 60) à temperatura ambiente ($21\pm 2^\circ\text{C}$).

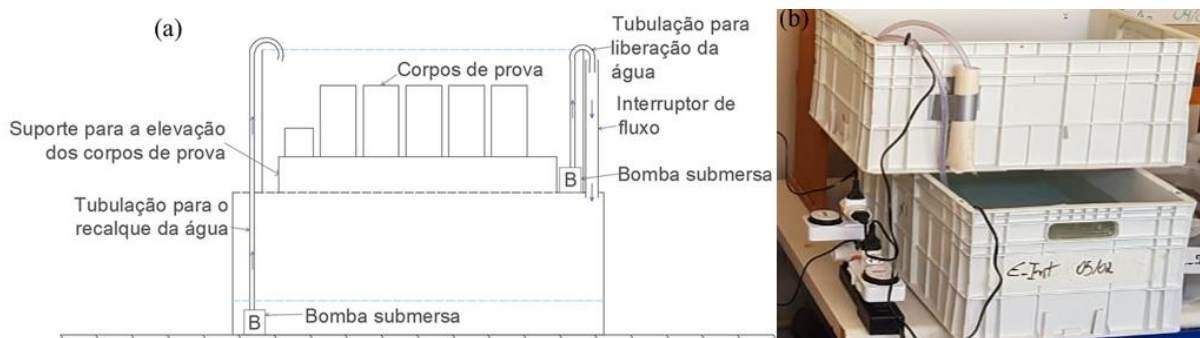
Figura 60 – Argamassas submetidas às condições de exposição



Fonte: Autora.

O sistema intermitente foi elaborado de maneira mecanizada, com bombas submersas de maneira semelhante ao realizado por Tan *et al.* (2020). Para facilitar o entendimento, um croqui do sistema acompanhado da sua foto pode ser visualizado na Figura 61.

Figura 61 – Croqui (a) e foto do sistema intermitente mecanizado (b)



Fonte: Autora.

O sistema foi elaborado com o uso de dois temporizadores, que se alternavam a cada 12 horas. Desta forma as amostras permaneceram 12 horas submersas quando a água estava no tanque superior e 12 horas ao ar, quando a água estava no tanque inferior.

As bombas ficavam ligadas por 15 minutos, tempo suficiente para o recalque e liberação da água, mantendo um nível mínimo de água para que a bomba permanecesse submersa. Vale destacar que no tanque superior foi colocado um suporte para a elevação dos corpos de prova para que a bomba sempre estivesse submersa em água e que os corpos de prova não estivessem em contato com água no período de 12 horas ao ar. A cada semana o nível de água era verificado, devido a evaporação, a fim de garantir a lâmina d'água.

Desta maneira, frente ao planejamento experimental e os grupos de amostras apontados, foram moldados, no total, 130 corpos de prova cilíndricos de 50x100 mm, 52 corpos de prova cilíndricos de 44,3x50 mm e 30 corpos de prova prismáticos de 40x40x160 mm. Destes, 65 corpos de prova cilíndricos de 50x100 mm, 26 cilíndricos de 44,3x50mm e 12 prismáticos de 40x40x160 mm foram moldados tanto para a referência (R) como para a adição de bactérias na concentração de 10^7 esporos/mL na água de amassamento (E). Vale relembrar que o tratamento de superfície foi estudado apenas para o fechamento de fissuras, sendo assim 6 corpos de prova prismáticos foram moldados. No Quadro 11 pode-se visualizar o consumo de materiais para os grupos de amostra analisados.

Quadro 11 – Consumo de materiais

Grupo	Referência (R)	Com os esporos bacterianos na água de amassamento (E)	Tratamento de superfície (TS)
Volume (L)	17,85	17,85	1,54
Cimento (Kg)	10,048	10,048	0,865
Areia (Kg)	30,144	30,144	2,594
Lactato de Cálcio (Kg)	0,301	0,301	0,026
Água (a/c) (L)	5,426	5,426	0,467
Esporos liofilizados da CV16 (Esporos/mL)	-	10^7	10^7 *

* Adição será realizada no tratamento de superfície, por aspersão, apenas na amostra tratada superficialmente. Fonte: Autora.

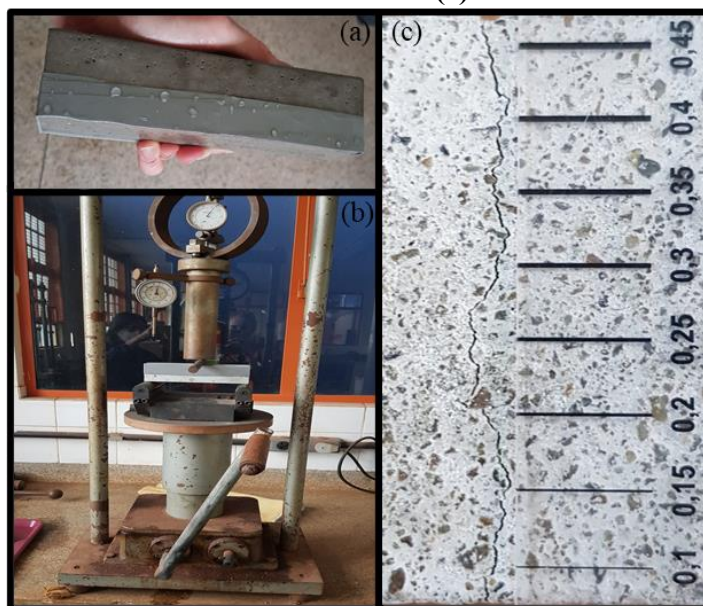
Após a produção das argamassas e o período de cura inicial, os corpos de prova prismáticos foram fissurados para análise das fissuras.

3.3.2.2 Fissuração dos corpos de prova

Os corpos de prova de 40x40x160 mm foram fissurados em ensaio de flexão em três pontos, aos 7 dias de idade, utilizando uma prensa manual. Este procedimento de fissuração foi realizado por diferentes pesquisadores (STUCKRATH *et al.*, 2014; TZIVILOGLOU *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2020). O grande problema relacionado ao ensaio é a ruptura do corpo de prova e a dificuldade de controle da espessura da fissura formada.

Buscando evitar a ruptura, utilizou-se uma fita de alto desempenho (*Silver tape*) (Figura 62a) de maneira adaptada ao realizado por Tan *et al.* (2020) e Skevi *et al.* (2021). Além disso foi utilizada uma prensa manual (Figura 62b) para que a aplicação de carga fosse lenta. Desta forma, no momento da abertura da fissura a aplicação de carga era encerrada, este processo resultou em em fissuras de aproximadamente 0,15 a 0,35 mm (Figura 62c).

Figura 62 – Reforço das amostras com Silver tape (a); Fissuração dos corpos de prova prismáticos em prensa manual (b); Fissuras formadas pelo ensaio ao lado de um fissurômetro (c)



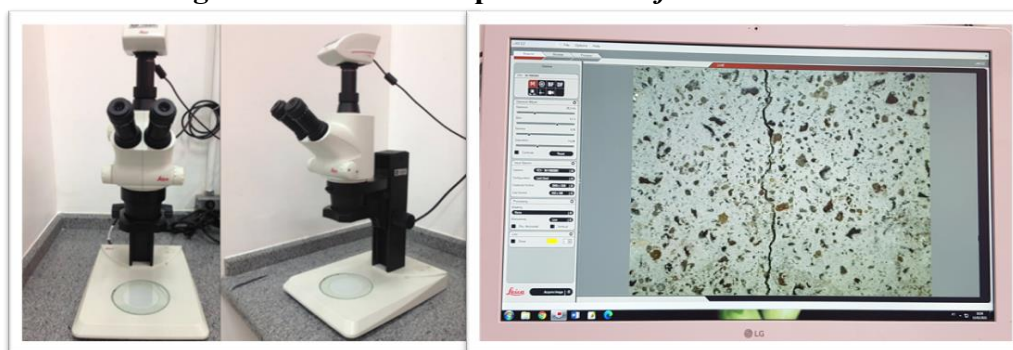
Fonte: Autora.

Após a fissuração dos corpos de prova prismáticos foram realizados os ensaios de análise da fissura em estereoscópio e permeabilidade. Na sequência todas as amostras foram encaminhadas para as diferentes condições de exposição até as idades de ensaio.

3.3.2.3 Análise do fechamento de fissura em estereoscópio

As fissuras formadas foram acompanhadas pela estereoscópio da marca Leica® e processadas pelo *software* LAS – EZ (Figura 63), com ampliação de 20 e 40 vezes em amostras de 40x40x160mm. As idades de ensaio foram de 7, 14, 28, 63 e 168 dias.

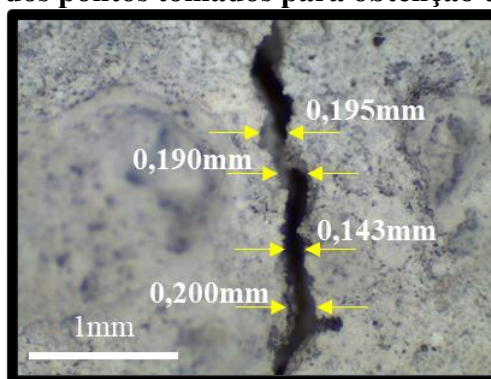
Figura 63 – Estereoscópio Leica e *software* utilizado



Fonte: Autora.

Com o uso da estereoscópio e do *software* LAS -EZ foi medida a espessura inicial da fissura, logo após a fissuração no sétimo dia de cura (E_7) e o acompanhamento dessa espessura foi realizado ao longo do tempo de análise (E_d). Para cada amostra, a espessura foi determinada em quatro pontos, conforme exemplo da Figura 64, e o valor utilizado para o E_d foi a média.

Figura 64 – Exemplo dos pontos tomados para obtenção da espessura média (E_d)



Fonte: Autora.

Vale destacar que sempre se buscou avaliar pontos bem distribuídos, ao centro da fissura, e próximos a algum ponto de fácil identificação, de maneira a facilitar a localização para a medição nas idades posteriores.

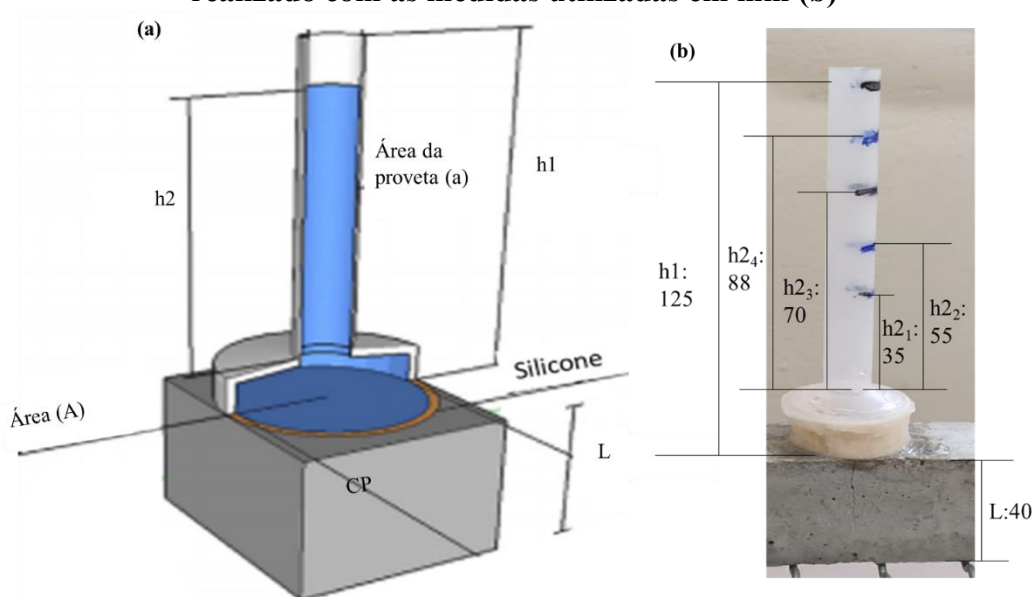
A partir dos dados obtidos, foi calculada a taxa de aut cicatrização (R_w) de acordo com a Equação 1 e foi realizado o acompanhamento desta taxa ao longo do tempo de análise.

3.3.2.4 Análise do fechamento de fissura a partir do ensaio de permeabilidade

Além do cálculo da taxa de autocicatrização realizado pela medição da espessura da fissura por estereoscópio, foi calculada também a taxa de autocicatrização mediante o ensaio de permeabilidade, conforme o método de Teste da Rilem 11.4 (TAN *et al.*, 2020; SKEVI *et al.*, 2021). Este ensaio mede a absorção de água sob baixa pressão e determina o coeficiente de permeabilidade K , através da Equação 2 apresentada anteriormente.

Para medir a permeabilidade com maior precisão, foram padronizadas 4 alturas (h_2), as quais foram uniformemente distribuídas na altura da proveta. Com o uso de um cronômetro, os tempos para atingir as alturas (h_2) foram marcados e a permeabilidade foi calculada. A permeabilidade final da amostra, em cada idade, foi determinada a partir da média entre as 4 leituras, para cada corpo de prova. A Figura 65 ilustra um croqui do ensaio de permeabilidade e uma foto do mesmo, com as marcações e valores das 4 alturas analisadas. Vale ressaltar que a primeira demarcação, próxima ao topo da proveta corresponde a altura h_1 .

Figura 65 – Croqui representativo do teste de permeabilidade (a) e foto do ensaio sendo realizado com as medidas utilizadas em mm (b)



Fonte: Adaptado de Tan *et al.* (2020)^a e autora^b.

O coeficiente de permeabilidade inicial (K_0) foi calculado após a fissuração, aos 7 dias, e o coeficiente K_d após a autocicatrização, de acordo com as idades de ensaio. Obtendo-se assim, a taxa de autocicatrização (R_K) ao longo do tempo (Equação 3).

A fim de facilitar a interpretação e comparação dos resultados entre as amostras, o coeficiente de permeabilidade foi convertido para porcentagem, conforme proposto

por Sandoval *et al.* (2020). Sendo a permeabilidade inicial, aos 7 dias, correspondente a 100%, e as demais foram obtidas a partir de regra de três.

Vale destacar que para cada condição de exposição dois corpos de prova foram ensaiados quanto a permeabilidade. Como se trata de um ensaio não destrutivo, os mesmos corpos de prova foram utilizados nas diferentes idades.

3.3.2.5 MEV e EDS

As análises de MEV e EDS desta campanha experimental foram realizadas no Instituto Senai de Inovação, em Maringá. O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Tescan® modelo Vega3 à alto vácuo.

As amostras de argamassa possuíam aproximadamente 10x10x10 mm e foram retiradas de corpos de prova de 50x100 mm. Estas foram secas em estufa, à temperatura de 70°C até atingirem constância de massa, e ensaiadas nas idades de 7, 28 e 168 dias.

Quanto ao preparo das amostras estas foram aderidas aos *stubs* por meio de fita adesiva de carbono. Feito isso, a amostra seguiu para o equipamento de metalização de superfície a alto vácuo com ouro paládio e posteriormente foi analisada em MEV e EDS.

Vale destacar que além das amostras de argamassas as fissuras também foram raspadas aos 168 dias e encaminhadas para análise em MEV e EDS. A raspagem das fissuras foi realizada com o uso um bisturi (STUCKRATH *et al.*, 2014). As amostras retiradas das fissuras foram aderidas aos *stubs* por meio de uma fita de carbono e metalizadas à vácuo com ouro paládium. Vale destacar que objetivo desta análise foi verificar a morfologia do material precipitado e os elementos químicos presentes.

Além disso as amostras retiradas das fissuras também foram encaminhadas para análise de Fluorescência de Raio X, Difração de Raio X e Termogravimetria.

3.3.2.1 Fluorescência de Raio X

Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Análises por Raio X (LARX) da Universidade Estadual de Londrina, utilizando-se um equipamento Shimadzu, modelo EDX-720 com tubo de Raio X de ânodo Rh e detector de Si (Li). Foram utilizados suportes de amostra de filme fino de poliéster com 2,5" e diâmetro de 63,5 mm e o feixe incidente teve colimação de 10 mm. As medições foram realizadas em dois canais:

- Ti – U a 50 kV, com 13 μ A e tempo de excitação de 100 segundos;
- Na – Sc a 15 kV, com 202 μ A por 100 segundos.

Vale ressaltar que esta análise foi realizada em amostras retiradas das fissuras na idade de 168 dias, as quais foram secas em estufa a 70°C até atingirem constância de massa. O objetivo principal do ensaio foi de auxiliar na análise dos resultados de DRX, pois conhecendo os elementos químicos presentes na amostra se torna mais fácil e assertiva a identificação das fases.

3.3.2.2 *Difração de Raio X (DRX)*

Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Análises por Raio X (LARX), da Universidade Estadual de Londrina, utilizando um difratômetro da marca PANanalytical, modelo X'Pert PRO MPD.

A detecção das fases foi realizada com radiação $\text{CuK}\alpha$, na técnica conhecida como θ - 2θ . A tensão e a corrente a serem utilizadas foram, respectivamente, 40kV e 30 mA. O intervalo de varredura 2θ foi de 10 a 75°, com passo angular de 0,04°. O tempo de contagem por ponto foi de 6 segundos. Para poder desprezar possíveis orientações preferenciais no processo de preparação das amostras em pó, estas foram giradas ciclicamente durante o processo de medida, com um período de 1 segundo.

Além disso a identificação das fases cristalinas, seus pesos relativos e os parâmetros de rede de cada fase foram obtidos por refinamentos de Rietveld nos padrões de difração.

Vale destacar que as amostras para análise de difração de Raio X foram retiradas das fissuras dos corpos de prova por meio de raspagem aos 168 dias e secas em estufa a temperatura de 70°C até atingirem constância de massa. O intuito deste ensaio é verificar quais são os polimorfos de CaCO_3 , evidenciando se as bactérias precipitam calcita, varita ou aragonita.

3.3.2.3 *Termogravimetria (TG)*

Por fim, o ensaio de termogravimetria foi realizado no Laboratório de Espectroscopia (LABESPEC) da Universidade Estadual de Londrina, utilizando-se um módulo de termogravimetria marca Shimadzu modelo TGA-50 com faixa de temperatura variando de 30° a 900°C em atmosfera de nitrogênio. Para o ensaio, aproximadamente 10mg de amostra foram utilizados, os quais foram submetidos a taxa de aquecimento de 20°C/min.

Vale destacar que a taxa de aquecimento que normalmente é utilizada na análise de materiais cimentícios é de 10°C/min, entretanto por conta do número de amostras e

da limitação de dias para a realização do ensaio em decorrência da pandemia de COVID-19, um teste foi realizado em uma mesma amostra com as duas taxas de aquecimento (10 e 20°C/min). Como não foram verificadas diferenças significativas, a taxa de 20°C/min foi adotada.

Em paralelo aos ensaios realizados na Etapa 1, os ensaios da Etapa 2 e 3 também foram conduzidos. Seus detalhes estão apresentados na sequência.

3.3.2.4 *Absorção de água e índice de vazios*

O ensaio de absorção de água e índice de vazios foi realizado de acordo com os requisitos da ABNT NBR 9778/2009, nas idades de 28 e 168 dias. Para garantir que não houvesse influência nos resultados, na moldagem dos corpos de prova para este ensaio não foi utilizado desmoldante.

3.3.2.5 *Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)*

As análises de PIM foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina em amostras de aproximadamente 10x10x10 mm retiradas de corpos de prova de 50x100 mm. Os parâmetros e o equipamento utilizado foram os mesmos da segunda campanha experimental (Porosímetro Micromeritics Autopore IV, com pressão de aproximadamente 0,52 a 33.000 psi). Para este ensaio, as amostras também foram secas em estufa à temperatura de 70°C até atingirem constância de massa.

3.3.2.6 *Resistência à compressão e avanço da carbonatação*

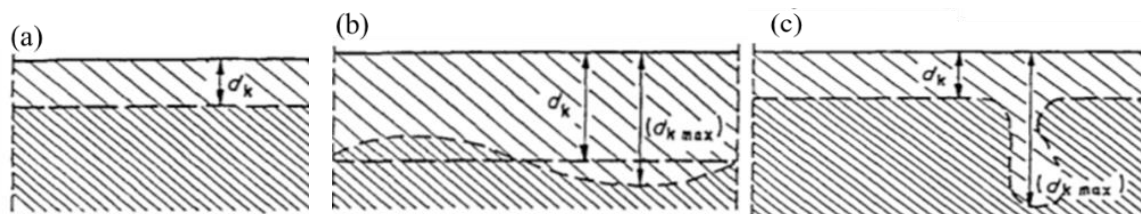
Na etapa 3, o ensaio de resistência à compressão e a análise do avanço de carbonatação foram realizados. O ensaio de resistência à compressão seguiu os parâmetros da ABNT NBR 5739 e foi realizado nas diferentes condições de exposição. Foram rompidos em 5 corpos de prova de 50x100 mm (n=5) por condição de exposição em cada idade de ensaio. O desvio máximo relativo foi determinado, conforme descreve a ABNT NBR 7215. No caso de desvios superiores à 6%, a amostra discrepante foi eliminada, conforme prevê a norma e uma nova média foi determinada.

A análise do avanço da carbonatação, por sua vez, seguiu as Recomendações do CPC – 18 (RILEM, 1988), sendo realizada a partir da aspensão de uma solução de 1% de fenolftalina em 70% de álcool etílico (1 g de fenolftaleína dissolvida em 70 mL de álcool etílico

e 30 mL de água) em amostras de 44,3 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Foram ensaiados dois corpos de prova para cada condição de exposição ($n=2$).

A solução foi aplicada nas amostras com o uso de um borrifador, nas idades de 7, 28, 63 e 168 dias, e analisada 24 horas após a aplicação, conforme indicado no CPC – 18 (RILEM, 1988). A profundidade carbonatada foi medida usando um paquímetro digital e levando em consideração três possíveis situações, conforme ilustra a Figura 66.

Figura 66 – Situações para a medição do avanço de carbonatação



Fonte: RILEM (1988).

Na situação (a) tem-se uma frente de carbonatação paralela a superfície da amostra, sendo a espessura carbonatada d_k ; em (b) tem-se uma variação entre as profundidades carbonatadas de maneira não discrepante, neste caso deve-se calcular a média como espessura carbonatada d_k , mas deve-se anotar também a profundidade máxima ($d_{k \max}$); e por fim, tem-se a situação (c), com a frente de carbonatação paralela a superfície, entretanto com áreas carbonatadas mais profundas e isoladas. Neste caso deve-se tomar nota da profundidade d_k e da profundidade máxima ($d_{k \max}$), mas nenhuma média deve ser calculada (RILEM, 1988).

Cuidados devem ser tomados no momento da aspersion da solução sobre a superfície do corpo de prova para que esta cubra toda a área a ser analisada, de maneira uniforme e sem excesso, pois caso a solução escorra o resultado será distorcido. Vale relembrar que quando a solução é aplicada sobre o material cimentício, a área não carbonatada fica rosada e na área carbonatada não há mudança de coloração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo estão apresentados os resultados e discussões provenientes das campanhas experimentais realizadas.

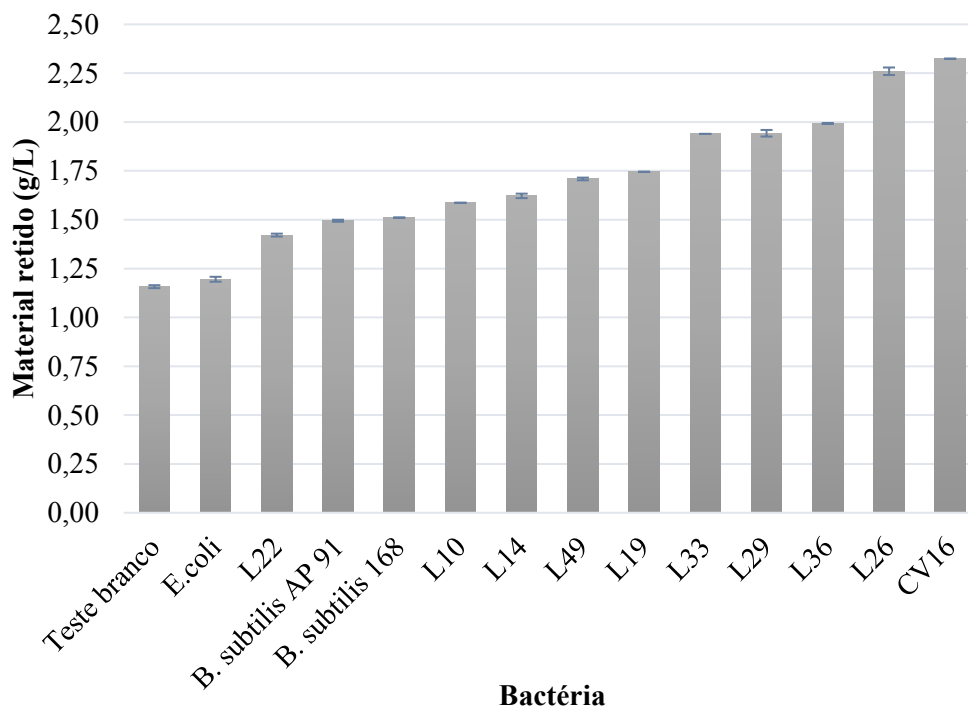
4.1 PRIMEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL

Selecionar a bactéria com maior capacidade de precipitação de CaCO_3 , entender como é a morfologia dos cristais precipitados e os possíveis mecanismos envolvidos na precipitação foram os objetivos da primeira campanha experimental. Portanto na sequência, estão apresentados os resultados obtidos nas Etapas 1 e 2.

4.1.1 Etapa 1: Seleção da bactéria com maior capacidade de precipitação de CaCO_3 *in vitro*

O primeiro teste realizado foi de precipitação, *in vitro*, do CaCO_3 a partir do meio de precipitação B4 (MARVASI *et al.*, 2013), que ocorre pela mudança de pH. O resultado está apresentado na Figura 67, lembrando que o teste branco é apenas o meio de cultivo, o controle negativo foi efetuado com o inóculo da bactéria *E. coli*, o controle positivo foi com o inóculo das bactérias *B. subtilis* 168, *B. subtilis* AP91 e que 10 bactérias isoladas de caverna (*L10*, *CV16*, *L14*, *L19*, *L22*, *L26*, *L29*, *L33*, *L36* e *L49*) foram testadas.

Figura 67 – Resultados da precipitação *in vitro* no meio B4



Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 67, pode-se observar que apenas uma bactéria isolada de caverna, a *L22*, precipitou menos material do que as duas cepas de *B. subtilis*, as demais apresentaram um potencial de precipitação maior, sendo que as bactérias com maior capacidade de precipitação foram as isoladas de caverna denominadas como *CV16*, *L26* e *L36*.

Ao comparar-se a bactéria *CV16*, que apresentou o maior potencial de precipitação, com as cepas de *B. subtilis* AP91 e 168, observou-se um aumento de aproximadamente 50% na precipitação. Desta forma, a utilização da bactéria *CV16*, que *in vitro* apresentou um resultado de precipitação de CaCO_3 maior do que as já utilizadas em pesquisas nacionais e internacionais, pode proporcionar melhores resultados de autocicatrização de fissuras quando aplicada aos materiais cimentícios. Por esse motivo, a bactéria *CV16* foi selecionada para as próximas campanhas experimentais.

Banks *et al.* (2010) afirmam que bactérias isoladas de caverna têm potencial de precipitação de CaCO_3 , pois a formação de estalactites e estalagmites em cavernas não é mais considerado apenas um processo abiótico, já que estudos recentes comprovaram que microrganismos participam ativamente nessa formação.

Além disso se as bactérias isoladas de caverna tiverem a enzima urease no seu genoma, a partir de urina de mamíferos, é possível que as bactérias ureolíticas cresçam em cavernas, sequestram o CO_2 presente no ambiente e precipitem carbonatos (JOHNSTON *et al.*, 2012, ORTIZ *et al.*, 2013 e OKYAY e RODRIGUES, 2015). Este mecanismo de precipitação de CaCO_3 é conhecido como hidrólise da ureia e é um mecanismo amplamente estudado quando as bactérias são aplicadas aos materiais cimentícios.

Desta forma, a bactéria isolada de caverna denominada de *CV16*, que precipitou aproximadamente 2,3 g/L (em média 50% a mais do que as cepas de *B. subtilis*), foi selecionada para dar continuidade à pesquisa.

4.1.2 Etapa 2: Morfologia dos cristais precipitados e mecanismo de precipitação da bactéria selecionada

4.1.2.1 Estudo da morfologia em MEV e EDS

Após o ensaio de quantificação do precipitado *in vitro*, a bactéria isolada de caverna que apresentou melhor desempenho na precipitação de CaCO_3 (*CV16*) foi selecionada para análises em MEV e EDS, juntamente com o teste branco (sem inóculo de nenhuma bactéria), a bactéria *E. coli* (controle negativo) e as bactérias *B. subtilis* AP91 e *B. subtilis* 168 (controles positivos).

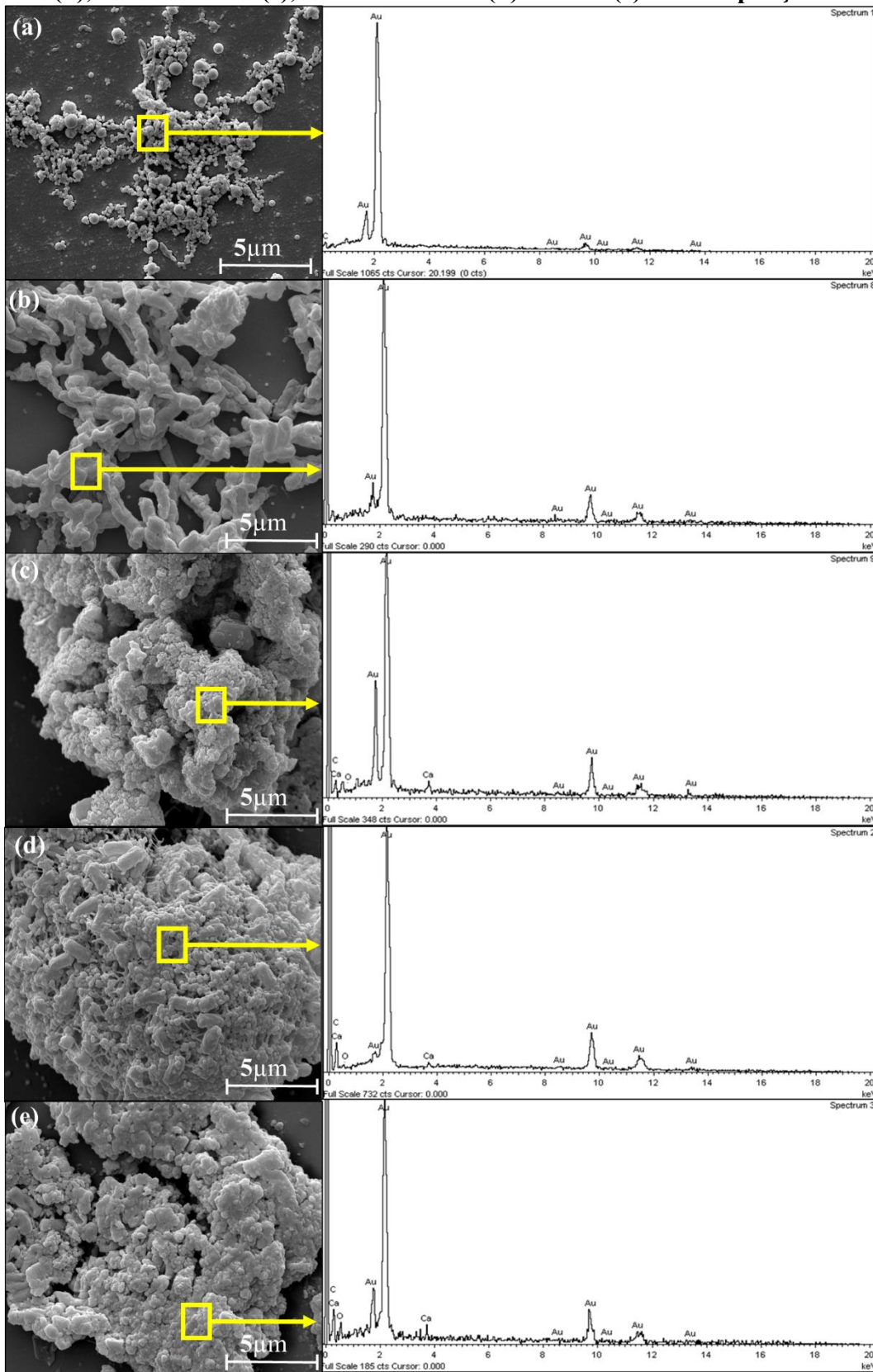
A Figura 68 ilustra em (a) apenas o meio de cultivo, sem bactérias, denominado de teste branco, em (b) o controle negativo com a bactéria *E. coli*, em (c) a bactéria *B. subtilis* 168, em (d) a bactéria *B. subtilis* AP91 e em (e) *CV16*, juntamente com os espectros de EDS mostrando os elementos químicos presentes em cada amostra.

Vale lembrar que os picos de ouro (Au) apresentados nos difratômetros são provenientes do tratamento de superfície realizado para aquisição das imagens. Normalmente os estudos apresentados na bibliografia analisaram o EDS com um recobrimento de carbono e, após a obtenção dos difratômetros, cobrem a amostra com ouro para aquisição de imagens de maior qualidade. Porém apenas com o recobrimento de carbono não é possível obter uma imagem de qualidade, impossibilitando o cruzamento de uma imagem de uma área específica com sua composição química obtida pelo EDS.

A partir da análise da Figura 68 pode-se observar que no teste branco, sem bactérias, (Figura 68a) não houve contaminação, pois não foram encontradas cepas bacterianas nas amostras, apenas resíduos do meio de cultivo. No controle negativo, não houve a precipitação de CaCO_3 , pois seus elementos não foram evidenciados no difratograma e também as imagens nos mostraram apenas células bacterianas (Figura 68 (b)).

Nas amostras com as bactérias *B. subtilis* 168 e AP91 (Figura 68 (c) e (d)) e na bactéria *CV16* (Figura 68 (e)), houve a precipitação de CaCO_3 , verificada por imagem e também na presença dos elementos químicos cálcio (Ca), carbono (C) e oxigênio (O) no EDS. De acordo com Wiktor e Jonkers (2011), Nguyen *et al.* (2019) e Algaifi *et al.* (2020) a presença destes três elementos químicos está associada à precipitação de CaCO_3 promovida pela atividade bacteriana. Vale destacar que a morfologia dos cristais encontrados nas bactérias testadas é semelhante a resultados já apresentados na literatura (HAMMES *et al.*, 2003; BRAISSANT *et al.*, 2003; DUPRAZ *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2012; DASKALAKIS *et al.*, 2015).

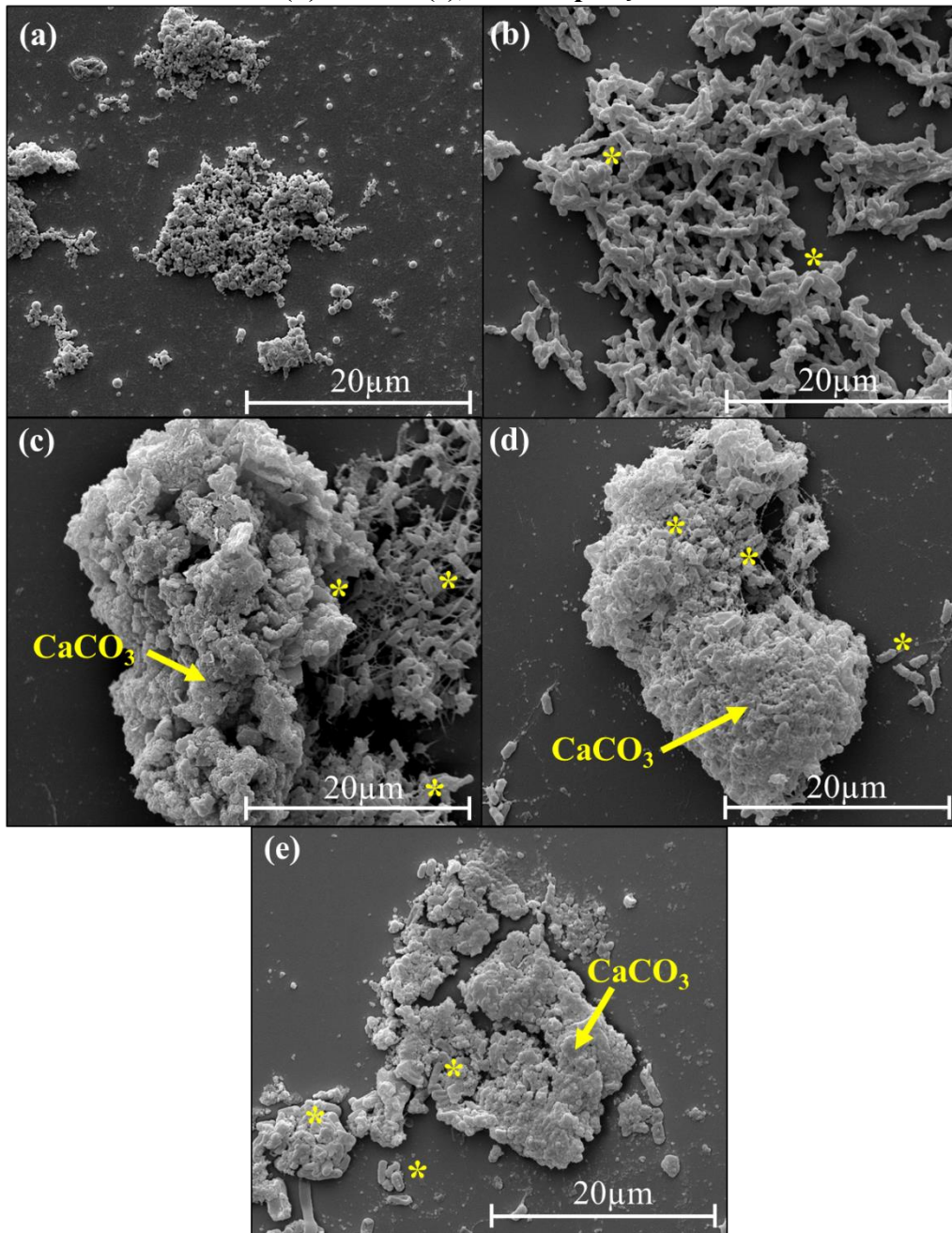
Figura 68 – MEV e EDS das amostras do teste branco (a) e dos inóculos das bactérias *E. coli* (b), *B. subtilis* 168 (c), *B. subtilis* AP91 (d) e *CV16* (e) com ampliação de 15.000 vezes.



Fonte: Autora.

Além das imagens apresentadas, tem-se na Figura 69 outras imagens de MEV com ampliação de 6.000 vezes. As flechas apontam para o CaCO_3 precipitado e os asteriscos “*” destacam a presença das bactérias. Vale ressaltar que a Figura 69 (a) ilustra apenas resíduos do meio de cultivo, pois não havia inóculo de nenhuma bactéria. A amostra de controle é importante para verificar que não houve contaminação do meio e que apenas as bactérias inoculadas estavam presentes.

Figura 69 – MEV das amostras do teste branco (a), *E. coli* (b), *B. subtilis* 168 (c), *B. subtilis* AP91 (d) e *CV16* (e), com ampliação de 6.000 vezes



Fonte: Autora.

É importante destacar que a análise de imagens de MEV é qualitativa e não quantitativa. A partir da comparação das bactérias estudadas, pode-se observar nas Figuras 68 e 69 que houve a precipitação de cristais com morfologia típica de CaCO_3 .

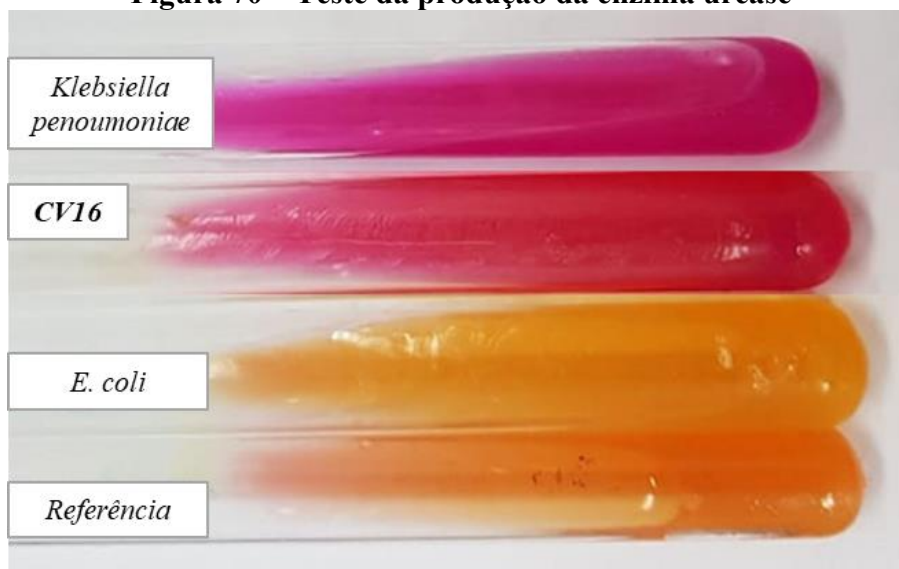
Além disso como a bactéria *CV16*, selecionada na Etapa 1, é uma bactéria isolada de caverna, a mesma precisa ser identificada. Outro aspecto importante é que mais estudos precisam ser conduzidos para um melhor entendimento dos mecanismos de precipitação, além da mudança de pH. Por esse motivo, foi realizado teste de produção da enzima urease e a precipitação em meio alcalino.

4.1.3 Produção da enzima urease

A produção da enzima urease foi efetuada a partir do meio ágar ureia de Christensen, no qual o resultado se dá por mudança de coloração. Se houver a produção da enzima, a coloração do meio muda para rosa e, caso não houver, permanece amarelo.

O resultado deste ensaio está representado na Figura 70, onde a referência não recebeu inóculo de nenhuma bactéria, o controle negativo foi a bactéria *E. coli* DH5 α , não produtora da enzima, a bactéria testada foi a *CV16* e o controle positivo foi realizada com a bactéria *Klebsiella penoumoniae*, produtora de urease.

Figura 70 – Teste da produção da enzima urease



Fonte: Autora.

O meio com a incubação da bactéria *E. coli* apresentou uma coloração amarela, semelhante à referência sem bactéria, evidenciando que não houve a produção da enzima, o que já era esperado. A bactéria *CV16*, por sua vez, teve uma mudança de coloração

igual ao controle positivo, com a bactéria *Klebsiella penoumoniae*, acusando que esta produz a enzima urease.

A maioria das bactérias utilizadas na precipitação de CaCO_3 são bactérias ureolíticas (produtoras da enzima urease), pois um dos mecanismos de precipitação de CaCO_3 mais conhecido é justamente pela hidrólise da ureia. Entretanto várias bactérias são capazes de produzir cristais de CaCO_3 sem hidrolisar a ureia (JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021). De acordo com Zhang e colaboradores (2019) a precipitação de CaCO_3 sem a hidrólise da ureia, a partir da metabolização de ccompostos orgânicos em carbonato é considerado um processo mais ecológico.

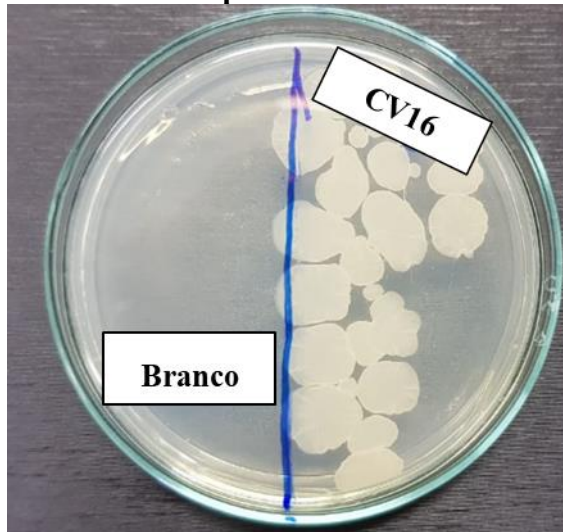
Além do estudo da produção da enzima urease, outro ponto que precisa ser estudado é a viabilidade de crescimento e capacidade de precipitação de CaCO_3 de bactérias em contato com ambientes alcalinos, pois o pH dos materiais cimentícios é em torno de 12 e pode restringir o crescimento bacteriano. Por esse motivo, foram conduzidos estudos da precipitação *in vitro* da bactéria *CVI6* em meio alcalino, para verificar se este inibe seu crescimento e a precipitação de CaCO_3 .

4.1.4 Teste de precipitação em meio alcalino

O teste de precipitação em meio alcalino foi realizado com o intuito de verificar se a alcalinidade seria capaz de inibir o crescimento bacteriano e consequentemente limitar a autocicatrização quando a bactéria fosse adicionada ao material cimentício.

Após 7 dias em que os meios alcalinos (referência sem bactéria e inóculo da bactéria *CVI6*) ficaram armazenados em agitador, uma alíquota de cada meio foi passada para a metade de uma placa de petri com o meio de cultivo *Mueller Hinton*. O resultado está ilustrado na Figura 71.

Figura 71 – Placa de petri com meio Mueller Hinton

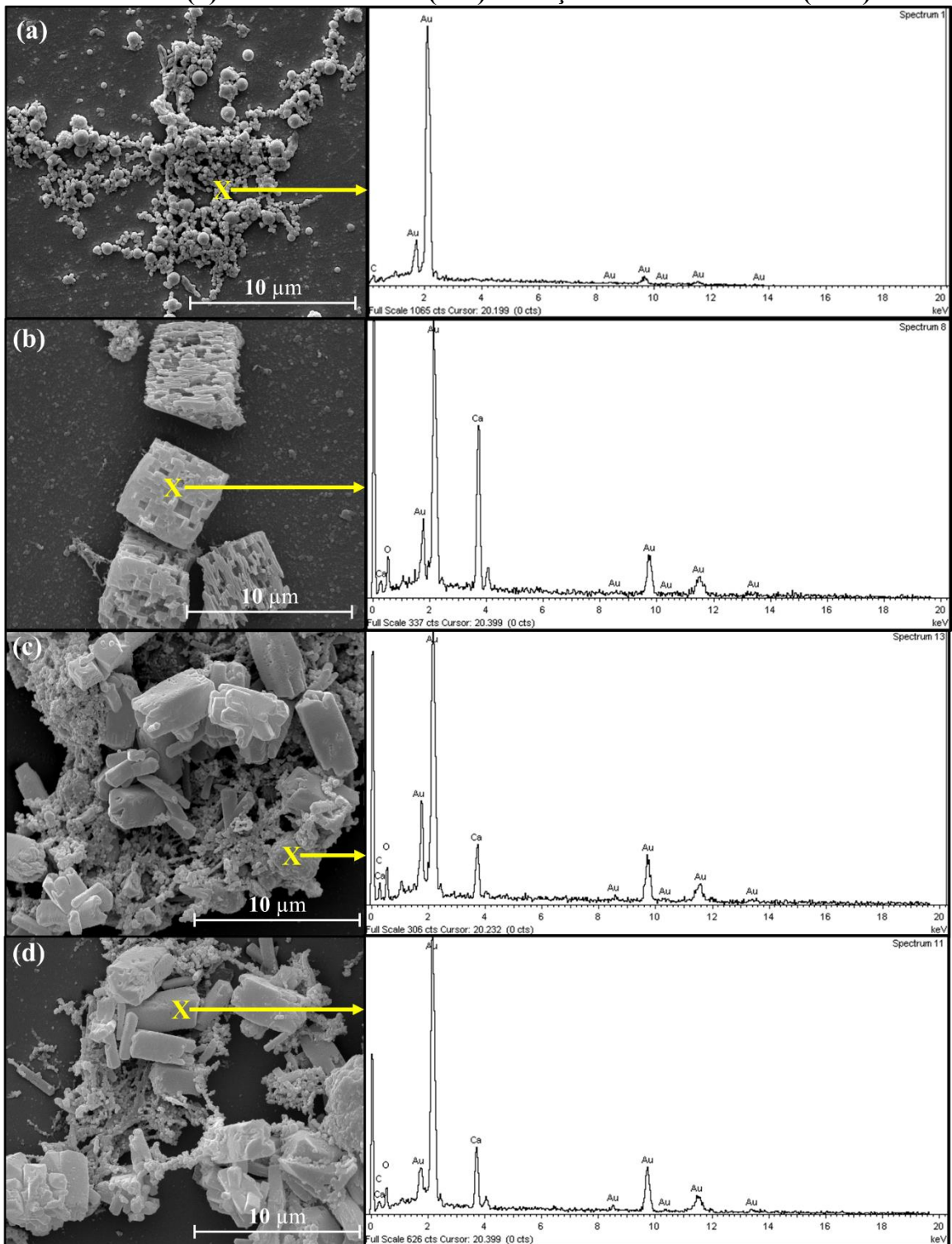


Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 71, observou-se que o meio de cultura não foi contaminado, pois no teste branco (referência sem bactéria) não houve crescimento na placa. Verificou-se ainda que o pH alcalino do meio de cultivo não foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *CV16*, que cresceu normalmente na placa.

Para a análise da precipitação do CaCO_3 , não foi possível realizar a quantificação por filtração, pois rapidamente havia a colmatação dos poros e o rompimento do papel filtro. Portanto foram analisadas alíquotas em Microscópio Eletrônico de Varredura e Sistema de Energia Dispersiva, os resultados estão ilustrados na Figura 72.

Figura 72 – MEV e EDS das amostras: meio B4 (a), meio B4 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e sem bactérias (b) e meio B4 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e adição da bactéria *CV16* (c e d)

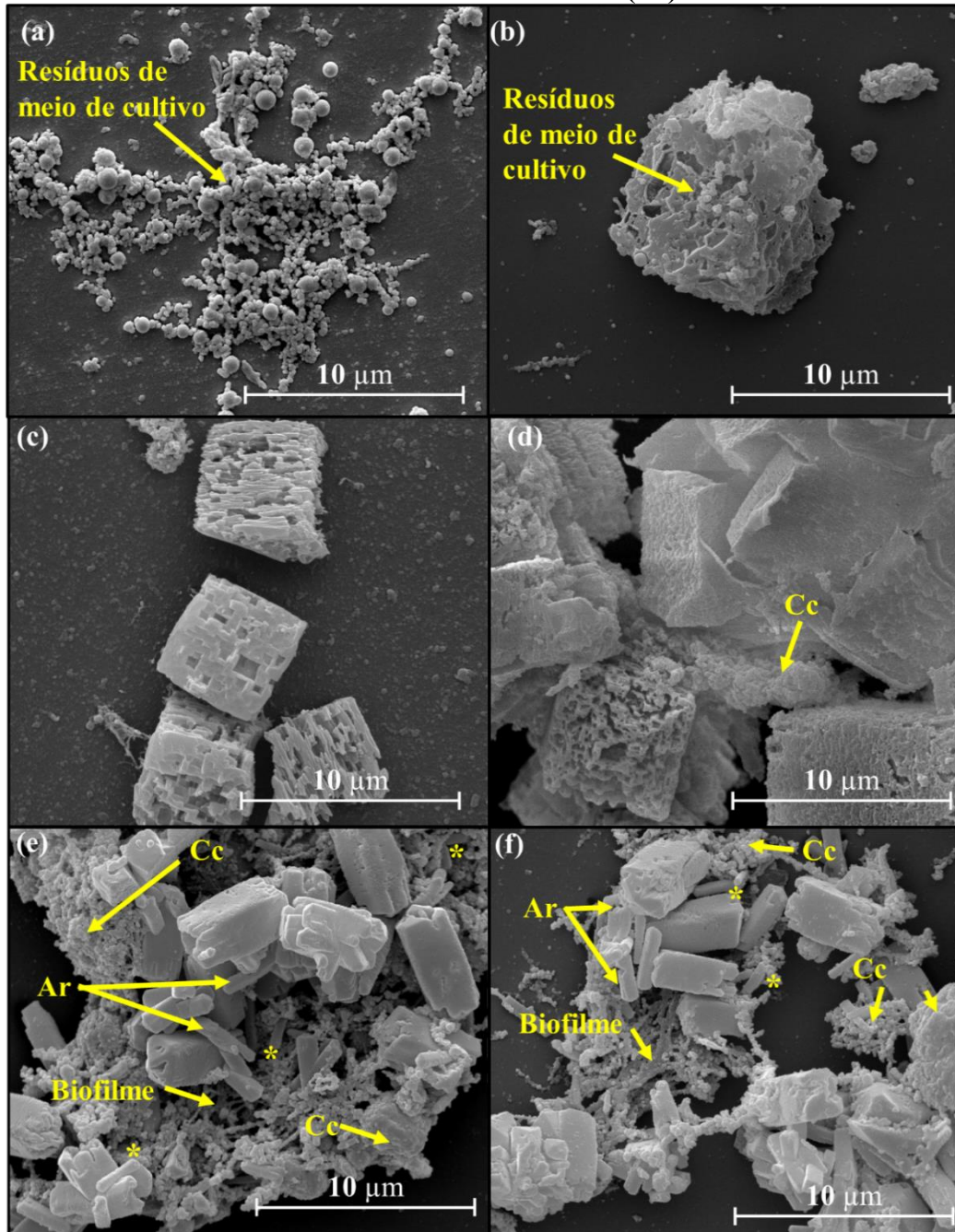


Fonte: Autora.

A partir da análise das imagens de MEV e dos difratogramas do EDS, confirmou-se o que foi verificado pelo crescimento da bactéria na placa, a bactéria *CV16* foi capaz sobreviver no meio mesmo com o pH alcalino, produzindo biofilme e CaCO_3 . As

estruturas formadas estão indicadas na Figura 73, destacando que Cc indica a morfologia típica de calcita, Ar a de aragonita e que os asteriscos ilustram as cepas bacterianas encontradas.

Figura 73 – MEV com ampliação de 12.000x do meio B4 sem o inóculo da bactéria (a e b), do meio B4 alcalino (com $\text{Ca}(\text{OH})_2$) e sem bactéria (c e d) e do meio B4 alcalino com o inóculo da bactéria *CV16* (e-f)



Fonte: Autora.

A morfologia dos cristais de calcita é semelhante à encontrada na análise da morfologia em MEV realizada anteriormente (Figuras 68 e 67), quando as bactérias foram inoculadas ao meio B4 sem hidróxido de cálcio. Porém quando o hidróxido de cálcio foi adicionado encontrou-se também cristais de morfologia típica de aragonita (prismas alongados)

e estruturas em forma de paralelepípedo, com a superfície bem definida e pouco porosa. Ao analisar o EDS destes cristais em forma de paralelepípedo, observou-se picos de cálcio (Ca), carbono (C) e oxigênio (O).

A morfologia dos cristais de aragonita encontrados na Figura 73 corroboram com o apresentado na literatura por Konno *et al.* (2002) e os de calcita por Braissant *et al.*, (2003), Muynck *et al.* (2008), Park *et al.* (2012) e Schwantes-Cezario *et al.* (2017).

Para finalizar a Primeira Campanha Experimental, o teste complementar de sequenciamento do genoma completo foi realizado para a identificação da bactéria *CV16*, isolada de caverna.

4.1.5 Teste complementar: Sequenciamento do genoma completo

Utilizando as leituras cruas do sequenciamento foram obtidos 52 *contigs* com o programa IDBA (PENG *et al.*, 2010). O programa CONTIGuator gerou a sequência *scaffold*, que teve seus *gaps* tratados até que houvesse o fechamento do cromossomo completo do isolado. A sequência final da bactéria *CV16* possui 4.200.973 pares de bases, 4.380 sequências codificantes (CDS), 117 sequências ligadas a RNA e um teor G +C (Guanina + Citosina) de 43,7%.

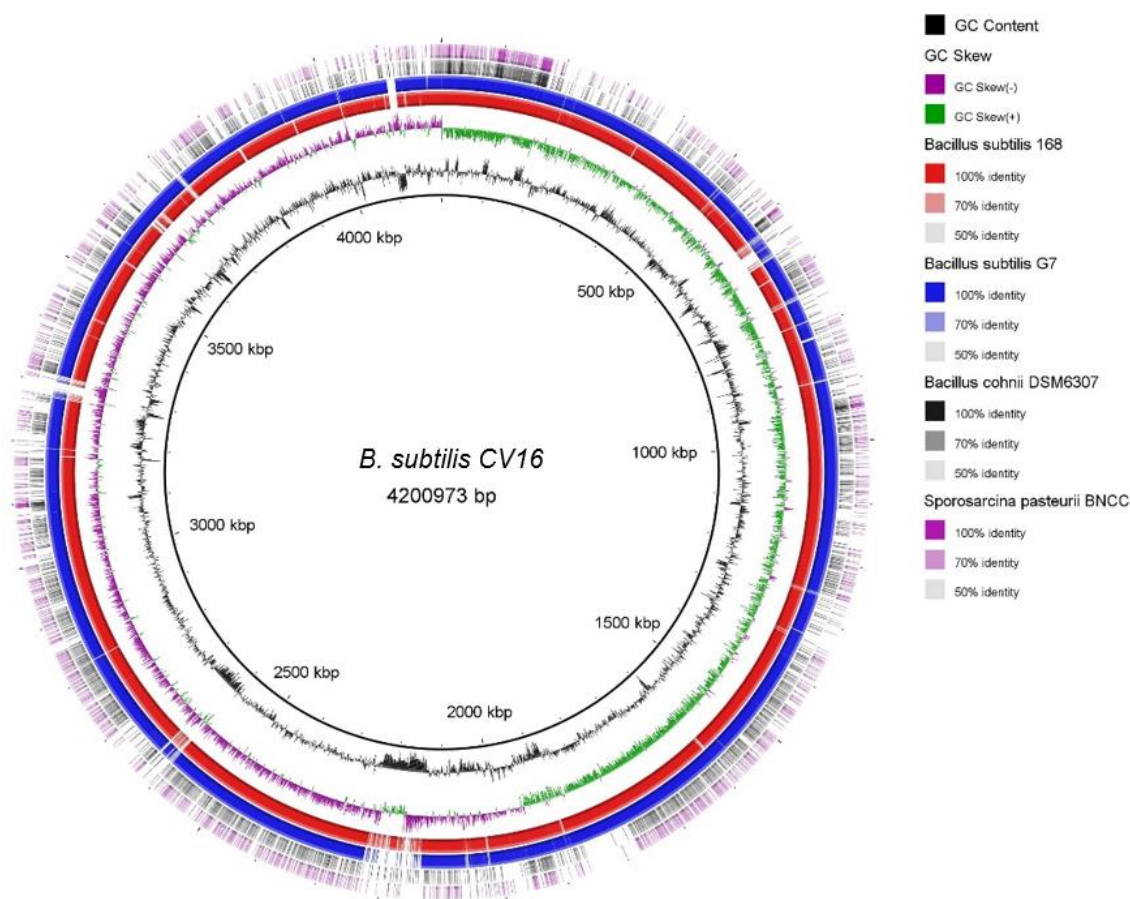
Segundo as análises comparativas o isolado pertence a espécie *Bacillus subtilis* devido à alta similaridade com isolados desta espécie utilizando as ferramentas orthoANI e GGDC. Os valores de identidade se encontram no Anexo 2.

Outro aspecto importante avaliado a partir de análises do genoma completo está relacionado a atividade apresentada pelo isolado de precipitação de carbonato de cálcio. A literatura aponta que o gene *eftA* esteja intimamente ligado a esta resposta fisiológica, de acordo com estudos realizados em mutantes (MARVASI *et al.*, 2010). Com a ferramenta BLAST este gene foi encontrado no genoma da cepa *CV16* com 99% de similaridade, comprovando que a cepa possui importantes fatores genéticos ligados a atividade de precipitação de CaCO₃. Vale destacar que genes envolvidos na formação de biofilme e produção de esporos também estão presentes no genoma de *CV16* (Anexo 3).

Além disso o genoma foi minerado em busca de genes relacionados à formação e regulação de biofilme e também à precipitação de carbonato de cálcio utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) com genes encontrados na literatura relacionados a essas funções (MARVASI *et al.*, 2010; ZHU e STÜLKE, 2018).

Para a circularização do genoma (Figura 74) foi utilizado o software BRIG, genomas de outras espécies de bactérias com capacidade de biomineralização e precipitação de carbonato de cálcio, bem como formação de biofilme (JONKERS *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2020).

Figura 74 - Representação circular do genoma CV16 usando o programa BRIG. De dentro para fora, as legendas são as seguintes: (1) Conteúdo GC, (2) Inclinação GC, (3-6) respectivamente *Bacillus subtilis* 168, G7, *Bacillus cohnii* DSM6307 (Jonkers *et al.*, 2010) e *Sporosarcina pasteurii* BNCC (Ma *et al.*, 2020).



Fonte: Autora.

Desta forma, a partir do sequenciamento do genoma completo foi possível determinar que a cepa CV16, isolada de caverna, é uma cepa de *B. subtilis* que tem importantes genes envolvidos na precipitação de CaCO₃, formação de biofilme e produção de esporos.

De acordo com Chuo *et al.* (2020) muitos estudos aplicam a bactéria *B. subtilis* em materiais cimentícios, entretanto o mecanismo exato utilizado por esse microrganismo para que a precipitação de CaCO₃ aconteça ainda não é claro. Sabe-se que essa bactéria é capaz de induzir a precipitação de CaCO₃ na presença de uma fonte de cálcio.

Vale destacar que Jung *et al.* (2020) realizaram o estudo do genoma completo da bactéria *Bacillus* sp. AK13 e também evidenciaram aspectos relacionados ao genoma da bactéria na precipitação de CaCO₃.

4.2 SEGUNDA CAMPANHA EXPERIMENTAL

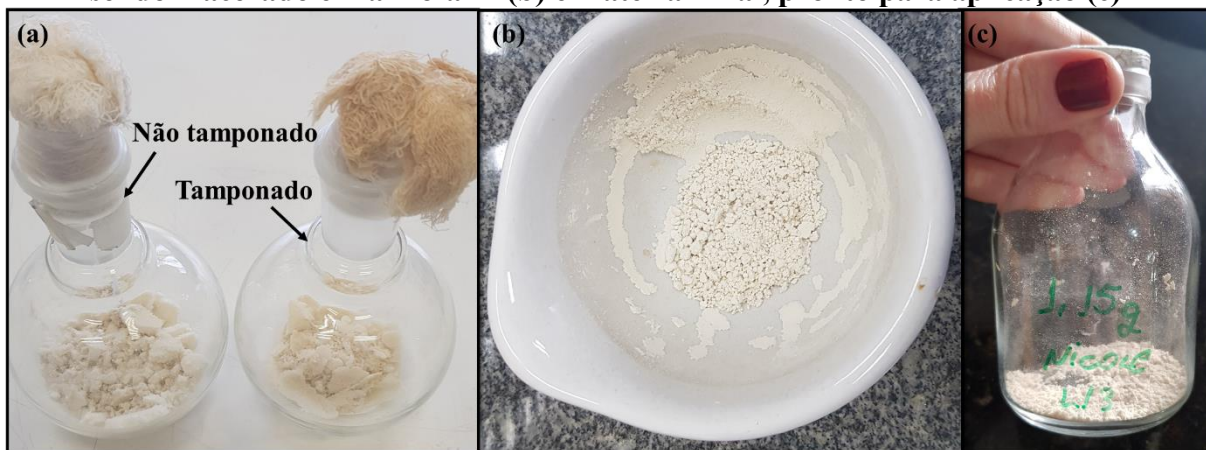
A partir do resultado da primeira campanha experimental, a segunda tem como objetivo determinar a concentração de bactérias a ser adicionada a uma argamassa de traço 1:3. Esta campanha foi dividida em duas etapas, seus resultados estão apresentados na sequência.

4.2.1 Etapa 1: Preparo das bactérias

Na primeira etapa realizou-se o crescimento e preparação da bactéria *CV16*, identificada como *B. subtilis*, para aplicação nos materiais cimentícios. Para tanto o meio B4 sem a fonte de cálcio foi elaborado de forma tamponada e não tamponada.

A Figura 75(a) ilustra o material liofilizado resultante do procedimento, ainda dentro dos balões de 250 mL, a Figura 75(b) mostra o material sendo triturado com o uso de um almofariz e mão de gral e a Figura 75(c) ilustra o material final, pronto para aplicação. O meio não tamponado obteve 0,77 gramas e o meio tamponado 0,38, totalizando 1,15 g de esporos liofilizados.

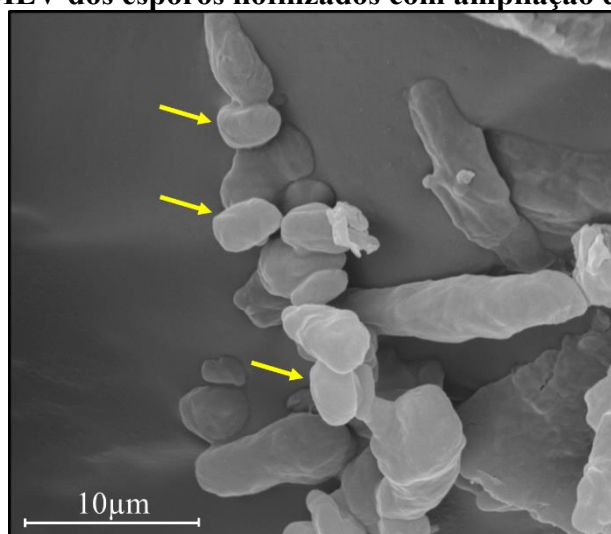
Figura 75 – Material liofilizado do meio não tamponado e tamponado (a) e material sendo macerado em almofariz (b) e material final, pronto para aplicação (c)



Fonte: Autora.

Uma amostra do material liofilizado foi encaminhada para o Microscópio Eletrônico de Varredura para a caracterização, as setas na Figura 76 apontam para os esporos liofilizados.

Figura 76 – MEV dos esporos liofilizados com ampliação de 15.000 vezes



Fonte: Autora.

Além da caracterização, é de suma importância a verificação do crescimento bacteriano, o qual pode ser visualizado na Tabela 8.

Tabela 8 – Crescimento bacteriano e liofilização

Meio	Concentração (esporos/mL)	Quantidade final de esporos liofilizados	Quantidade em massa do material liofilizado (g)
Não tamponado	$1,33 \times 10^9$	$8,54 \times 10^{10}$	0,77
Tamponado	$9,75 \times 10^8$	$4,68 \times 10^{10}$	0,38
Total		$1,32 \times 10^{11}$	1,15

Fonte: Autora.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o crescimento foi maior na condição não tamponada, por esse motivo, quando houver a necessidade de repetição para aquisição de mais material liofilizado, apenas a condição não tamponada será realizada.

Decorrente do tamanho dos esporos, do processo de maceração e da transferência de frascos, perdeu-se um pouco de material, mesmo tomando todos os cuidados possíveis. Por esse motivo, 3 mg do material liofilizado foram diluídos em 1 mL de solução salina para a quantificação, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Quantidade de esporos do material liofilizado presente em 0,003 g

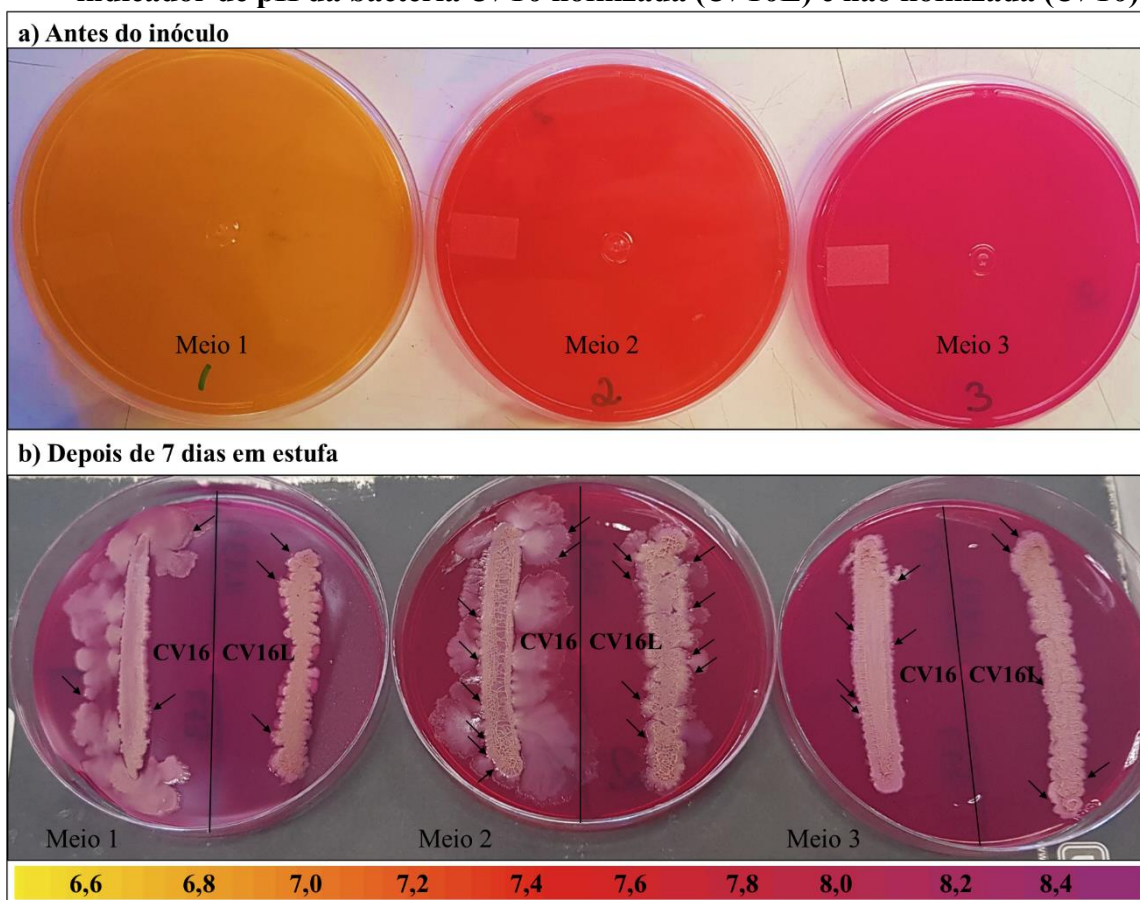
Quantidade de material (g)	Diluição	Leitura da absorbância	Quantidade de esporos
0,003	10x	0,344	$2,01 \times 10^8$

Fonte: Autora.

Como 0,003 g do material tem $2,01 \times 10^8$ esporos, concluí-se que em 1,15 g de material tem-se aproximadamente $7,7 \times 10^{10}$ esporos, ou ainda pode-se dizer que a cada 0,1 gramas do material liofilizado, tem-se aproximadamente $6,7 \times 10^9$ esporos.

Após a quantificação, a solução diluída foi repassada para as placas de petri para avaliar a viabilidade de crescimento e a precipitação de CaCO_3 dos esporos liofilizados (*CV16L*) comparando-os com a amostra não liofilizada (*CV16*). As placas ficaram armazenadas em estufa durante 7 dias à temperatura de 37°C . Na Figura 77 tem-se o resultado do crescimento e da precipitação de cristais indicada pelas setas, seguido pela fita com a coloração indicadora de pH. Vale lembrar que no meio 1 o pH não foi tamponado, diferentemente dos meios 2 e 3 que foram tamponados com Tris, resultando em pH's de 7,2 e 8,2, respectivamente.

Figura 77 – Crescimento e precipitação no meio B4 antes (a) e depois (b) do inóculo com indicador de pH da bactéria *CV16* liofilizada (*CV16L*) e não liofilizada (*CV16*)



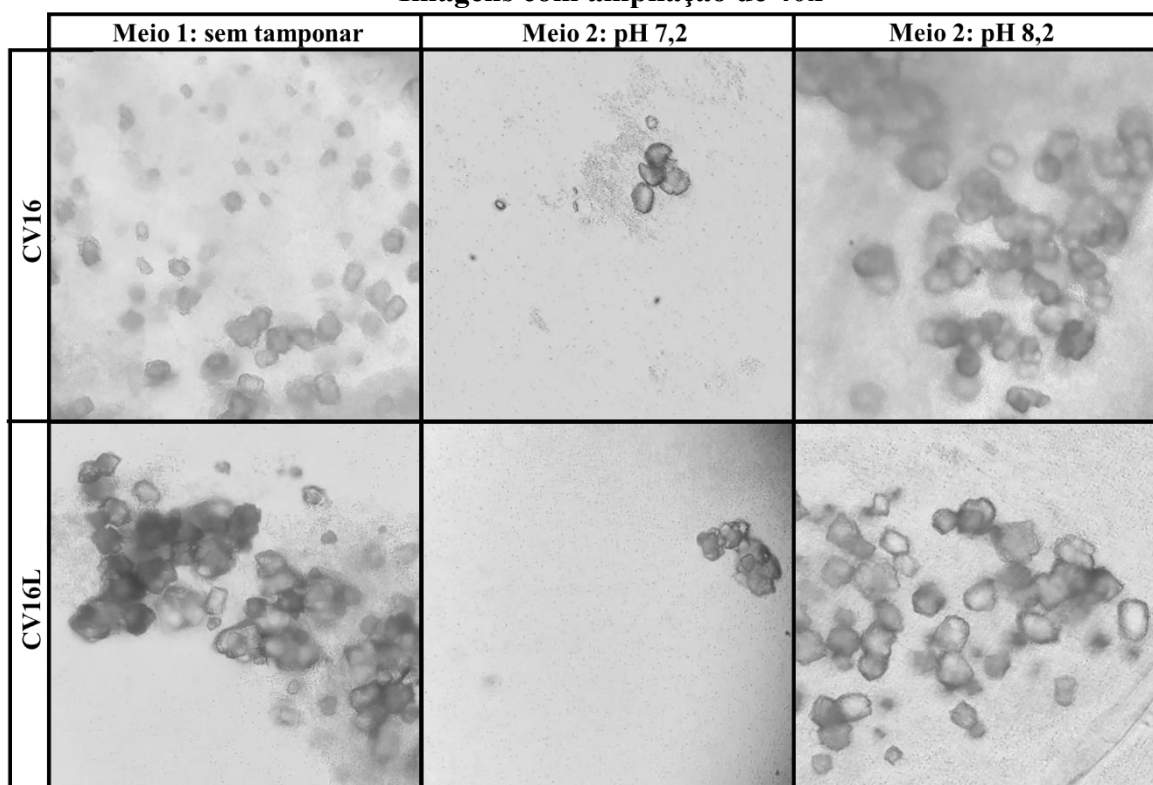
Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 77, observou-se um aumento do pH em todos os meios com o inóculo da bactéria *CV16* liofilizada ou não liofilizada, principalmente no meio 1, que não foi tamponado. Essa mudança era esperada e ocorre a partir da produção de biofilme pelas bactérias. Além disso observou-se que tamponar o pH para o alcalino não inibiu o crescimento bacteriano, nem a precipitação de CaCO_3 , sendo que após os 7 dias de crescimento os três meios ficaram em um pH de 8,4 aproximadamente, corroborando com o apresentado por

Marvasi *et al.* (2010; 2013), que estudaram a bactéria *B. subtilis* 168 e Schwantes-Cezario *et al.* (2017) que estudaram a bactéria *B. subtilis* AP91.

Após a retirada das fotografias das placas de petri, alíquotas de cada meio da bactéria *CV16* não liofilizada e liofilizada foram diluídas em solução salina para análise em microscópio óptico, as imagens obtidas estão ilustradas na Figura 78.

Figura 78 – Cristais precipitados no meio B4 com diferentes pH's com inóculo da bactéria CV16 sem passar pelo processo de liofilização comparada a liofilizada (CV16L). Imagens com ampliação de 40x



Fonte: Autora.

Observou-se em todos os meios, tanto para a bactéria liofilizada como não liofilizada, houve a precipitação de cristais, conforme ilustrado na Figura 78. A morfologia destes cristais é semelhante a apresentada na literatura por Marvasi *et al.* (2010; 2013).

Em uma análise visual, a presença de cristais teve maior incidência nos meios 1 e 3, mas como apenas uma alíquota da amostra foi retirada de cada placa a comparação em relação à quantidade é complexa de ser realizada, pois de uma determinada amostra pode-se ter retirado de um local com maior incidência de cristais do que de outra.

Destaca-se que o objetivo principal deste teste, era verificar se a bactéria *CV16* liofilizada tinha a mesma capacidade de precipitação dos cristais que a mesma sem liofilizar. A partir do resultado obtido e ilustrado nas Figuras 77 e 78, verificou-se que o processo de liofilização não prejudicou a precipitação de CaCO_3 nos meios de precipitação,

corroborando com Pungrasmi *et al.* (2019) que verificou que esporos liofilizados apresentaram maior taxa de sobrevivência, quando comparado a outros métodos.

Comprovado que os esporos liofilizados são capazes de precipitar cristais, iniciou-se a etapa 2.

4.2.2 Etapa 2: Definição da concentração

Nesta etapa a concentração dos esporos liofilizados a serem adicionados à uma argamassa básica foi estudada. Vale lembrar que a argamassa estudada foi de traço 1:3 (em massa) e relação água/cimento de 0,54, sendo que as concentrações bacterianas foram adicionadas na água de amassamento.

4.2.2.1 Ensaios no estado fresco

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados de massa específica e de índice de consistência das argamassas, lembrando que a nomenclatura adotada foi de REF para a argamassa de referência e A_3, A_5 e A_7 para as argamassas com adição de 10^3 , 10^5 e 10^7 esporos/mL, respectivamente.

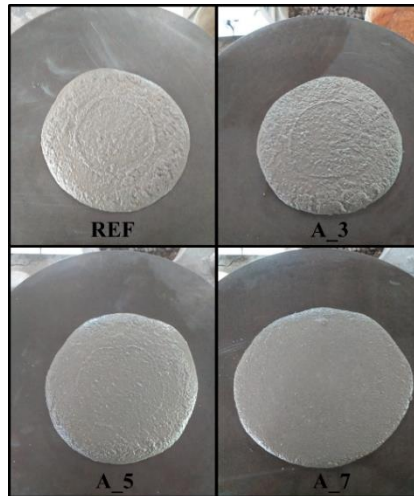
Tabela 10 – Resultados dos ensaios das argamassas em fresco

Argamassas	REF	A_3	A_5	A_7
Índice de consistência (mm)	250	250	255	270
Massa específica (g/cm ³)	2,21	2,20	2,22	2,20

Fonte: Autora.

A partir da análise da Tabela 10 observou-se que a massa específica, em média, foi de 2,2 g/cm³. A Figura 79 ilustra o resultado do ensaio de consistência das argamassas, a partir da qual pode-se visualizar que com o aumento da concentração de esporos bacterianos houve um aumento no índice de consistência. Este resultado corrobora com estudos apresentados por Luo e Quian (2016), que verificaram uma melhoria do índice de consistência de argamassas a partir da adição de agentes de autocicatrização à base de bactérias.

Figura 79 – Fotos do índice de consistência das argamassas



Fonte: Autora.

Após a realização dos ensaios em fresco, corpos de prova foram moldados para análise no estado endurecido, seus resultados estão apresentados na sequência.

4.2.2.2 *Ensaio no estado endurecido*

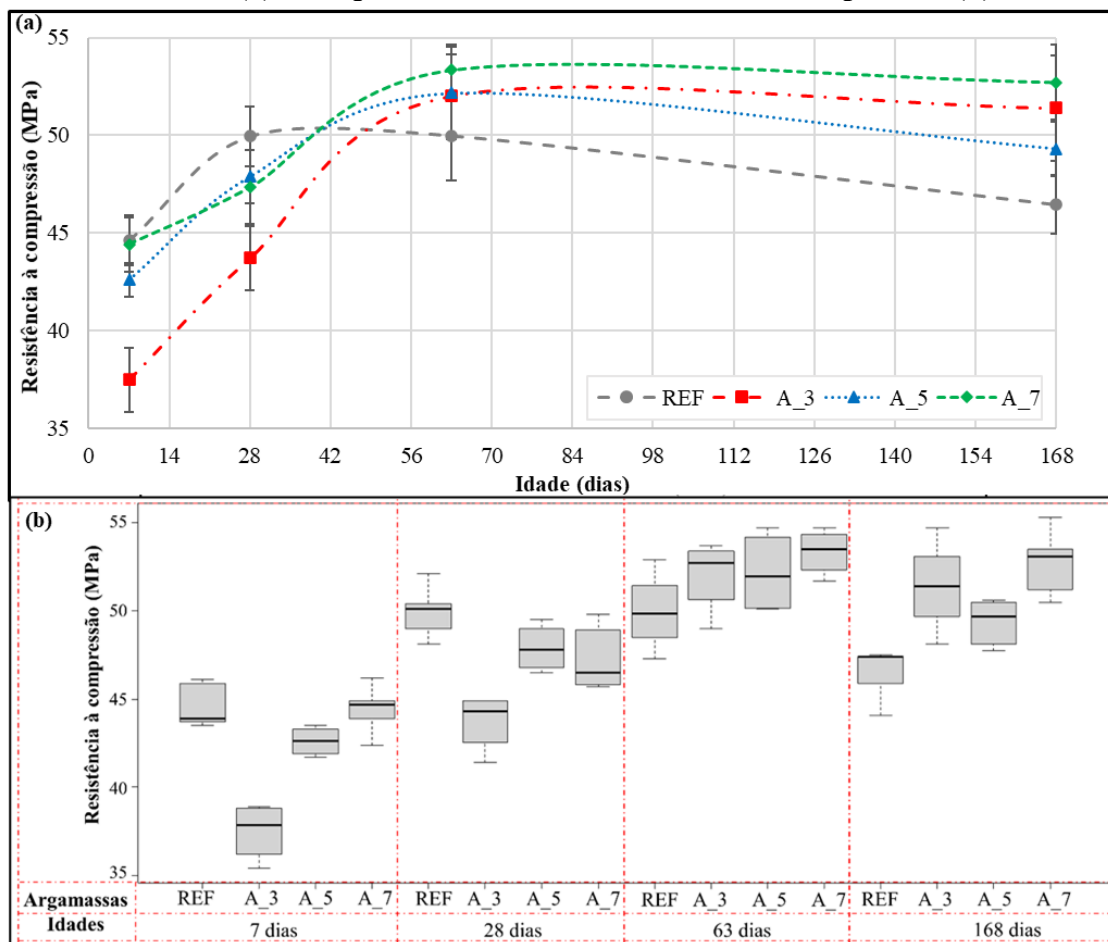
Para esta campanha experimental foram realizados os seguintes ensaios no estado endurecido: resistência à compressão, absorção de água, índice de vazios, Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM), análise de poros em estereoscópio, acompanhamento de fissura por imagem e posterior análise do material precipitado nas fissuras através de MEV e EDS.

4.2.2.2.1 *Resistência à compressão*

A análise de resistência à compressão é muito importante em materiais cimentícios, entretanto é importante lembrar que o principal objetivo da adição de bactérias em concretos e argamassas é a autocicatrização de fissuras e fechamento de poros. Porém deve-se ter em mente que esta adição não deve afetar negativamente a resistência à compressão dos materiais cimentícios.

Os resultados de resistência à compressão foram plotados de duas maneiras: primeiro comparando a evolução da resistência à compressão das cada argamassa ao longo do período de cura (Figura 80a) e na sequência traçou-se o *Boxplot* dos resultados (Figura 80b), para verificação das diferenças significativas o *software* Statistica foi utilizado para realização do teste Tukey (Tabela 11).

Figura 80 – Evolução da resistência à compressão das argamassas ao longo do período de cura (a) e *Boxplots* dos dados de resistência à compressão (b)



Fonte: Autora.

Tabela 11 – Teste Tukey para resistência à compressão

Amostra	Grupo estatístico para cada idade			
	7 dias	28 dias	63 dias	168 dias
REF	a	a	a	a
A 3	b	b	a	b
A 5	a	a	a	ab
A 7	a	a	a	b

Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 80(a) verificou-se uma evolução da resistência à compressão dos 7 para os 28 dias em todas as amostras, devido aos processos de hidratação do cimento. Vale destacar que o cimento de alta resistência inicial (CP V-ARI) utilizado é caracterizado por atingir elevadas resistências nas primeiras idades, resultado da aceleração das reações de hidratação ocasionadas pela diferente dosagem de argila e calcário na produção do clínquer, associado a um maior tempo de moagem (NEVILLE e BROOKS, 2013).

Pelas características do cimento CP V-ARI, esperava-se pouco ou nenhum aumento da resistência dos 28 para os 63 dias. Porém a partir da análise da Figura 80(a), quando

as bactérias foram adicionadas houve uma evolução da resistência à compressão nessas idades, o que não foi visualizado na argamassa de referência (REF). Tal fato pode ter ocorrido pela precipitação de CaCO_3 .

Entretanto a partir da análise da idade de 63 os 168 dias verificou-se que a resistência à compressão se manteve constante, analisando as barras de erros que representam os desvios padrão. Tal fato indica uma atuação bacteriana mais significativa nas idades de 28 a 63 dias. Este resultado pode ser justificado pelo fato de que não foi adicionada uma fonte externa de cálcio ao material. Desta forma, apenas o hidróxido de cálcio poderia ter sido utilizado pela bactéria na precipitação do CaCO_3 .

De acordo com Tan *et al.* (2020), o hidróxido de cálcio é uma fonte de cálcio utilizada pelas bactérias na precipitação de CaCO_3 . Porém o hidróxido de cálcio é uma fonte finita no material e estes pesquisadores verificaram que em amostras que foram previamente carbonatadas, sem a adição de uma fonte suplementar de cálcio, a autocicatrização não foi efetiva. Apontando uma atuação bacteriana limitada na ausência de uma fonte de cálcio adicional, para que a bactéria tenha capacidade de bioprecipitar CaCO_3 .

Vale destacar ainda que a maioria dos trabalhos publicados realiza ensaios apenas até a idade de 28 dias. Frente aos resultados apresentados, análises por períodos maiores se tornam relevantes, levando em consideração que a bactéria ao não ter mais contato com uma fonte de cálcio não atuará na autocicatrização de fissuras tardias.

Ao analisar a resistência à compressão entre as argamassas nas diferentes idades observa-se uma diminuição desta propriedade quando a concentração de 10^3 esporos/mL foi adicionada, aos 7 e 28 dias. Entretanto com o avanço da idade (63 e 168 dias), esta argamassa apresentou um comportamento semelhante às demais argamassas com adição bacteriana.

De acordo com a literatura, diferentes bactérias adicionadas na concentração de 10^3 esporos por mL não influenciaram significativamente na resistência à compressão de materiais cimentícios na idade de 28 dias (GHOSH *et al.*, 2009; CHAHAL e SIDDIQUE, 2013; CHAHAL *et al.*, 2012). Entretanto cada bactéria possui um metabolismo diferente, o qual pode influenciar na sua atuação em materiais cimentícios.

Por fim, a partir da análise dos *boxplots* e do teste Tukey pode-se verificar se houve diferenças significativas entre as amostras nas diferentes idades. A partir da análise da Figura 80(b) e Tabela 11 pode-se observar que aos 7 e 28 dias, apenas a amostra com adição de 10^3 esporos/mL (A_3) se diferenciou estatisticamente das demais. No entanto este comportamento não se repetiu aos 63 e 168 dias.

De acordo com o ilustrado na Figura 80(b) a adição da concentração de 10^3 esporos/mL (A_3) prejudicou o desempenho mecânico até os 28 dias de idade. Entretanto observou-se que com o avanço do tempo esta argamassa não apresentou diferenças estatísticas, quando comparada as demais, com adição de bactérias.

É importante observar também que a argamassa com adição de 10^5 esporos/mL (A_5), aos 168 dias, não se diferenciou estatisticamente da argamassa de referência (REF), tal fato pode estar associado a variabilidade dos corpos de prova. Entretanto é necessário destacar que o principal objetivo da adição de bactérias em concretos e argamassas é a autocicatrização de fissuras e fechamento de poros, tendo em mente que esta adição não deve afetar negativamente a resistência à compressão (MONDAL e GHOSH, 2018; REEKSTING *et al.*, 2020).

Os estudos da adição de microrganismos para melhoria do desempenho mecânico focam na incorporação de concentrações entre 10^3 e 10^7 células/mL, enquanto estudos que investigam sobre a autocicatrização de fissuras normalmente utilizam concentrações mais elevadas, entre 10^7 e 10^9 células/mL. Embora uma maior concentração de bactérias possa levar ao aumento da precipitação de carbonato de cálcio e conseqüentemente potencializar a autocicatrização, alguns pesquisadores observaram que a concentração ideal para o aumento da resistência à compressão pode não ser a maior concentração bacteriana (ERŞAN, DE BELIE e BOON, 2015).

Mondal e Ghosh (2018) testaram a adição da bactéria *B. subtilis* em três concentrações (10^3 , 10^5 , e 10^7 células/mL) e verificaram que todas as adições proporcionaram melhorias no desempenho mecânico do material cimentício até os 28 dias de idade, porém a concentração de 10^5 apresentou a maior resistência à compressão. Um resultado semelhante foi publicado por Jena *et al.* (2020), apontando que a concentração ideal para melhoria das propriedades mecânicas foi de 10^5 células/mL da bactéria *B. subtilis*. De acordo com os pesquisadores, o aumento da resistência à compressão está associado ao fechamento de poros ocasionado pela precipitação bacteriana de CaCO_3 .

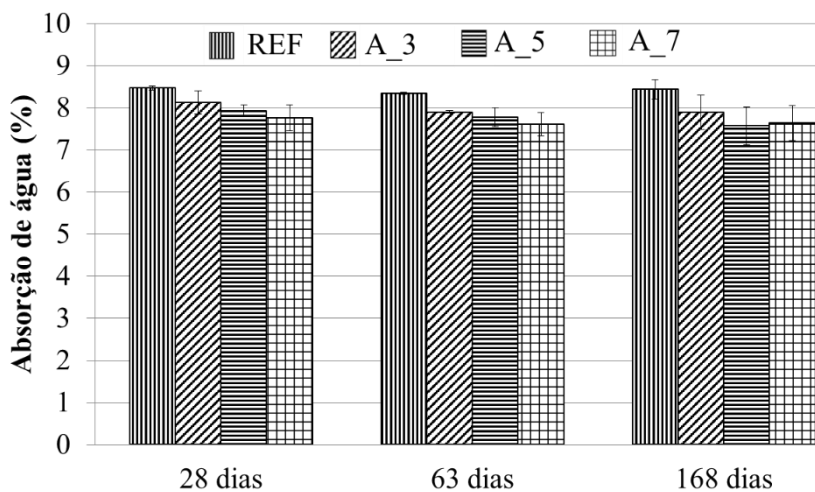
Frente a isso, o ensaio de absorção de água e índice de vazios foi conduzido, sendo os seus resultados apresentados na sequência.

4.2.2.2.2 Absorção de água e Índice de vazios

O ensaio de absorção de água e índice de vazios foi conduzido aos 28, 63 e 168 dias. Os resultados obtidos de absorção de água estão apresentados na Figura 81, seguidos

pelo resultado do teste Tukey (Tabela 12). É importante lembrar que nos corpos de prova ensaiados a absorção de água e índice de vazios não foi utilizado desmoldante no momento da moldagem, conforme requer a NBR 9779 (ABNT, 2009).

Figura 81 – Absorção de água



Fonte: Autora.

Tabela 12 – Teste Tukey para a absorção de água (n=3)

Amostra	Grupo estatístico para cada idade		
	28 dias	63 dias	168 dias
REF	a	a	a
A_3	ab	ab	ab
A_5	b	b	b
A_7	b	b	b

Fonte: Autora.

A partir da análise dos resultados, pode-se observar que nas idades analisadas o comportamento da argamassa com adição de 10^3 esporos/mL (A_3) se apresentou estatisticamente igual à argamassa de referência (REF). Tal fato pode ser justificado pela pequena quantidade de esporos bacterianos adicionados nesta argamassa, que no período analisado não atuaram significativamente no fechamento de poros.

As argamassas com adição de 10^5 e 10^7 esporos/mL, por sua vez, se apresentaram diferentes estatisticamente da referência em todas as idades, possivelmente pela ação bacteriana que atuou no fechamento de poros. Observa-se que mesmo em pequena quantidade foram capazes de diminuir a absorção de água. Tal resultado corrobora com os dados obtidos no ensaio de resistência à compressão, pois na idade de 63 e 168 dias houve um aumento dessa propriedade apenas nas amostras com adição de bactérias.

Além disso pode-se observar que entre as idades de 63 e 168 dias não houve mudanças significativas entre a absorção de água, provavelmente associado a ausência de fonte de cálcio, pois o hidróxido de cálcio pode ter sido consumido pelas bactérias na precipitação de

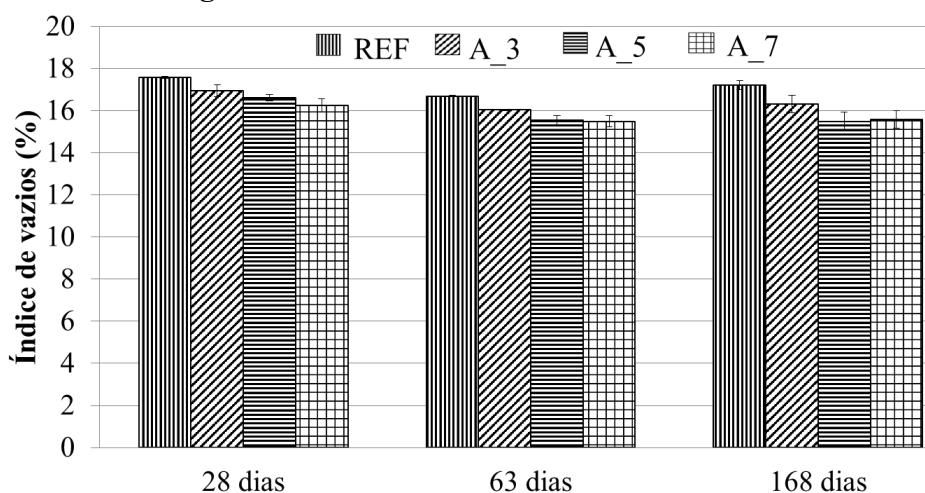
CaCO₃. Por esse motivo, na próxima campanha experimental uma fonte suplementar de cálcio será adicionada.

Em uma análise global dos resultados de absorção de água, pode-se verificar que a amostra que apresentou a menor absorção de água foi a A_7, com adição de 10⁷ esporos/mL, aos 63 dias e a A_5, com adição de 10⁵ esporos/mL, aos 168 dias. Porém em ambas as idades estas duas argamassas não se diferenciaram estatisticamente uma da outra.

Os resultados obtidos de absorção de água corroboram com pesquisas realizadas por Mondal e Ghosh (2018), que estudaram as concentrações de 0, 10³, 10⁵ e 10⁷ esporos de *B. subtilis* na água de amassamento de argamassas e verificaram que com o aumento da concentração bacteriana adicionada havia uma diminuição na absorção de água.

Os resultados do ensaio de índice de vazios estão apresentados na Figura 82 e Tabela 13. Vale destacar que o índice de vazios é a relação entre os volumes de poros permeáveis e o volume total de uma amostra.

Figura 82 – Índice de vazios aos 28 e 63 dias



Fonte: Autora.

Tabela 13 – Teste Tukey para o Índice de vazios (n=3)

Amostra	Grupo estatístico para cada idade		
	28 dias	63 dias	168 dias
REF	a	a	a
A_3	ab	ab	ab
A_5	ab	b	b
A_7	b	b	b

Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 82 e da Tabela 13, verificou-se a mesma tendência dos resultados obtidos na absorção de água, com exceção que aos 28 dias a amostra A_5 não apresentou diferenças significativas da argamassa de referência, mas esse

comportamento não se repetiu aos 63 e 168 dias, possivelmente pela precipitação de CaCO_3 que foi mais efetiva até a idade de 63 dias.

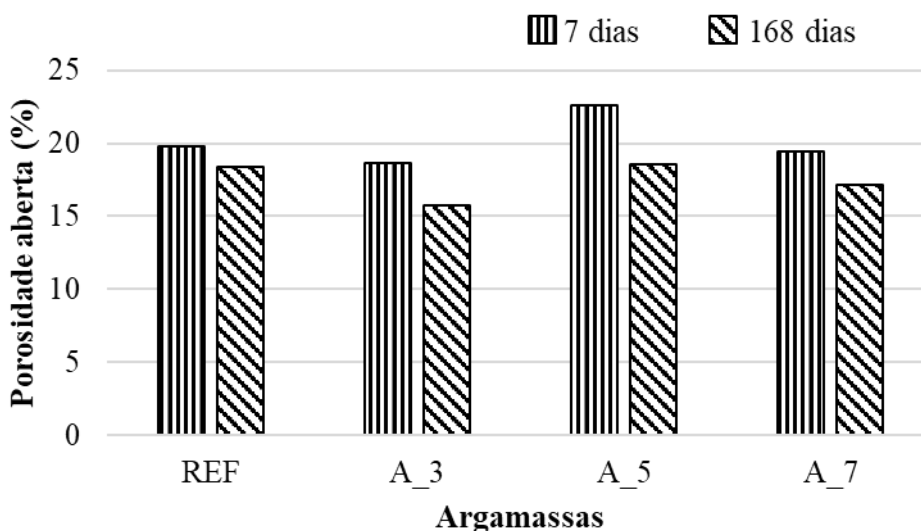
As argamassas com adição de 10^5 e 10^7 esporos/mL (A_5 e A_7) obtiveram o menor índice de vazios nas idades de 63 e 168 dias, o qual nestas duas idades foi estatisticamente igual, comportamento semelhante ao da absorção de água. Além disso verificou-se que dos 63 aos 168 dias não houve diminuições significativas do índice de vazios, resultado que corrobora com a absorção de água e resistência à compressão.

Em paralelo a estes ensaios, a Porosimetria por Intrusão de Mercúrio foi realizada e seus resultados estão apresentados na sequência.

4.2.2.2.3 Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)

A porosimetria por intrusão de mercúrio foi realizada em amostras de em média $10 \times 10 \times 10$ mm, nas idades de 7 e 168 dias. É importante citar que o ensaio de PIM avaliou poros entre $0,006$ e 300 μm e salienta-se que as bactérias atuam no fechamento de poros de pequena dimensão. Desta maneira, este ensaio é importante na análise do fechamento de poros por este tipo de tratamento. O primeiro resultado analisado foi quanto a porosidade aberta das argamassas, a qual está ilustrada na Figura 83.

Figura 83 – Porosidade aberta por PIM das argamassas ao longo do período de cura



Fonte: Autora.

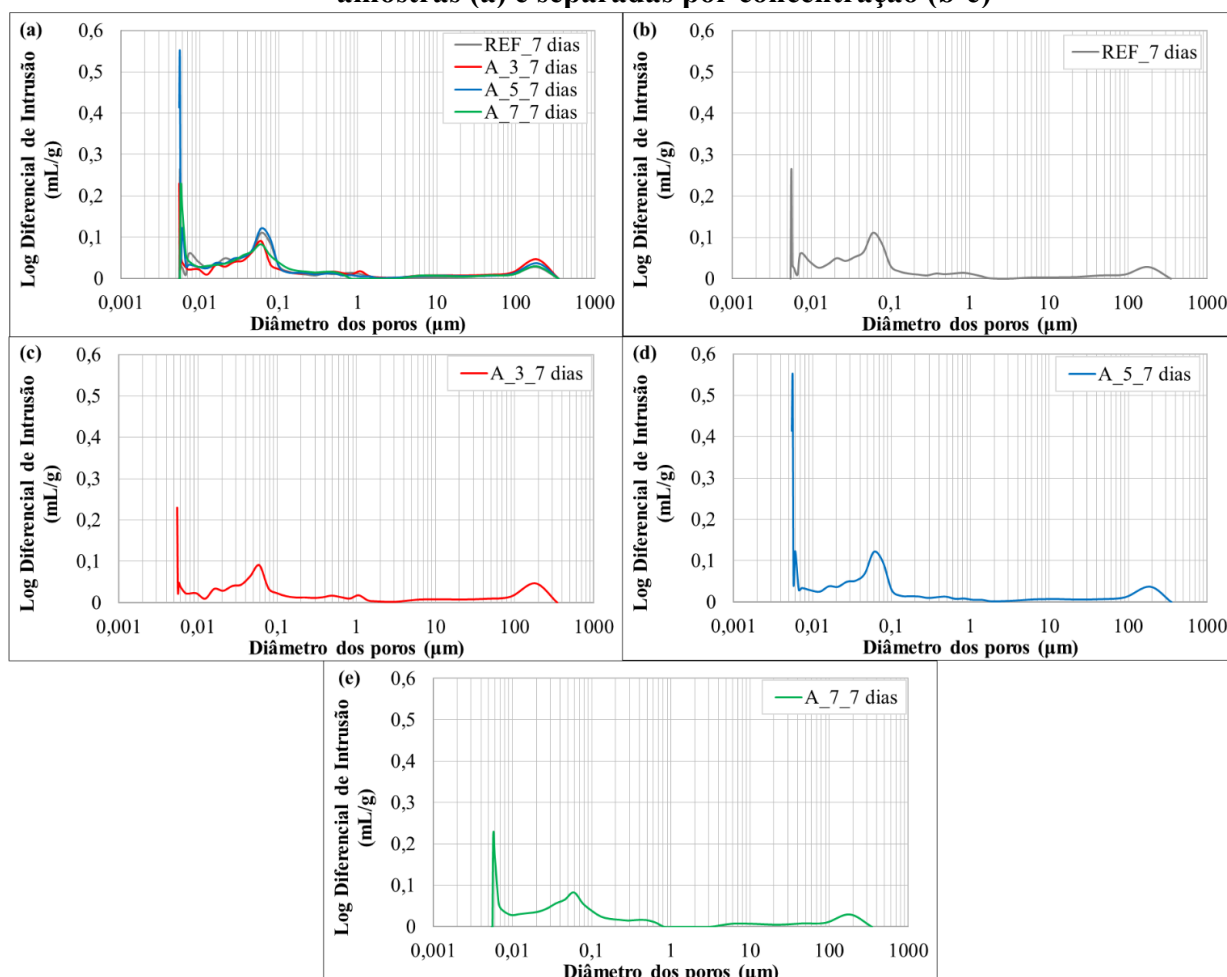
Ao observar os resultados da Figura 83, verificou-se que em todas as argamassas houve uma diminuição da porosidade, dos 7 para os 168 dias, o que era esperado. Na amostra de referência (REF) a redução foi de 7%, provavelmente ocasionada pelas reações

de hidratação do cimento, e nas amostras com adição de 10^3 , 10^5 e 10^7 esporos/mL foram de 16, 18 e 12%, respectivamente, ocasionadas possivelmente pela bioprecipitação de CaCO_3 .

Existem controvérsias na literatura sobre as concentrações ideais de bactéria a serem aplicadas em materiais cimentícios, alguns autores afirmam que maiores concentrações tendem a apresentar maior autocicatrização e como consequência diminuições mais significativas na porosidade (OKWADHA e LI, 2010; MONDAL e GHOSH, 2018).

Para verificar a distribuição dos poros nas amostras, tanto aos 7 como aos 168 dias de cura, os gráficos das Figuras 84 e 85 foram plotados. Nestes estão apresentados os resultados do diâmetro dos poros *versus* o log diferencial de intrusão de mercúrio, sendo possível observar se a intrusão foi maior ou menor em um determinado tamanho de poro.

Figura 84 – Diâmetro dos poros *versus* log diferencial de intrusão aos 7 dias de todas as amostras (a) e separadas por concentração (b-e)



Fonte: Autora.

Aos 7 dias, em geral, observou-se uma tendência semelhante nas amostras, com exceção de poros de $0,006 \mu\text{m}$ na argamassa A_5 , que apresentou um pico de aproximadamente o dobro das demais.

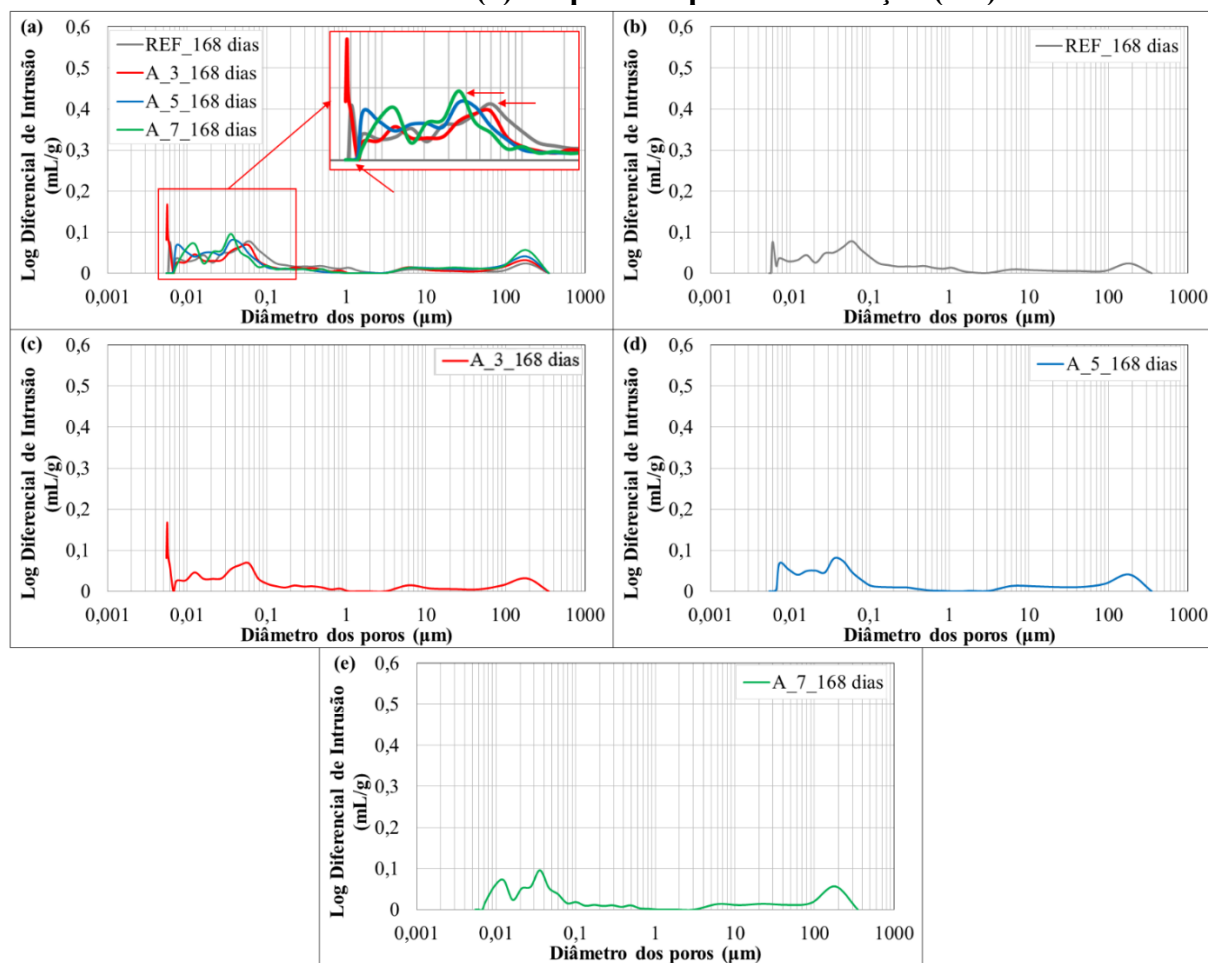
Tal fato pode ser justificado, pois no ensaio de PIM conforme a pressão aumenta o mercúrio adentra em poros cada vez menores. Com o aumento da pressão, caso existam poros capilares que estejam conectados em poros maiores, o mercúrio só acessará o poro maior passando pelo capilar, desta forma, de acordo com Alderete *et al.* (2017) o poro de maior dimensão acaba sendo contabilizado como poro capilar, resultando em um maior pico no gráfico.

É importante destacar que a interpretação dos resultados de PIM leva em consideração que o método analisa apenas poros permeáveis e considera estes poros como cilindros perfeitos (ALDERETE *et al.*, 2017). Entretanto segundo Diamond (2000), a maioria dos poros só pode ser alcançada pelo mercúrio através de uma longa cadeia de poros intermediários, com vários tamanhos e formatos, sendo a razão pela qual a quantificação pode não ser perfeita.

No contexto da adição de microrganismos, o ensaio de PIM é interessante pois a partir de seus resultados é possível verificar a distribuição de poros de pequenas dimensões, nos quais as bactérias atuam, e que dificilmente são quantificados a partir de outras técnicas.

Na sequência, pode-se visualizar os resultados do log diferencial de intrusão de mercúrio *versus* o diâmetro dos poros na idade de 168 dias. Ao analisar a Figura 85 (a), observa-se a mesma tendência na distribuição dos poros maiores que 0,3 μm . Em poros menores que 0,3 μm , observa-se um deslocamento das curvas, principalmente das amostras A_5 e A_7 para a esquerda, conforme setas apontadas no detalhe (Figura 85a), ilustrando que houve uma diminuição no tamanho dos poros, quando comparado à argamassa de referência (REF), possivelmente causada pela precipitação de CaCO_3 .

Figura 85 – Diâmetro dos poros versus log diferencial de intrusão aos 168 dias de todas as amostras (a) e separadas por concentração (b-e)

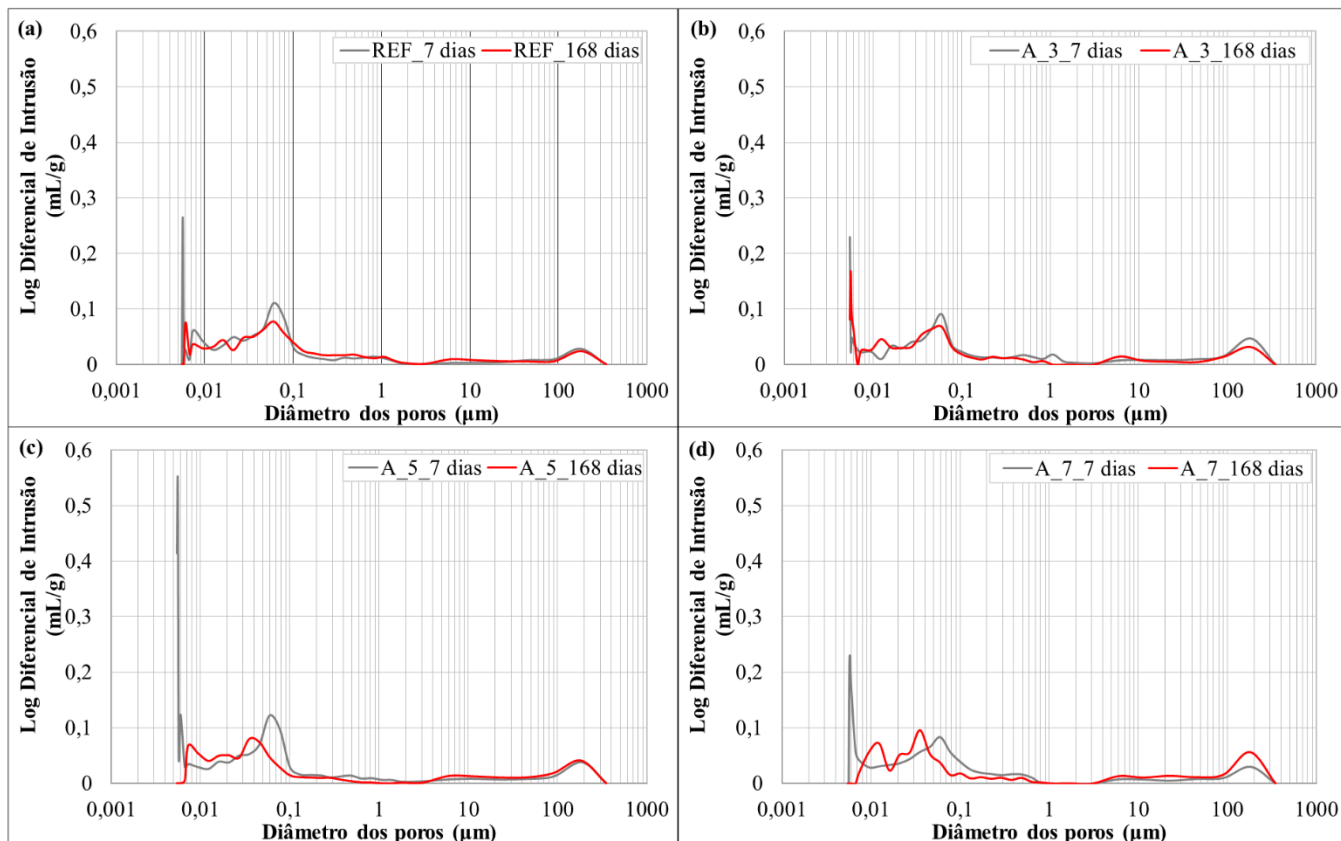


Fonte: Autora.

Outro fato que pode ser observado a partir da análise da Figura 85 (d e e) é que nas amostras de A_5 e A_7 os menores poros analisados no ensaio, em torno de 0,006 µm, não foram visualizados aos 168 dias, mas foram quantificados 7 dias (Figura 84 d-e). Mostrando que o tratamento bacteriano atuou no fechamento destes poros.

Para a comparação entre cada argamassas ao longo do período de cura, a Figura 86 foi elaborada. Vale relembrar que o ensaio de PIM é destrutivo, por esse motivo as amostras analisadas aos 7 e 168 dias não são as mesmas, mas foram retiradas do mesmo corpo de prova de 50x100 mm. Com o objetivo de evitar uma variabilidade significativa, todas as amostras de PIM foram retiradas aos 7 dias dos corpos de prova e armazenadas em um recipiente no tanque de cura até a idade de ensaio.

Figura 86 – Comparativo do log da intrusão acumulada ao longo do tempo de análise por argamassa: REF (a), A_3 (b), A_5 (c) e A_7 (d)



Fonte: Autora.

Ao analisar a Figura 86 (a e b), verificou-se que a argamassa de referência (REF) e a com adição de 10^3 esporos/mL (A_3) apresentaram a mesma tendência na distribuição dos poros ao longo do período de cura, sendo que observou-se uma diminuição dos poros entre 0,04 e 0,09 μm e 0,006 μm nestas argamassas.

Na Figura 86 (c), que ilustra a argamassa com adição de 10^5 esporos/mL (A_5), pode-se verificar um deslocamento da curva para a esquerda na faixa de 0,1 a 0,03 μm , aproximadamente, indicando uma diminuição dos poros com tamanho de 0,1 μm , ao longo do período de cura das argamassas. Além disso nesta amostra a menor dimensão de poros analisadas no ensaio (aproximadamente 0,006 μm) foram fechados ao longo do período de cura.

Por fim, a Figura 86 (d) ilustra a argamassa com adição de 10^7 esporos/mL (A_7), na qual verificou-se uma maior intrusão em poros de maiores dimensões (entre 100 e 300 μm) aos 168 dias, quando comparado aos 7 dias. Além disso a curva apresentou uma diminuição seguida por um deslocamento na faixa 0,3 a 0,02 μm , indicando uma diminuição da porosidade nestes tamanhos. Assim como na amostra A_5, poros com aproximadamente 0,006 μm foram fechados pelo tratamento bacteriano durante o tempo de análise.

De Muynck *et al.* (2010) realizaram estudos de PIM em amostras de calcário com adição de bactérias a partir da imersão das amostras em culturas crescidas de *Bacillus sphaericus* durante um dia de idade. Os pesquisadores observaram que após esse período de exposição não houve diferenças significativas entre a PIM das amostras o tratamento com bactéria e com esse tratamento. Porém o tempo de análise destes pesquisadores foi muito curto, pois as bactérias não conseguem atuar tão rapidamente no fechamento de poros e fissuras.

Luo e Qian (2016) realizaram testes de PIM, aos 28 dias de cura, em argamassas com adição de esporos de bactérias álcali-resistentes com diferentes fontes de cálcio. Os pesquisadores observaram que as distribuições do tamanho dos poros foram diferentes entre as amostras com e sem bactérias, sendo que na argamassa de referência (sem bactérias) a maioria dos poros concentrou-se em diâmetros entre 0,01 e 0,1 μm , enquanto a adição de bactérias aumentou a porosidade entre 0,1 e 1 μm , possivelmente pela diminuição de poros maiores. Porém este ensaio foi conduzido apenas aos 28 dias de cura, análises com idades mais avançadas devem ser realizadas para ver a atuação bacteriana ao longo do tempo.

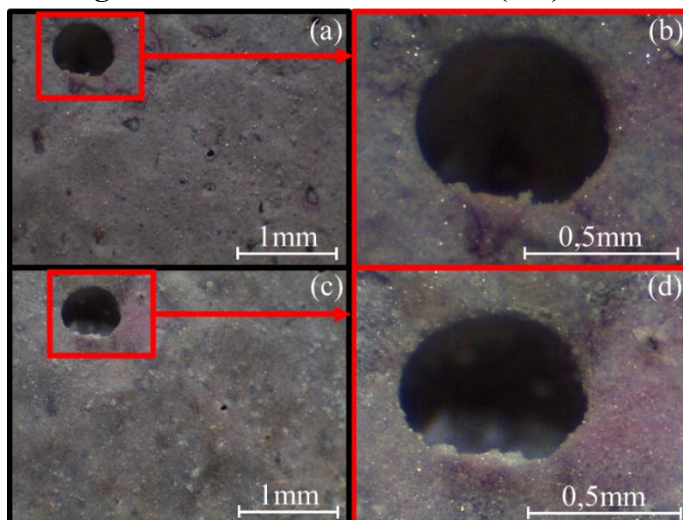
Vale destacar que estes resultados corroboram com os apresentados por Jang *et al.* (2020), apontando que os esporos liofilizados de bactérias são capazes de atuar no fechamento de poros e fissuras sem a necessidade de proteção.

Além da análise de PIM, imagens dos poros foram obtidas em estereoscópio. Os resultados obtidos estão apresentados no próximo tópico.

4.2.2.2.4 *Análise dos poros por estereoscópio*

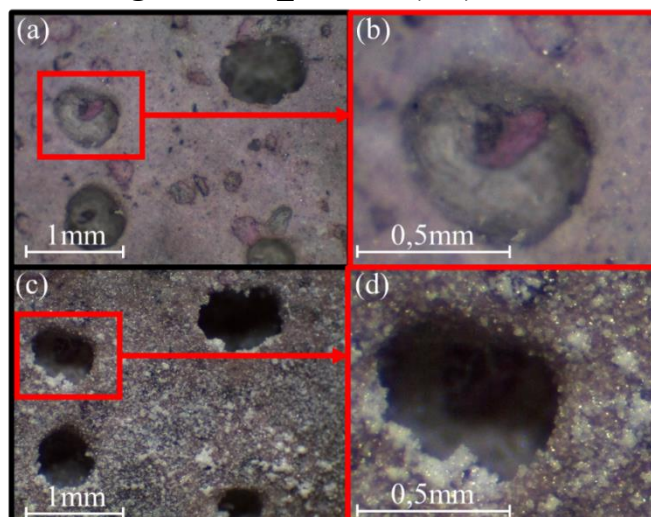
Imagens de poros na superfície dos corpos de prova foram obtidas em estereoscópio aos 28 e 168 dias. As Figuras 87, 88, 89 e 90 (a-b) ilustram os poros das argamassas aos 28 dias e (c-d) aos 168 dias de cura.

Figura 87 – Poros da argamassa de referência aos 28 (a-b) e aos 168 dias de cura (c-d)



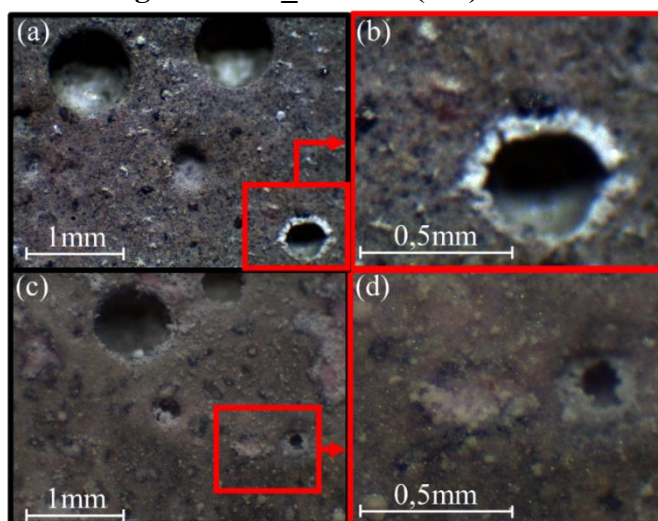
Fonte: Autora.

Figura 88 – Poros da argamassa A_3 aos 28 (a-b) e aos 168 dias de cura (c-d)



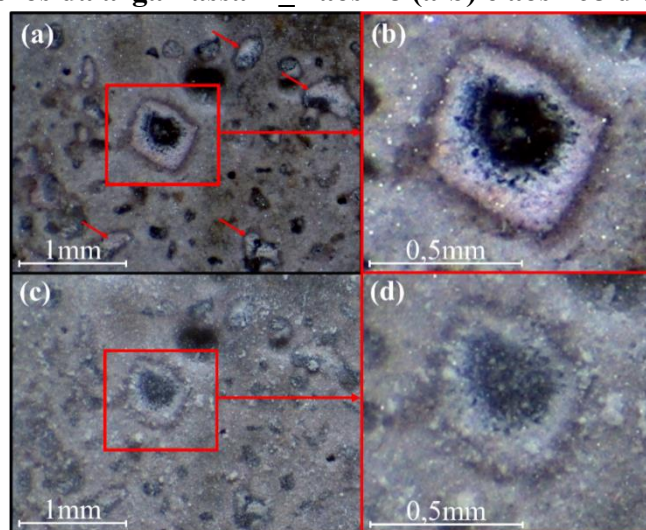
Fonte: Autora.

Figura 89 – Poros da argamassa A_5 aos 28 (a-b) e aos 168 dias de cura (c-d)



Fonte: Autora.

Figura 90 – Poros da argamassa A_7 aos 28 (a-b) e aos 168 dias de cura (c-d)



Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 87, pode-se visualizar que os poros permaneceram com características semelhantes, com o passar do tempo, sendo que foi verificado apenas uma pequena deposição de cristais, provavelmente ocasionada pela hidratação de partículas que não foram hidratadas anteriormente. Entretanto quando as bactérias foram adicionadas, os depósitos cristalinos foram maiores, como pode-se visualizar nas Figuras 88, 89 e 90.

A partir da análise das Figuras 88, 89 e 90, pode-se observar uma precipitação de cristais nos poros e na superfície das argamassas. Além disso pode-se verificar que os poros são preenchidos por cristais de fora para dentro em poros de diferentes dimensões. Os resultados apresentados nestas figuras corroboram o resultado de absorção de água, índice de vazios e PIM, os quais apresentaram:

- diminuição da absorção de água e índice de vazios, quando as bactérias foram adicionadas, principalmente nas concentrações de 10^5 e 10^7 esporos/mL;
- deslocamento da curva do gráfico de PIM para a esquerda, indicando uma diminuição nos tamanhos dos poros, nas concentrações de 10^5 e 10^7 esporos/mL.

A argamassa que apresentou um maior preenchimento dos poros foi a argamassa com adição de 10^7 esporos/mL. Observando mais detalhadamente a Figura 90(a) pode-se verificar que poros menores (indicados pelas setas) já foram preenchidos por cristais na idade de 28 dias, enquanto poros maiores estavam em processo de preenchimento.

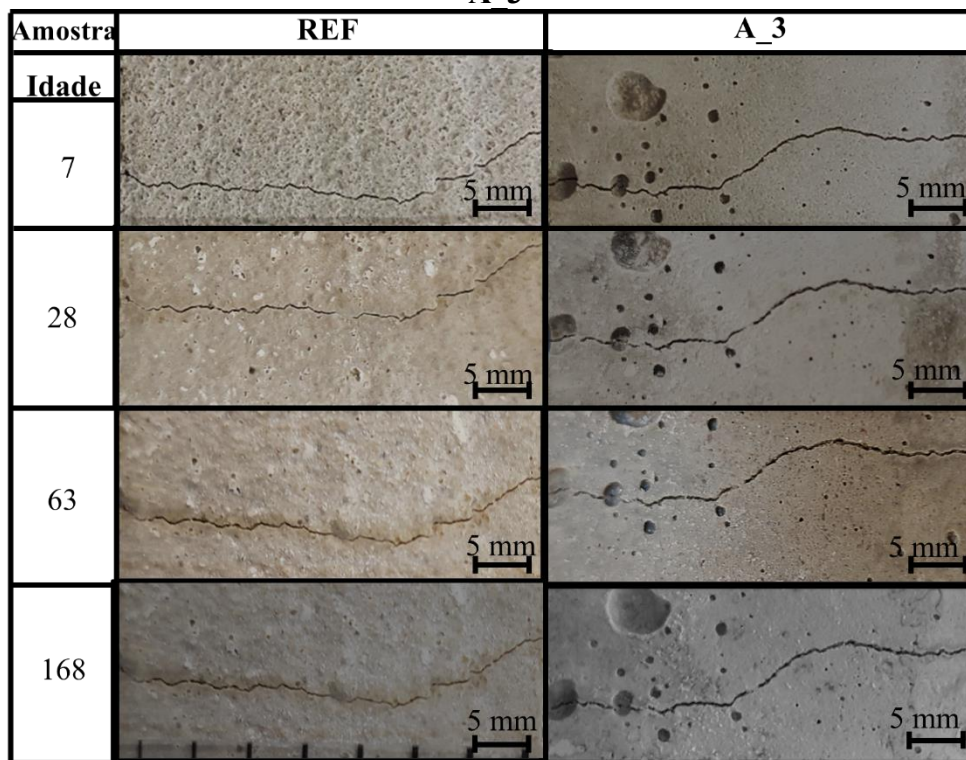
Na sequência estão apresentados os resultados de acompanhamento das fissuras ao longo do período de análise.

4.2.2.2.5 Acompanhamento de fissuras

Buscando a análise de fissuras com características próximas às encontradas em edificações, amostras de 40x40x160 mm foram fissuradas a partir do ensaio de flexão em três pontos, após 7 dias de cura, utilizando uma prensa manual. O ensaio de flexão em três pontos resultou na formação de fissuras de 0,2 a 0,3 mm.

Para a análise das fissuras, fotografias foram tomadas nas idades de 7, 28, 63 e 168 dias, os resultados estão apresentados nas Figuras 91 e 92. Vale destacar que as amostras não foram analisadas por estereoscópio pois este acompanhamento foi realizado durante o início da pandemia de Covid-19 e o acesso ao laboratório que contém esse equipamento estava restrito.

Figura 91 – Fotografias das fissuras ao longo do tempo analisado das amostras REF e A_3



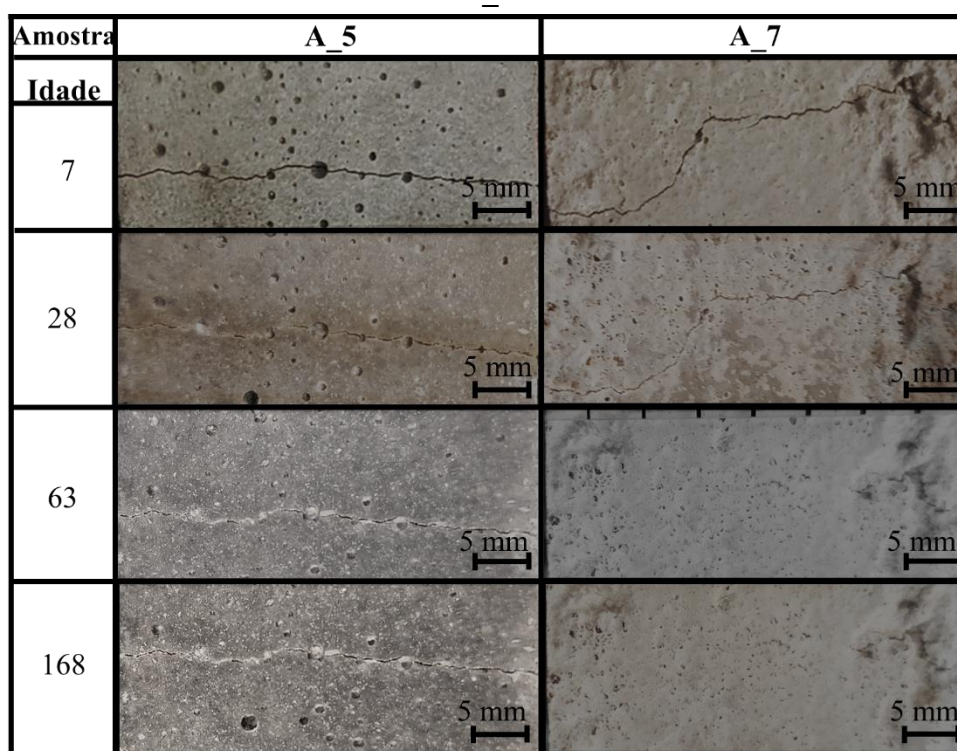
Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 91, pode-se observar que as fissuras da argamassa de referência (REF) sofreram uma pequena redução. De acordo com Zhang *et al.* (2019) a capacidade de autocicatrização autógena dos materiais cimentícios é limitada. Edvardsen (1999) e Zhang *et al.*, (2020) complementam que essa autocicatrização pode ocorrer pela reidratação de partículas de cimento não hidratadas ou insuficientemente hidratadas.

Porém de acordo com este pesquisador a espessura máxima de fissura que pode ser fechada nesse caso é limitada a 0,15 mm.

As fissuras com adição de esporos bacterianos, por sua vez, apresentaram uma diminuição mais efetiva da sua espessura nas argamassas com adição de 10^5 e 10^7 esporos/mL (Figura 92). Entretanto apenas a argamassa A_7 apresentou um total fechamento da fissura durante o tempo de análise. De acordo com Zhang *et al.* (2019) a autocicatrização de fissuras por adição de bactérias vai gradativamente reduzindo a espessura da fissura, como resultado da biomineralização.

Figura 92 – Fotografias das fissuras ao longo do tempo analisado das amostras A_5 e A_7



Fonte: Autora.

Além disso pode-se verificar que o fechamento das fissuras acontece das paredes da fissura para o seu interior, o que corrobora com os resultados apresentados por Qian *et al.* (2009). Entretanto ao observar a evolução da autocicatrização, verificou-se uma maior autocicatrização até os 63 dias de análise e uma pequena influência após essa idade. Tal fato pode ter ocorrido pela bactéria ter consumido o hidróxido de cálcio presente no material e após os 63 dias não possuir uma fonte de cálcio para promover a autocicatrização. Por esse motivo, conforme relatado anteriormente, na próxima etapa experimental uma fonte de cálcio será adicionada à matriz cimentícia.

Além disso de acordo com Mondal e Ghosh (2018), conforme as fissuras e poros são fechados, o material fica mais impermeável, o que dificulta o acesso da água a bactéria e prejudica a continuidade das reações de autocicatrização.

De acordo com Wang *et al.* (2014)^(a e b) a abertura máxima de fissuras fechada por bactérias é de 0,46 mm. Wiktor e Jonkers (2011) conseguiram fechar fissuras de até 0,4 mm após 100 dias de cura, adicionando a bactéria *Bacillus alkalinitrilicus* juntamente com uma solução de lactato de cálcio na concentração 10^5 esporos/mL incorporados em argila expandida.

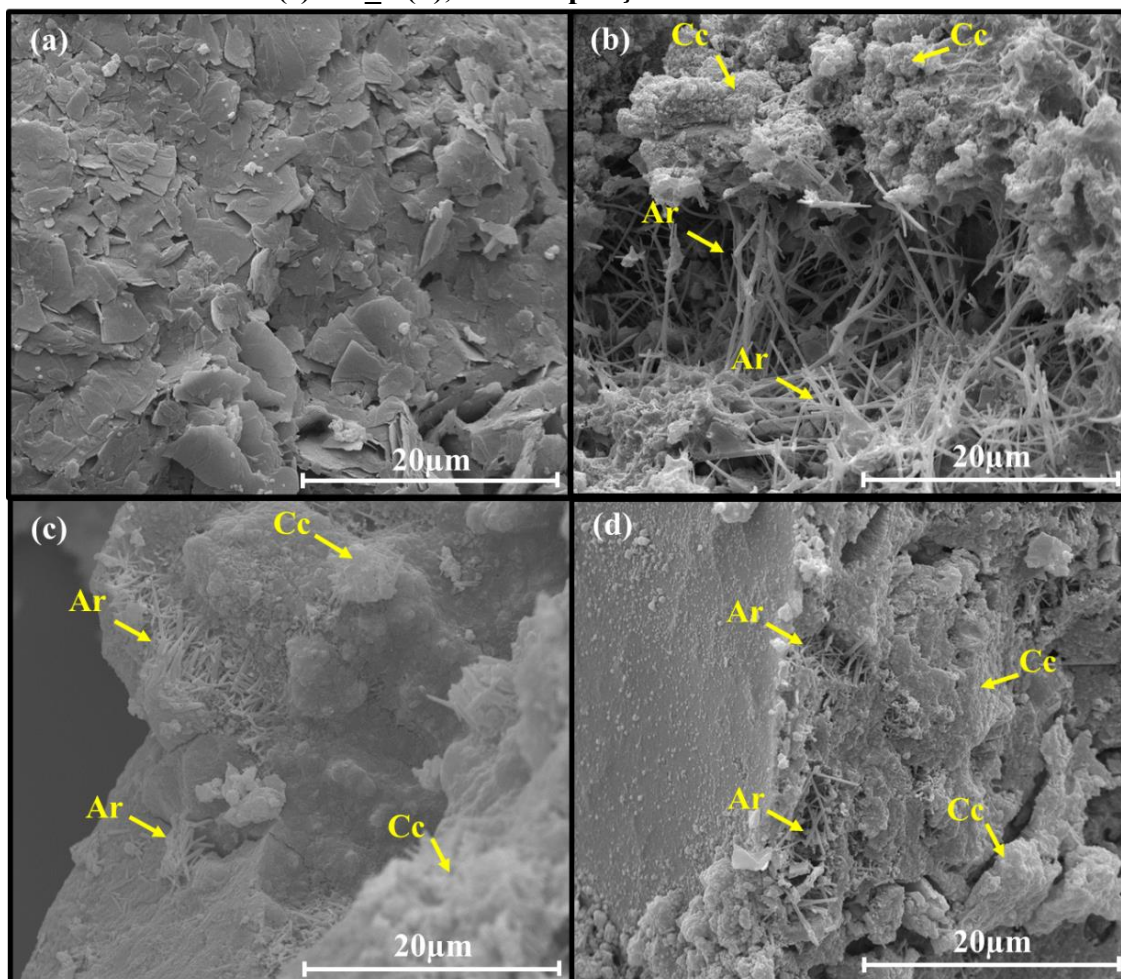
Além destes pesquisadores, Xu e Wang (2018) conseguiram fechar fissuras de 0,42 mm utilizando bactérias encapsuladas com meio de cultivo e fonte de cálcio. Porém a adição de meio de cultivo em materiais cimentícios pode ser prejudicial às propriedades mecânicas e à durabilidade.

É importante lembrar que, após o período de análise as fissuras foram raspadas para análise em MEV e EDS. Os resultados obtidos podem ser visualizados na sequência.

4.2.2.2.6 Análise em MEV do material precipitado

Após os 168 dias o material precipitado nas fissuras foi raspado com o uso de um bisturi e encaminhado para análise em Microscópio Eletrônico de Varredura. As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 93, sendo que as setas apontam para morfologias típicas de cristais de calcita (Cc) e aragonita (Ar), ambos polimórficos de carbonato de cálcio.

Figura 93 – MEV do material retirado das fissuras das amostras REF (a), A_3 (b), A_5 (c) e A_7 (d), com ampliação de 6.000 vezes



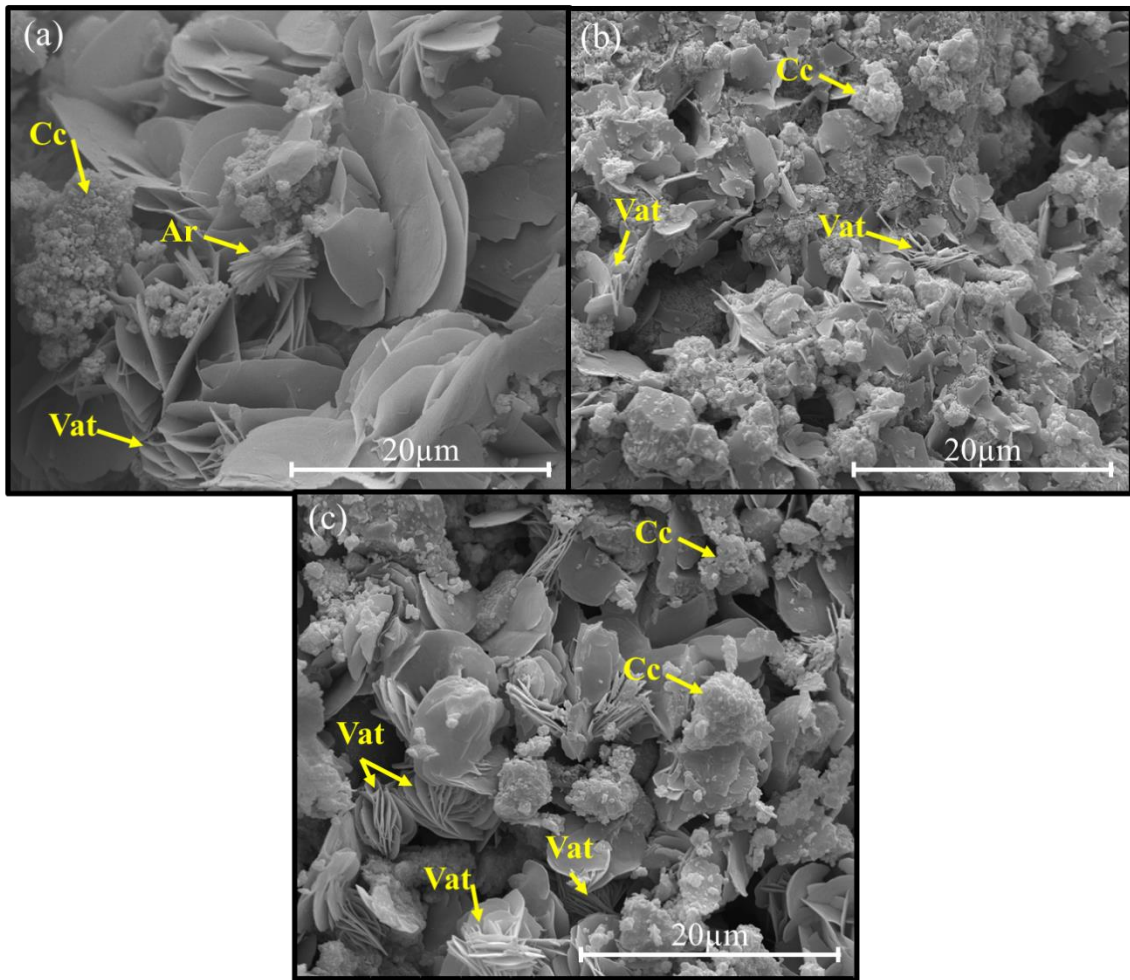
Notas: Calcita (Cc); Aragonita (Ar).

Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 93, pode-se observar que na amostra de referência não foram encontrados cristais, enquanto nas amostras com adição de esporos bacterianos cristais com morfologia de calcita e aragonita foram encontrados. De acordo com De Muynck *et al.* (2010) e Sharma *et al.* (2017) a autocicatrização de fissuras por adição de bactérias é resultado da precipitação de carbonato de cálcio, tipicamente na forma de calcita, varita e aragonita. A morfologia dos cristais corrobora com o apresentado na literatura por Konno *et al.* (2002), Braissant *et al.* (2003), Muynck *et al.* (2008), Park *et al.* (2012) e Schwantes-Cezario *et al.* (2017).

Além das morfologias típicas de calcita (Cc) e aragonita (Ar), também foram encontrados cristais de varita (Vat) nas amostras A_3, A_5 e A_7, conforme ilustra a Figura 94. Vale destacar que a morfologia apresentada corrobora com a apresentada por Dhami, Reddy e Mukherjee (2013).

Figura 94 – Cristais encontrados nas amostras de A_3 (a), A_5 (b) e A_7 (c)

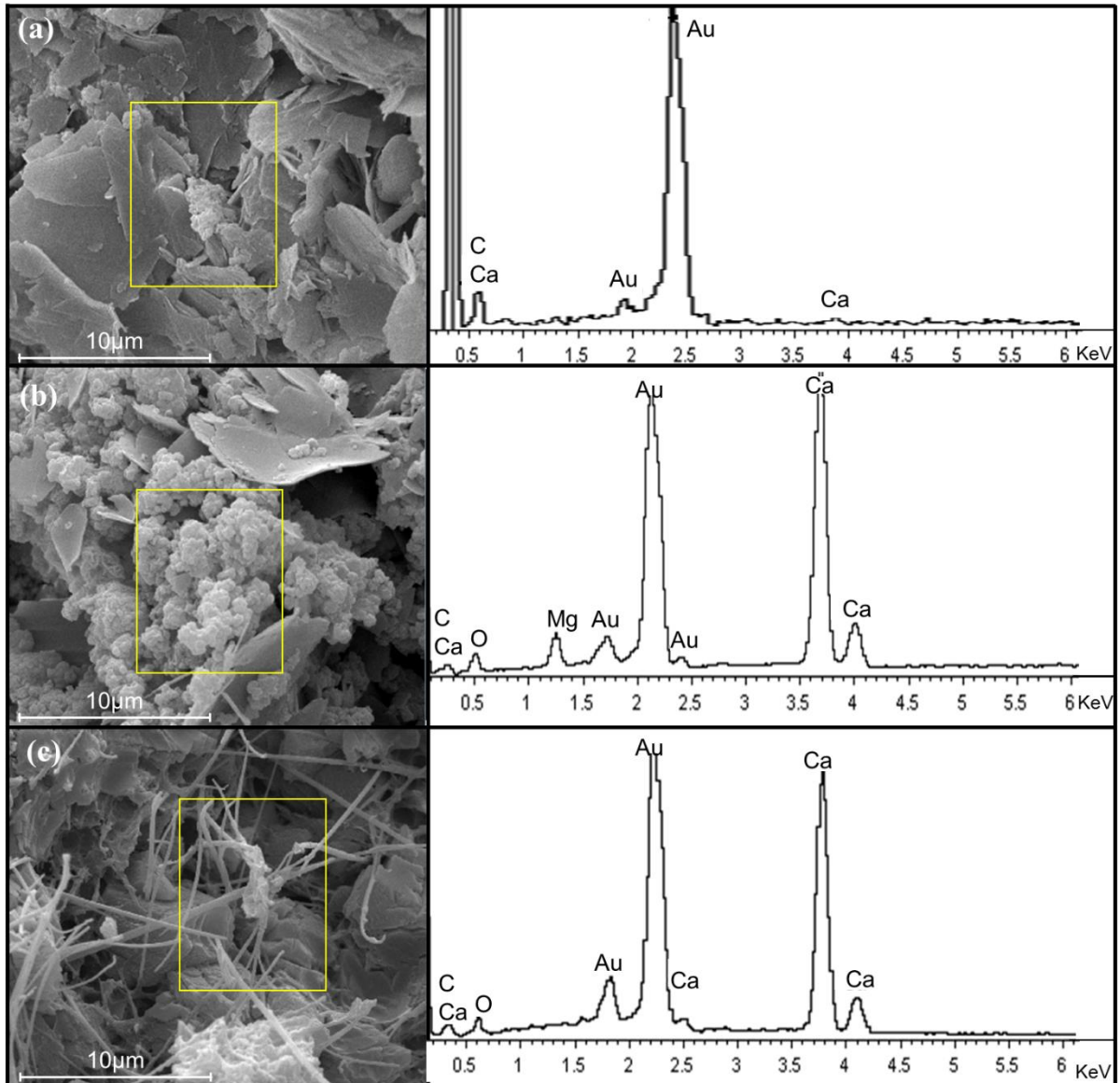


Notas: Calcita (Cc); Aragonita (Ar); Varita (Vat).

Fonte: Autora.

O Sistema de Energia Dispersiva (EDS), associado às morfologias encontradas nas amostras retiradas das fissuras, estão apresentados nas Figuras 95, 96 e 97. A Figura 95 (a) apresenta a imagem de MEV e EDS do material retirado da fissura da argamassa de referência (REF), na qual não se verificou a precipitação de cristais. Na sequência, na Figura 95 (b) e (c) tem-se as imagens e o EDS do material retirado da fissura da argamassa com adição de 10^3 esporos/mL (A_3), com morfologias típicas de calcita (b) e aragonita (c). Vale destacar que o EDS da Figura 95 (b) apresentou um pico de magnésio (Mg), possivelmente pela precipitação de dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$).

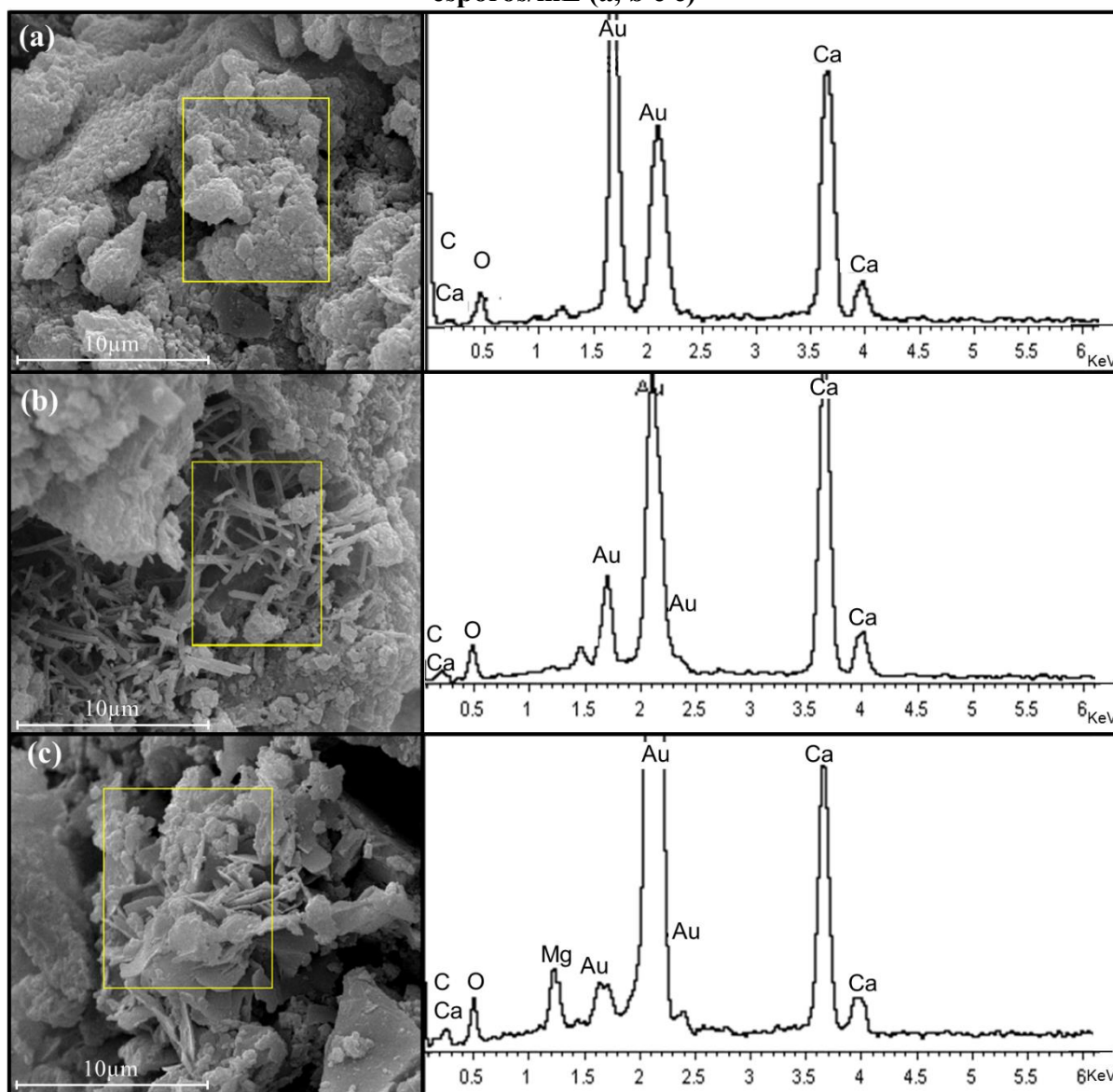
Figura 95 – MEV e EDS do material retirado da fissura da argamassa de referência (a) e da argamassa com adição de 10^3 esporos/mL (b e c)



Fonte: Autora.

Na Figura 96 tem-se as imagens de MEV e os difratogramas de EDS da argamassa com adição de 10^5 células/mL (A_5), sendo que em (a) tem-se a morfologia típica de calcita, em (b) aragonita e (c) calcita e dolomita.

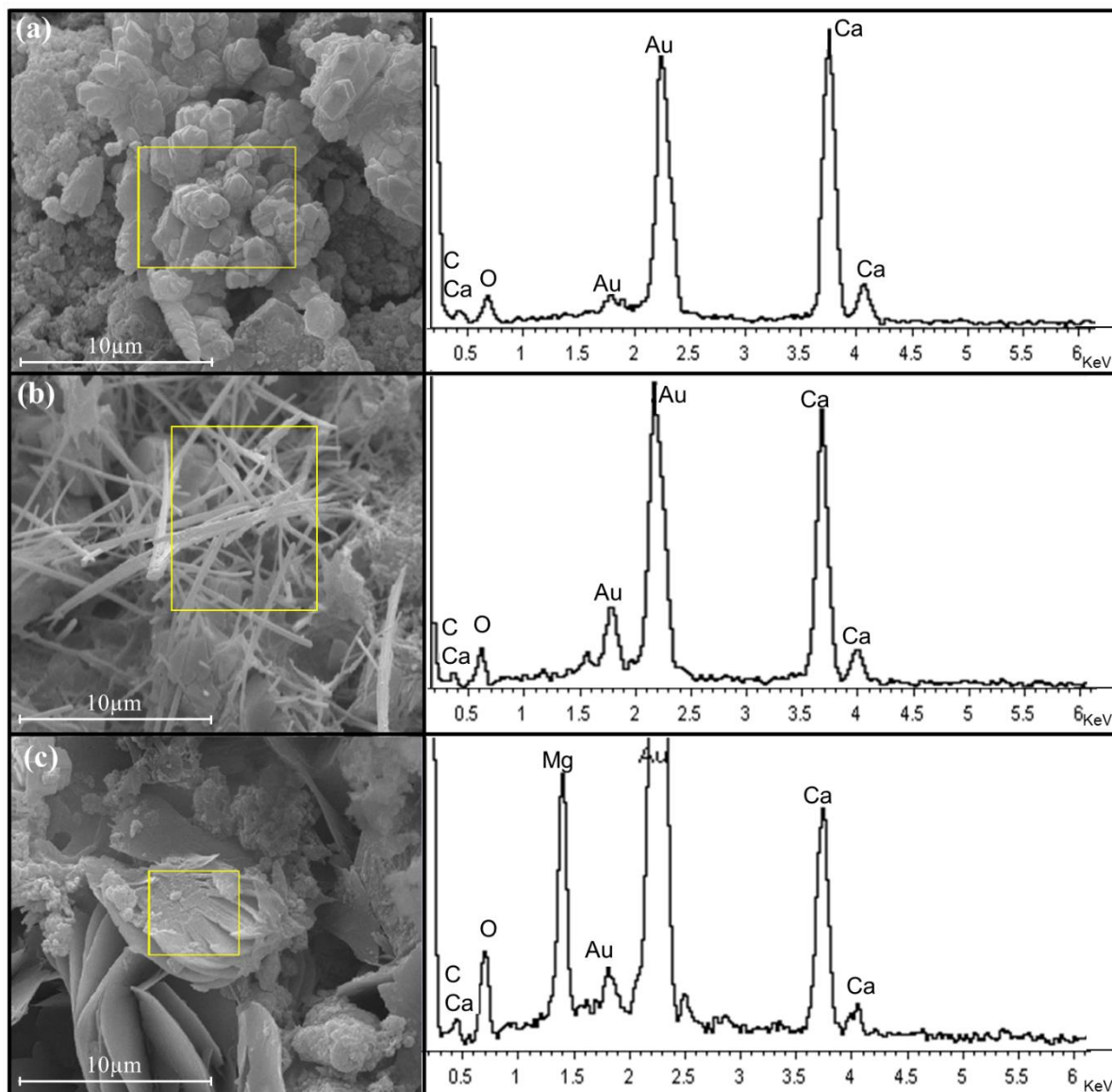
Figura 96 – MEV e EDS do material retirado da fissura da argamassa com adição de 10^5 esporos/mL (a, b e c)



Fonte: Autora.

Por fim, na Figura 97 estão apresentadas as imagens de MEV e o EDS do material retirado da fissura da argamassa com 10^7 esporos/mL (A_7), na qual em (a) pode-se visualizar morfologias típicas de calcita, em (b) de aragonita e em (c) de dolomita.

Figura 97 – MEV e EDS do material retirado da fissura da argamassa com adição de 10^7 esporos/mL (a, b e c)



Fonte: Autora.

Analisando as amostras retiradas das argamassas com adição de esporos bacterianos, observou-se além das morfologias típicas já apresentadas na literatura, picos de cálcio, carbono e oxigênio, quando foram visualizadas morfologias típicas de cristais de CaCO_3 , como calcita e aragonita. Além disso observou-se a precipitação de dolomita, caracterizados por cristais de maiores dimensões. Entretanto vale destacar que de acordo com Jung e colaboradores (2020) os cristais de CaCO_3 precipitados por bactérias não ureolíticas variam em tamanho dependendo do tipo de fonte de cálcio utilizada pela bactéria na bioprecipitação.

É importante apontar que, em uma análise global das amostras, foi verificada uma tendência maior de precipitação de calcita, na sequência aragonita e uma menor incidência de varita e dolomita.

Desta forma, a partir dos resultados apresentados, a concentração de 10^7 esporos/mL foi selecionada para a terceira e última campanha experimental. Essa escolha foi embasada principalmente nos resultados do acompanhamento da fissura por imagem, no qual verificou-se que a argamassa A_7 foi capaz de fechar a fissura de maneira completa, enquanto a concentração de 10^5 esporos/mL (A_5) não teve essa capacidade. Vale destacar que essa concentração não apresentou prejuízos às propriedades mecânicas e não se diferenciou estatisticamente da concentração de 10^5 esporos/mL nos ensaios de absorção de água e índice de vazios e também teve capacidade de fechamento de poros de acordo com as imagens obtidas por estereoscópio.

4.3 TERCEIRA CAMPANHA EXPERIMENTAL

A partir dos resultados das duas primeiras campanhas experimentais, a terceira tem como objetivo determinar se há influência da condição de exposição na autocicatrização mediante a adição dos esporos bacterianos. Para isso, foi utilizada a mesma argamassa de traço 1:3, em massa, com relação a/c de 0,54 e adição de esporos na concentração de 10^7 esporos/mL. Além disso nesta campanha foi adicionado lactato de cálcio em 3%, com relação à massa de cimento, buscando potencializar a atuação bacteriana na precipitação de CaCO_3 . Os resultados obtidos estão apresentados na sequência.

4.3.1 Ensaios no estado fresco

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados de massa específica e de índice de consistência das argamassas. Vale lembrar que para os ensaios no estado fresco havia apenas três grupos de amostras: a referência, com esporos e o tratamento de superfície, pois as amostras foram submetidas às diferentes condições de exposição apenas após o 7º dia de cura.

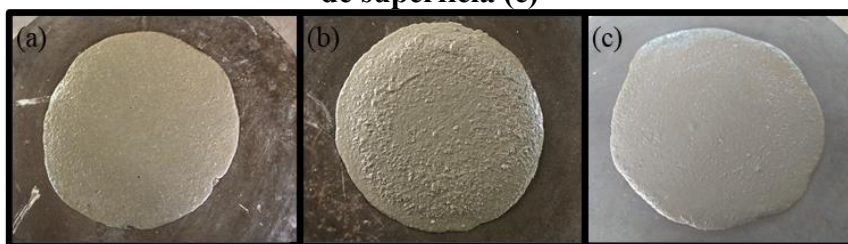
Tabela 14 – Resultados dos ensaios das argamassas em fresco

Argamassas	Grupo Referência (R)	Grupo Esporos (E)	Grupo Tratamento de Superfície (E_TS)
Índice de consistência (mm)	250	270	250
Massa específica (g/cm^3)	2,18	2,20	2,18

Fonte: Autora.

A partir da análise da Tabela 14 observou-se que a massa específica, em média, foi de $2,19 \text{ g/cm}^3$ e que o índice de consistência foi de $260 \pm 10 \text{ mm}$. A Figura 98 ilustra o resultado do ensaio de consistência das argamassas, a partir da qual pode-se visualizar que um aumento no índice de consistência pela adição dos esporos bacterianos, o que corrobora com estudos apresentados por Luo e Quian (2016) e com os resultados obtidos na segunda campanha experimental.

Figura 98 – Índice de consistência do grupo: de referência (a), esporos (b) e tratamento de superfície (c)



Fonte: Autora.

Vale destacar que o índice de consistência da argamassa de referência e com adição dos esporos bacterianos foi o mesmo da segunda campanha experimental. Tal fato indica que a adição de lactato de cálcio não influenciou no índice de consistência.

Após a realização dos ensaios em fresco, os corpos de prova foram moldados para análise no estado endurecido quanto a autocicatrização de fissuras (Etapa 1), fechamento de poros (Etapa 2) e resistência à compressão e avanço de carbonatação (Etapa 3). Os resultados destes ensaios estão apresentados na sequência.

4.3.2 Etapa 1

Na etapa 1 analisou-se a autocicatrização de corpos de prova fissurados a partir de análise de imagem em estereoscópio e a partir de ensaio de permeabilidade a carga variável. Após o período de 168 dias, as fissuras foram raspadas e encaminhadas para ensaios de FRX, DRX e TG.

4.3.2.1 Acompanhamento das fissuras em estereoscópio

O acompanhamento das fissuras em estereoscópio foi realizado para a análise visual e para o cálculo da taxa de autocicatrização ao longo do tempo. As fissuras analisadas variaram de 0,140 a 0,327 mm, sendo que na Tabela 15 tem-se a espessura média, aos 7 dias, das amostras analisadas em estereoscópio.

Tabela 15 – Espessuras médias das fissuras medidas em estereoscópio aos 7 dias

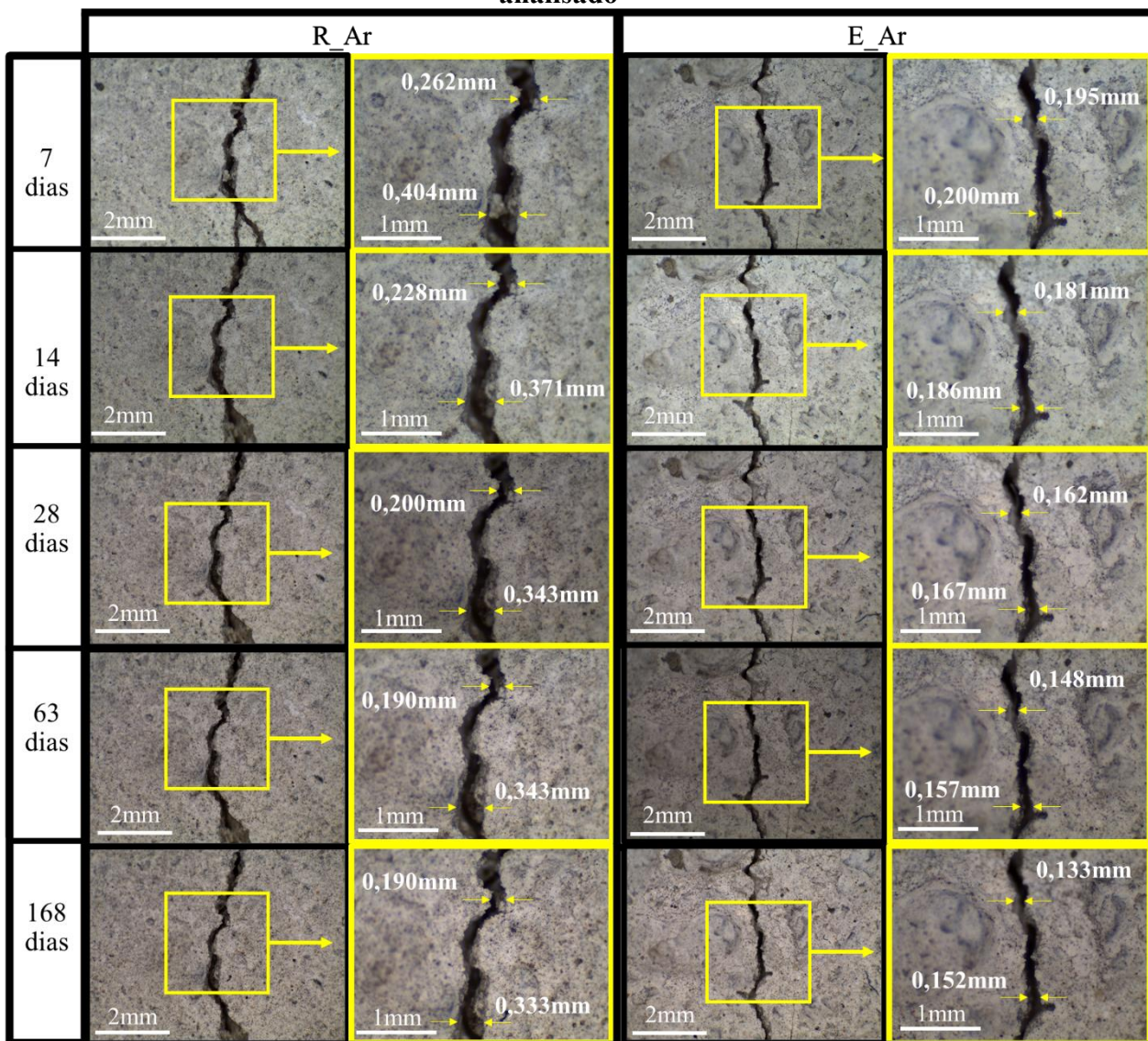
Amostra	Espessura média (mm)
R_Ar	0,317
E_Ar	0,182
R_Im_Água	0,145
E_Im_Água	0,140
R_Im_Cal	0,187
E_Im_Cal	0,185
R_Int	0,296
E_Int	0,327
R_TS	0,184
E_TS	0,208

Fonte: Autora.

As Figuras 99 a 100 ilustram o acompanhamento das fissuras em estereoscópio ao longo do período de análise, separadas por condição de exposição na seguinte ordem: amostras expostas ao ar (R_Ar e E_Ar – Figura 99), imersas em água (R_Im_Água e E_Im_Água – Figura 100), imersas em água saturada com cal (R_Im_Cal e E_Im_Cal – Figura 101), em regime intermitente (R_Int e E_Int - Figura 102) e submetidas ao tratamento de superfície (E_TS - Figura 103). Vale destacar que após a apresentação das imagens de estereoscópio obtidas ao longo do tempo, os resultados da taxa de autocicatrização serão apresentados e discutidos.

A partir da comparação das imagens das amostras expostas ao ar (Figura 99), nota-se uma pequena alteração em relação à espessura da fissura formada ao longo do tempo, além de não ser possível identificar visualmente a formação de cristais de carbonato de cálcio. Tal fato corrobora com a literatura, que indica uma maior dificuldade da bioprecipitação na ausência de água (ZHANG *et al.* 2020), apontando que apenas a umidade presente no ar não foi suficiente para que a autocicatrização da fissura ocorresse. Vale destacar que as amostras não ficaram em câmara úmida, para simular a situação mais próxima do real.

Figura 99 – Imagens de estereoscópio das amostras expostas ao ar ao longo do período analisado



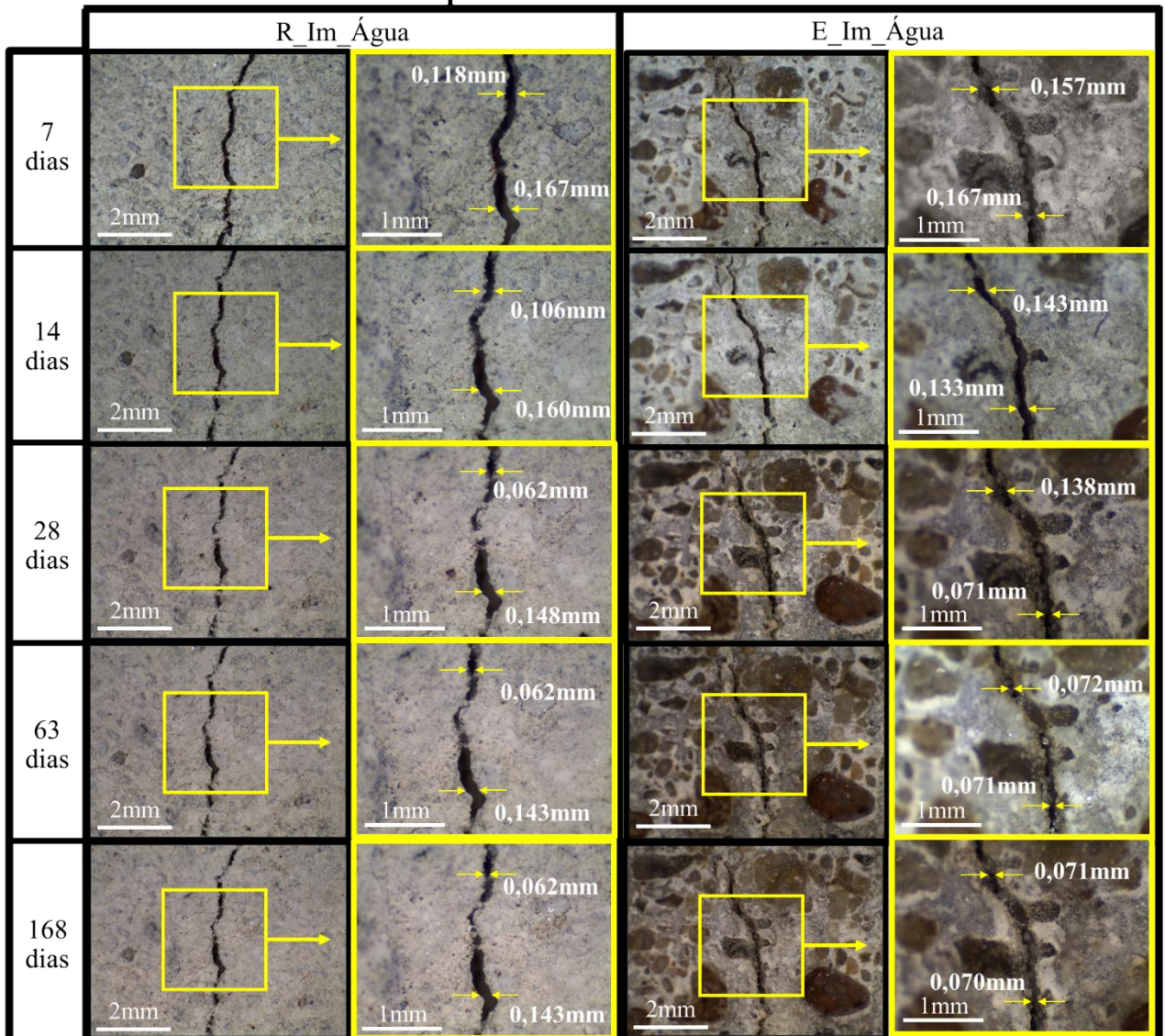
Fonte: Autora.

De acordo com Justo-Reinoso e colaboradores (2021) a espessura da fissura é um fator determinante na velocidade de autocicatrização por ação bacteriana. De acordo com os pesquisadores diferentes eficiências de fechamento de fissuras foram observadas na literatura. Tal fato é justificado por diferentes fatores adotados, como a espécie bacteriana, os meios de crescimento, a condição de exposição, entre outros.

Liu, Xu e Xing (2020) estudaram a adição da bactéria *S. pasteurii* imobilizada em perlita expandida. Após a fissuração pelo ensaio de flexão em 3 pontos, que gerou fissuras de aproximadamente 0,3 mm, os corpos de prova foram expostos ao ambiente e houve a autocicatrização pela adição das bactérias. Entretanto o artigo não relata a umidade relativa que as amostras ficaram expostas durante o período de análise.

Na sequência tem-se as imagens das amostras imersas em água ao longo do período de análise (Figura 100). Em comparação a condição exposta ao ar (Figura 99), as amostras imersas em água apresentaram um melhor desempenho na precipitação de cristais, sendo possível visualizar a formação dos cristais de CaCO_3 , principalmente a partir da idade de 28 dias da amostra com esporos (E_Im_Água). Pequenas diminuições foram evidenciadas também na amostra de referência, em decorrência da autocicatrização autógena. Entretanto o fechamento foi maior na amostra com adição dos esporos bacterianos, corroborando com os resultados apresentados por Schlangen e Wang (2015), Tang, Kardani e Cui (2015) e De Brito e Kurda (2020).

Figura 100 – Imagens de estereoscópio das amostras imersas em água ao longo do período analisado



Fonte: Autora.

É interessante relatar que dentre os artigos levantados na revisão bibliográfica, grande parte estudou a condição de cura submersa em água (em torno de 46%),

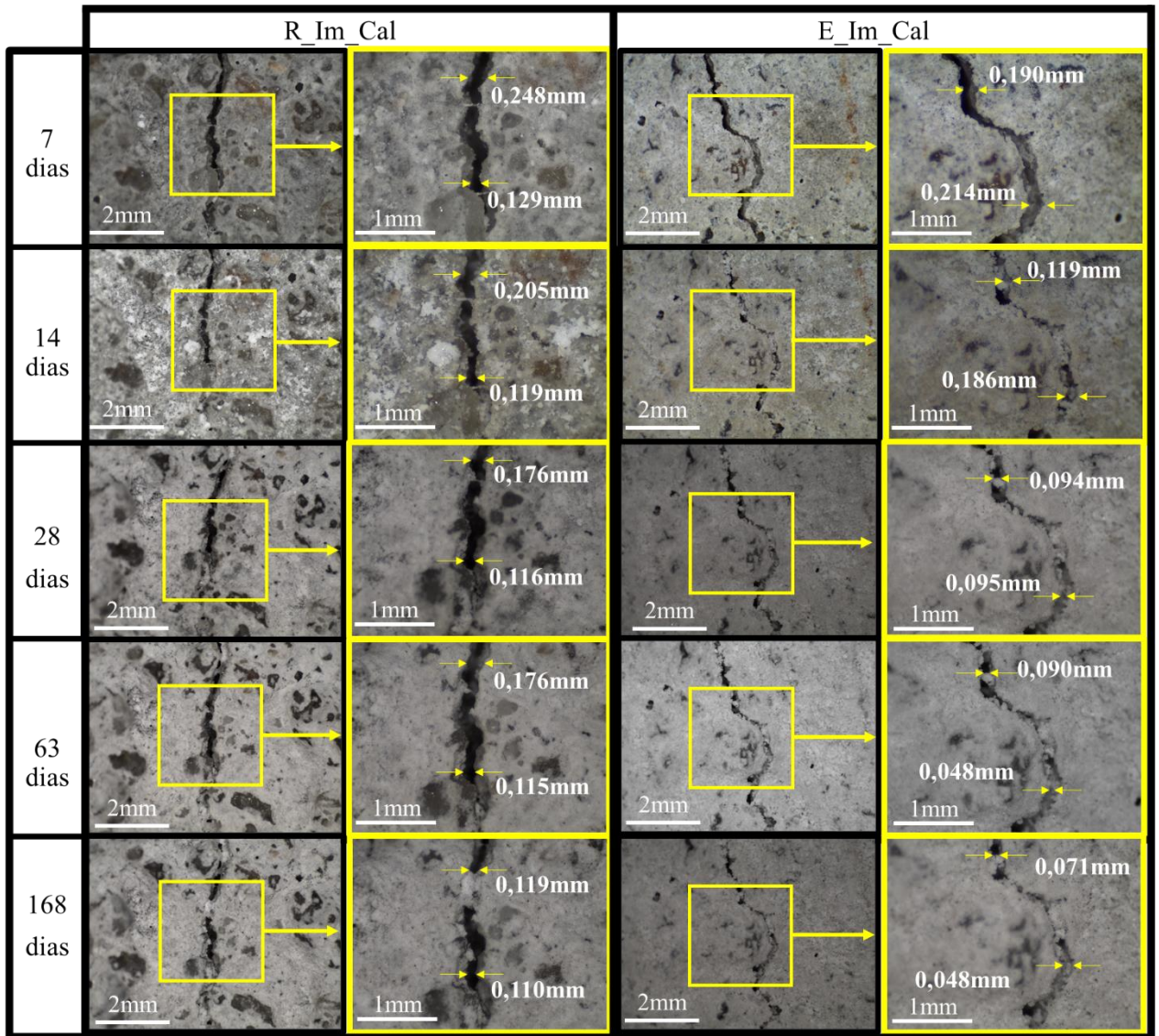
mesmo que esta não fosse avaliada de maneira comparativa com outras condições de cura ou de exposição. Tal fato é justificado por vários autores relatarem que a presença de água líquida é necessária para que as bactérias sejam capazes de precipitar cristais de CaCO_3 . Entretanto este fato não é corroborado por todos os pesquisadores, sendo que alguns estudos apontam que condições úmidas são suficientes para certas cepas cristalizarem fissuras (ALAZHARI *et al.* 2018).

Neste sentido, Alazhari e colaboradores (2018) estudaram a bactéria *B. pseudofirmus* encapsulada em agregados em concentrações entre 10^6 e 10^8 células/mL, juntamente com meio de cultivo e acetato de cálcio. Os pesquisadores curaram as amostras imersas em água nos primeiros 28 dias e nesta idade realizaram a fissuração. Após a fissuração, as amostras ficaram armazenadas a umidade relativa próxima a 100% e temperatura de 30°C. Após 165 dias de análise, os autores verificaram a autocicatrização das fissuras frente a adição de bactérias.

A Figura 101 ilustra o acompanhamento das fissuras das amostras imersas em cal. A partir da Figura 101, nota-se que a amostra com esporos imersa em água saturada com cal (E_Im_Cal) apresentou um maior fechamento da fissura, comparada à amostra referência (R_Im_Cal), sendo possível observar a formação dos cristais ao longo da fissura.

A cal pode ser uma fonte adicional de cálcio para que a precipitação de CaCO_3 aconteça por vias metabólicas bacterianas, por esse motivo, era esperado que a autocicatrização fosse maior nas amostras em contato com cal do que nas amostras imersas em água. Vale ressaltar que em escala de laboratório a cura convencional é em água saturada com cal decorrente da indicação da NBR 5738 (ABNT, 2015), no entanto, este procedimento não é adotado em edificações reais.

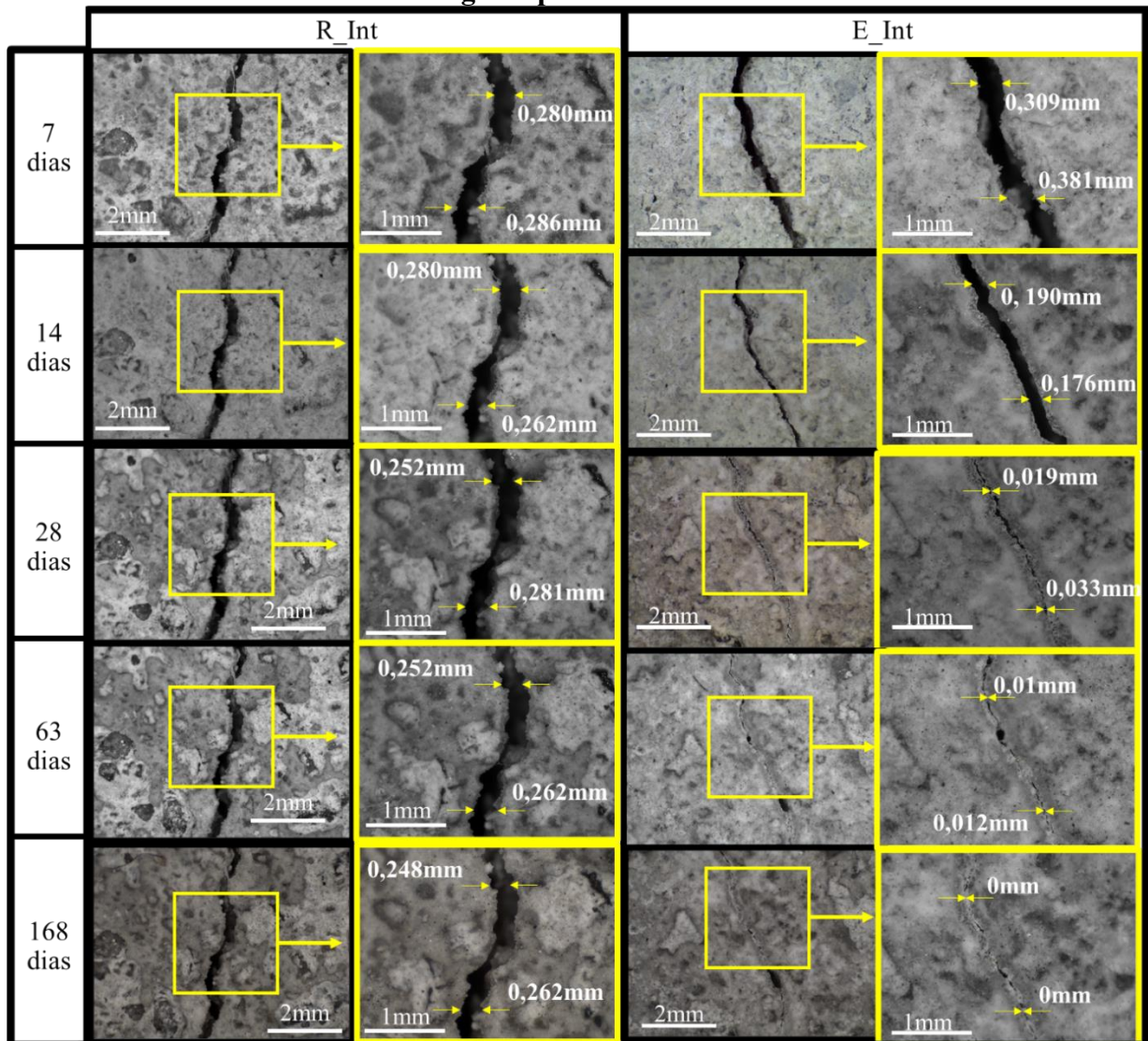
Figura 101 – Imagens de estereoscópio das amostras imersas em cal ao longo do período analisado



Fonte: Autora.

Na sequência tem-se a Figura 102 com as imagens das amostras do regime intermitente. Vale lembrar que as argamassas submetidas ao regime intermitente ficaram, durante os 168 dias de análise, expostas ao ar por 12 horas e imersas em água nas 12 horas restantes. Para que isso fosse possível, um sistema mecanizado foi elaborado, conforme apresentado no item 3.3.2.1.

Figura 102 – Imagens de estereoscópio das amostras submetidas ao regime intermitente ao longo do período analisado



Fonte: Autora.

Como pode-se observar, entre as amostras que tiveram a adição de bactéria no momento da mistura, a maior atuação foi no regime intermitente, onde verificou-se uma autocicatrização quase que completa em uma fissura de maior espessura que as anteriores.

Tal fato corrobora com o relatado por Tziviloglou *et al.* (2016) e Wang *et al.* (2014), que verificaram um maior fechamento de fissuras quando as amostras eram submetidas a regimes intermitentes (*dry-wet*). Entretanto Luo, Qian e Li (2015) verificaram uma maior autocicatrização em amostras imersas em água. É válido destacar que diferentes bactérias podem precipitar CaCO_3 em diferentes condições, por isso o estudo das condições de exposição é importante quando se busca uma bactéria para autocicatrização em materiais cimentícios.

A condição de exposição intermitente também foi estudada por Wang *et al.* (2014), Tziviloglou *et al.* (2016), Luo *et al.* (2015) e Van Mullem *et al.* (2020). Estes

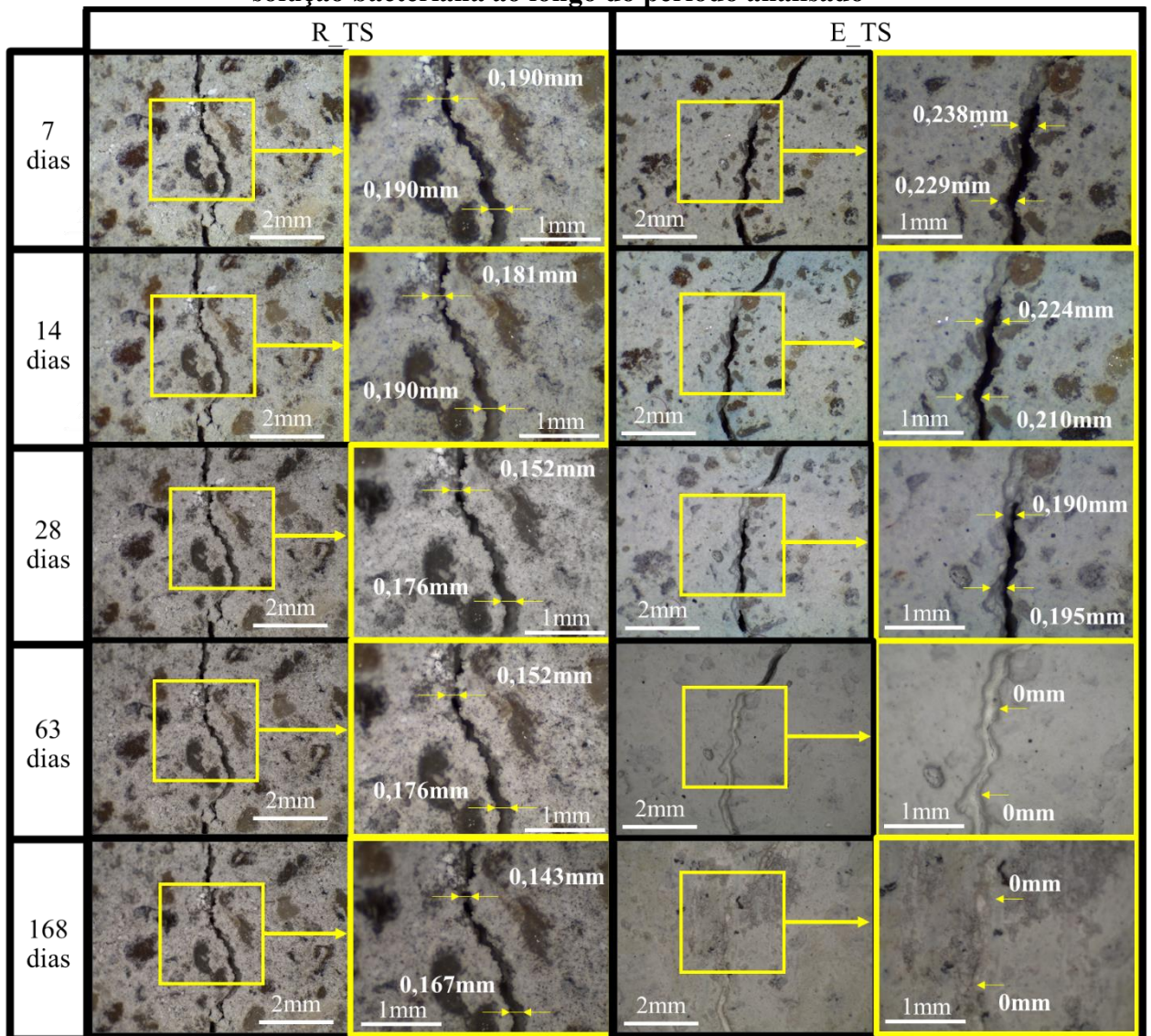
pesquisadores atribuem o sucesso da autocicatrização por ação bacteriana no regime intermitente à presença de água durante o período imerso e de CO₂ durante o período ao ar.

De acordo com El-Turki *et al.* (2010) o regime intermitente pode favorecer a carbonatação, que pode potencializar a autocicatrização. Como carbonato de cálcio adicional pode ser produzido devido à reação entre o hidróxido de cálcio e o CO₂ atmosférico, ou gerado pela respiração bacteriana, é provável que ambientes intermitentes (úmidos/secos) sejam benéficos, pois a carbonatação tem se mostrado mais rápida em tais ambientes.

Segundo Alazhari *et al.* (2018) o método de respiração aeróbica para conversão de uma fonte de cálcio em carbonato de cálcio requer a presença de oxigênio e, conseqüentemente, a cura tende a ser lenta sob a água e potencializada por regimes intermitentes (secos/úmidos). Entretanto existem bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas que podem ser aplicadas e não necessitam de oxigênio para a respiração celular.

Além das argamassas que tiveram adição dos esporos bacterianos no momento da mistura (E_Ar, E_Im_Água, E_Im_Cal e E_Int), uma argamassa sem a adição dos microrganismos na água de amassamento foi elaborada para que os esporos bacterianos pudessem ser adicionados como tratamento de superfície (E_TS), com um dispositivo borrifador. As imagens obtidas desta argamassa estão apresentadas na Figura 103. Vale lembrar que a argamassa recebeu o tratamento de superfície 2x ao dia, aproximadamente às 8 e 18 horas, durante os 168 dias de análise.

Figura 103 – Imagens de estereoscópio das amostras tratadas superficialmente com a solução bacteriana ao longo do período analisado



Fonte: Autora.

Como pode-se observar na Figura 103, dos 28 aos 63 dias, basicamente toda a superfície da fissura foi fechada mediante ao tratamento bacteriano, mostrando que a bactéria testada poderia ser utilizada em edificações existentes para o tratamento de fissuras estéticas.

Vale destacar que a amostra do tratamento de superfície foi comparada com uma amostra de mesma composição, chamada de R_TS, exposta ao ar e sem a aplicação da solução bacteriana e lactato de cálcio.

Daskalakis e colaboradores (2015) utilizaram a bactéria *B. pumilus* isolada de uma caverna da Grécia, para o tratamento de superfície de peças de mármore, a solução utilizada tinha de 10^8 a 10^9 células/mL e era suplementada com acetato de cálcio e meio de cultivo à base

de peptona. Os pesquisadores não avaliaram fissuras, mas verificaram a formação constante de varita, mesmo em amostras que foram reavaliadas depois de 365 dias.

Choi e colaboradores (2017) realizaram o tratamento de superfície de argamassas com a adição da bactéria *Sp. pasteurii* com uma solução de ureia e cloreto de cálcio. A ureia foi utilizada pois o microrganismo testado é uma bactéria ureolítica (precipita CaCO_3 a partir da hidrólise da ureia) e as fissuras analisadas variaram entre 0,15 e 1,72 mm.

Para o tratamento de superfície, os pesquisadores imergiram os corpos de prova na solução bacteriana por duas horas, para que eles estivessem saturados, deixavam-os em uma superfície plana por 5 minutos, para que o excesso de solução escorresse e na sequência imergiram as amostras na solução de ureia e cloreto de cálcio por 22 horas. Este procedimento foi considerado pelos pesquisadores como um ciclo de tratamento (CHOI *et al.*, 2017).

Através da realização do experimento, os pesquisadores verificaram que o aumento do número de ciclos de tratamento resultou em uma diminuição da permeabilidade a carga constante em corpos de prova fissurados, ou seja, as fissuras foram se fechando com o aumento dos ciclos. Além disso quanto maior era o número de ciclos, os microrganismos eram capazes de fechar fissuras de maiores espessuras e por esse motivo o tratamento foi considerado eficaz no fechamento de fissuras (CHOI *et al.*, 2017).

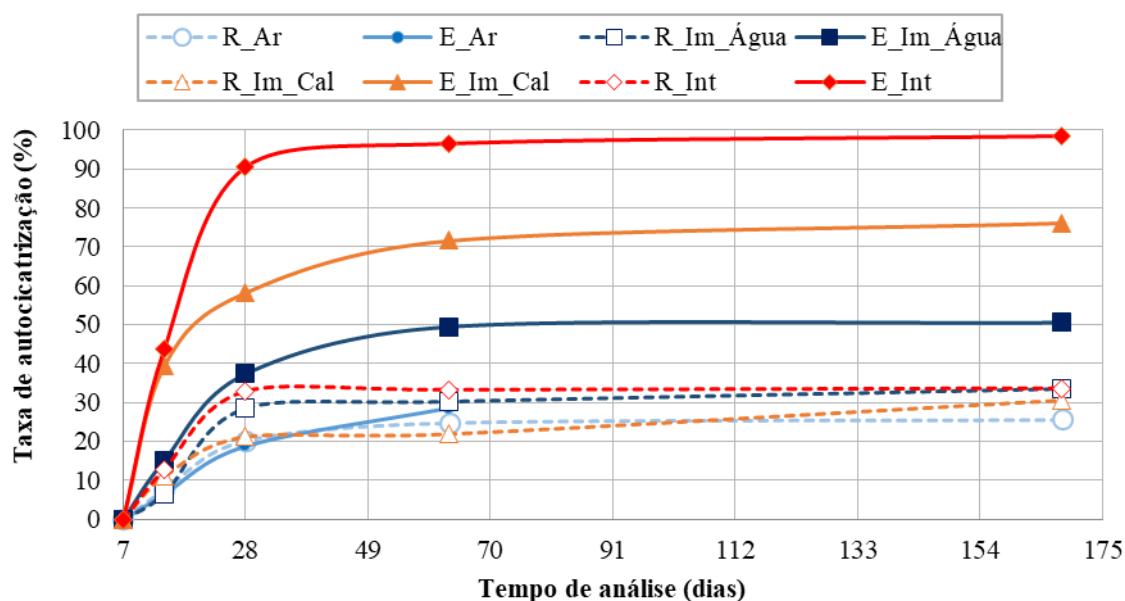
Por fim, a primeira aplicação em escala real de bactérias como tratamento de superfície foi realizada por Wiktor e Jonkers (2015). Estes pesquisadores avaliaram fissuras reais (1 a 3 mm) de um edifício garagem e as trataram com uma solução de bactérias alcali-resistentes por pulverização. A solução foi aplicada após dois meses os pesquisadores observaram uma diminuição na permeabilidade da laje frente ao tratamento. Desta forma, observa-se que o tratamento de superfície por adição de bactérias tem se demonstrado eficaz na literatura, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

Após a análise das imagens, o cálculo da taxa de autocicatrização foi realizado com a aplicação da Equação 1. Para tal, em cada fissura, quatro medidas foram tomadas para o cálculo da espessura média em cada idade. As medidas foram realizadas nas extremidades ilustradas nas Figuras 99 a 103, e duas medidas intermediárias a estas foram tomadas. Entretanto por questão de poluição visual, elas não foram apresentadas nas imagens.

O resultado da taxa de autocicatrização ao longo do tempo pode ser visualizado na Figura 104 para todas as condições de exposição e na sequência na Figura 105 separado por condição de exposição para a comparação com as respectivas referências.

Vale destacar que a cor utilizada para cada condição de exposição foi padronizada para todos os resultados, de maneira a facilitar a análise. A cor azul clara está relacionada à cura ao ar, a cor azul escura às amostras imersas em água, as linhas laranjadas representam as amostras imersas em cal e as vermelhas às submetidas ao regime intermitente. Além disso as linhas contínuas são relacionadas a adição dos esporos e as linhas pontilhadas estão relacionadas às suas respectivas referências.

Figura 104 – Taxa de autocicatrização calculada com base no acompanhamento da espessura das fissuras em estereoscópio das amostras com e sem adição de bactérias na água de amassamento para todas as condições de exposição



Fonte: Autora.

A partir de uma análise geral do gráfico pode-se observar a maior taxa de autocicatrização foi atingida pela argamassa E_Int, seguida da E_Im_Cal e E_Im_Água. Além disso verificou-se que a taxa de autocicatrização das argamassas de referência (R_Ar, R_Im_Água, R_Im_Cal e R_Int) foram inferiores à 35% durante todo o período de análise.

Vale destacar que taxas de autocicatrização entre 30 e 40% foram encontradas em amostras fissuradas sem bactérias em estudos realizados por Liu, Xu e Xing (2020) e Skevi *et al.* (2021) em decorrência da autocicatrização autógena.

Entretanto Liu, Xu e Xing (2020) estudaram as amostras apenas até a idade de 28 dias e observaram também uma taxa de autocicatrização próxima a 90% quando o concreto foi tratado com bactéria e lactato de cálcio impregnados em perlita expandida. As fissuras estudadas pelos pesquisadores tinham espessura entre 0,25 e 0,33 mm, porém os

pesquisadores não detalharam a condição de exposição das amostras após a fissuração, apenas relataram que elas foram colocadas em *pallets* e expostas ao ar.

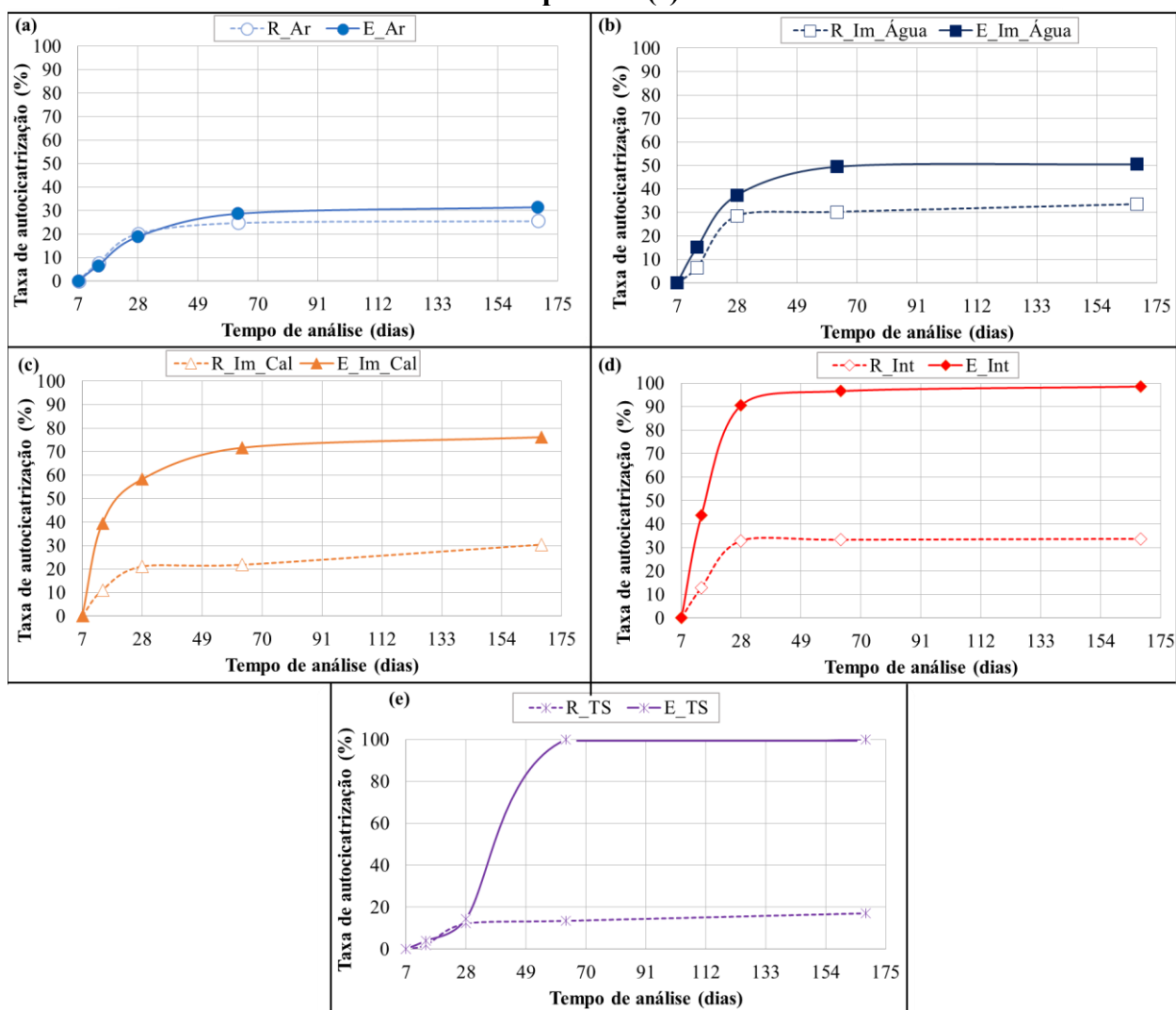
Ademais, constatou-se que em todas as argamassas a taxa de autocicatrização aumentou de maneira mais efetiva até a idade de 28 dias, depois deste tempo o crescimento continuou apenas nas argamassas com adição de esporos bacterianos, mas não na mesma intensidade. Tal fato ocorreu pela presença do hidróxido de cálcio e lactato de cálcio nas amostras, os quais podem ser utilizados pela bactéria na precipitação de CaCO_3 conforme indicado nas Equações 12 e 13 (JONKERS *et al.*, 2010 e MOHAMMED *et al.* 2020).

A taxa de autocicatrização da condição exposta ao ar foi a única que mesmo com a adição dos esporos bacterianos ficou abaixo de 35% durante o tempo de análise, tal fato indica uma limitação quanto ao uso do tratamento bacteriano para autocicatrização de fissuras em ambientes secos. Este comportamento está associado à necessidade de a bactéria estar em contato com a água para que possa precipitar cristais de CaCO_3 (ZHANG *et al.* 2020), sendo que a umidade do ar não foi suficiente para desencadear as reações de precipitação.

A verificação na exposição ao ar é importante por se tratar da situação real de edificações convencionais. Pensando em uma futura aplicação da solução bacteriana na construção civil, frente aos resultados obtidos até esse momento, observa-se que ela teria maior potencial de aplicação em ambientes úmidos ou em contato direto com a água.

A Figura 105 ilustra as taxas de autocicatrização separadas por condição de exposição, para que se possa realizar uma melhor comparação da atuação bacteriana em cada condição de exposição, quando comparada a sua respectiva referência.

Figura 105 – Taxa de autocicatrização calculada separada por condição de exposição: ao ar (a), imersa em água (b), imersa em cal (c), em regime intermitente (d) e do tratamento de superfície (e)



Fonte: Autora.

A partir da Figura 105, observa-se que na condição exposta ao ar o tratamento bacteriano não foi efetivo, pois, as curvas da R_Ar e E_Ar estão basicamente sobrepostas e com uma baixa taxa de autocicatrização. Nas condições em contato com água, por sua vez, a taxa de autocicatrização frente a adição bacteriana foi maior, em torno de 50% na imersa em água, 76% na imersa em cal e 100% no regime intermitente.

Ao examinar a Figura 105 (e) verifica-se uma atuação significativa do tratamento de superfície na autocicatrização após os 28 dias de idade, mostrando que este foi capaz de fechar a fissura durante o tempo de análise. Vale destacar que o tratamento de superfície (E_TS) não foi adicionado à Figura 104 pois sua composição é diferente das demais argamassas, já que não possui lactato de cálcio em sua composição, mas foi tratado

superficialmente com a solução em mesma concentração do que foi adicionado na água de amassamento.

Vale destacar que o tratamento de superfície também foi capaz de fechar fissuras durante o tempo de análise, mostrando-se como uma alternativa para o tratamento de fissuras em edificações reais. Entretanto mais estudos precisam ser conduzidos para verificar se o potencial do material é o mesmo em superfícies pintadas e o tempo que a solução leva para fechar fissuras de diferentes espessuras.

Stuckrath e colaboradores (2014) analisaram fissuras de 0,08 a 0,22 mm em diferentes grupos de amostras com e sem a bactéria *B. pseudofirmus* e verificaram que apenas a adição de lactato de cálcio foi capaz de autocicatizar as fissuras durante o tempo de análise (100 dias). De acordo com os pesquisadores tal fato é justificado pela adição do lactato de cálcio contribuir para a carbonatação e resultar na autocicatização de fissuras de pequenas dimensões. Jonkers *et al.* (2010) e Tan *et al.* (2020) observaram o mesmo comportamento para fissuras de pequenas dimensões.

Além da análise de fissuras por estereoscópio, o ensaio de permeabilidade por carga variável foi realizado em amostras fissuradas para a determinação da taxa de autocicatização, estes resultados estão apresentados na sequência.

4.3.2.2 Permeabilidade em corpos de prova fissurados

O ensaio de permeabilidade seguiu as recomendações do Teste da Rilem 11.4 (TAN *et al.*, 2020; REEKSTING *et al.*, 2020) e foi realizado sempre no mesmo corpo de prova ao longo do período de cura. Para a determinação da permeabilidade foi utilizada a Eq. 14 e para o cálculo da autocicatização a Eq. 15.

Dos dois corpos de prova destinados a este ensaio apenas um foi selecionado, pois mesmo tomando todos os cuidados durante o processo de fissuração, houve variações nas espessuras obtidas que conseqüentemente influenciaram nos resultados.

Desta maneira, para realização de uma análise comparativa, fissuras medidas aos 7 dias, em estereoscópio, entre 0,178 mm e 0,199 mm foram selecionadas. Vale destacar que sempre se buscou selecionar os corpos de prova com espessura mais próxima em cada condição de exposição, para que se pudesse avaliar a influência da adição dos esporos na permeabilidade e na autocicatização do material. As espessuras de fissura dos corpos de prova ensaiados estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Espessuras médias das fissuras medidas em estereoscópio aos 7 dias e utilizadas no ensaio de permeabilidade

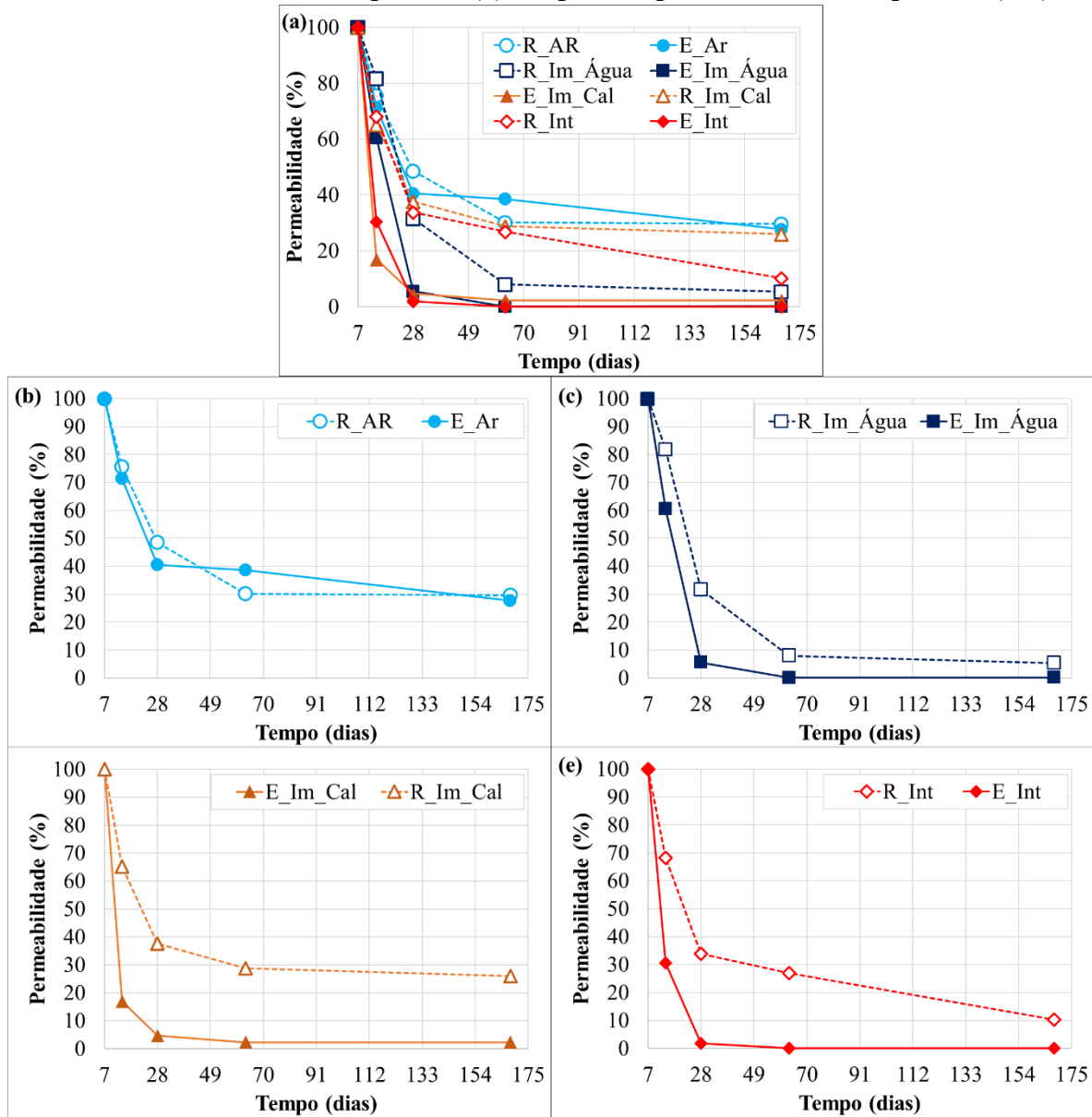
Amostra	Espessura média (mm)
R Ar	0,196
E Ar	0,199
R Im Água	0,179
E Im Água	0,178
R Im Cal	0,186
E Im Cal	0,184
R Int	0,181
E Int	0,179
R TS	0,196
E TS	0,200

Fonte: Autora.

É importante destacar que a determinação da espessura média, aos 7 dias, seguiu os mesmos parâmetros da determinação das espessuras em estereoscópio. Quatro medições foram realizadas, ao longo da fissura e a média destas foi obtida para cada corpo de prova.

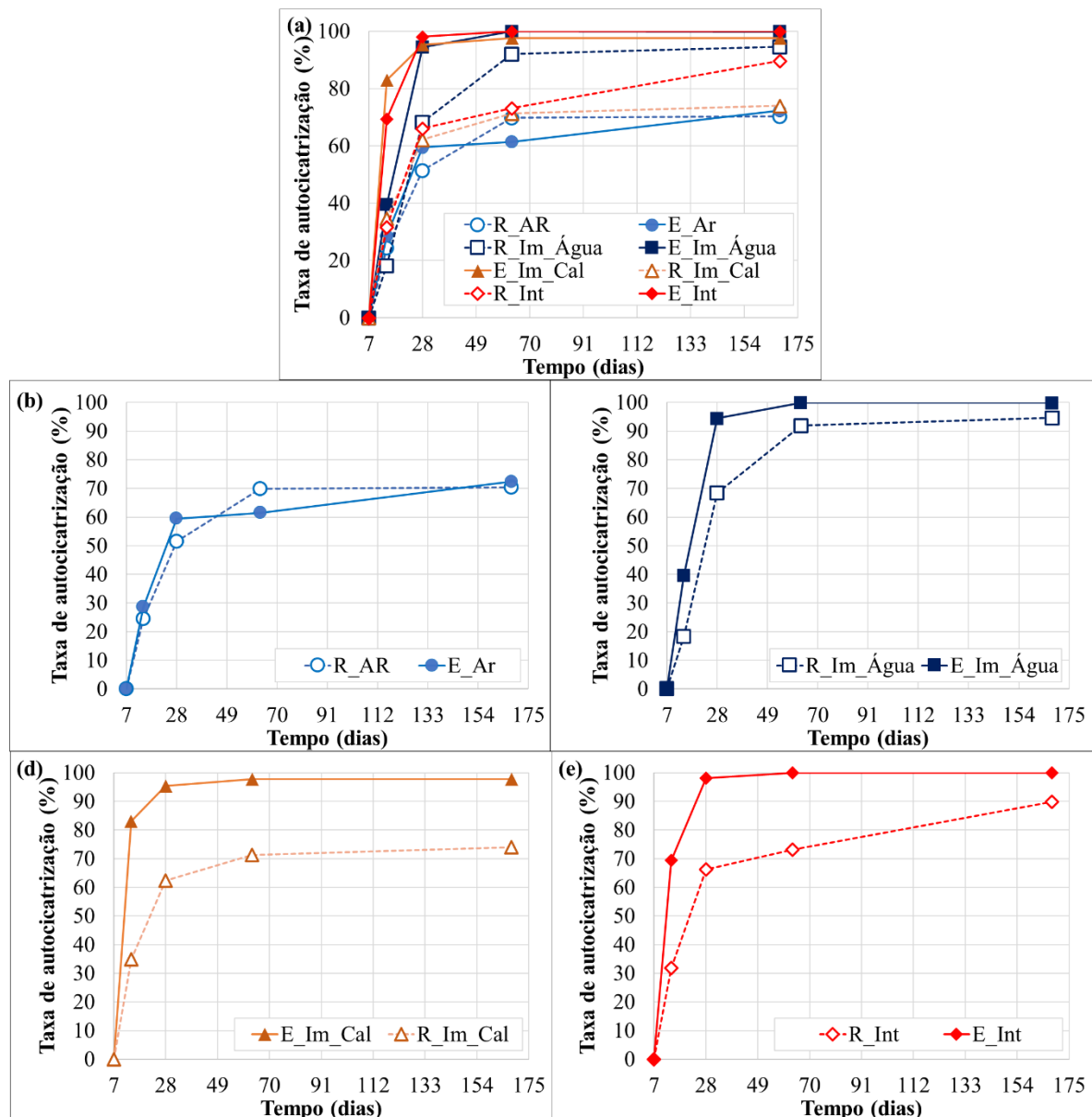
As Figuras 106 e 107 (a) ilustram os resultados da permeabilidade e da taxa de autocicatrização das amostras expostas ao ar, imersas em água, imersas em cal e submetidas ao regime intermitente de maneira conjunta, para uma análise global dos resultados. As Figuras 106 e 107 (b-e) exibem os resultados da permeabilidade e da taxa de autocicatrização separadas por condição de exposição. É importante citar que a taxa de autocicatrização do tratamento de superfície será apresentado mais a diante, pela composição da matriz cimentícia ser diferente.

Figura 106 – Permeabilidade dos corpos de prova fissurados ao longo do tempo para as diferentes condições de exposição (a) e separado por condição de exposição (b-e)



Fonte: Autora.

Figura 107 – Taxa de autocicatrização dos corpos de prova ao longo do tempo para as diferentes condições de exposição (a) e separado por condição de exposição (b-e)



Fonte: Autora.

Frente ao apresentado é importante destacar que os resultados obtidos da taxa de autocicatrização por medição da espessura e por permeabilidade não devem ser comparados, pois foram realizados em corpos de prova diferentes e dessa maneira os aspectos geométricos da fissura (espessura, profundidade e forma) não eram iguais.

É interessante destacar que fissuras reais tem um formato próximo a um “V”, com a espessura diminuindo ao longo da sua profundidade. Desta maneira, a análise pela permeabilidade consegue avaliar a autocicatrização de forma mais efetiva. Sendo assim, a tendência é que a taxa de autocicatrização pela permeabilidade seja maior, lembrando que o

processo de autocicatrização se inicia da parede da fissura para o seu interior na menor espessura da fissura.

Assim, observa-se que a argamassa exposta ao ar apresentou um comportamento semelhante com e sem adição de bactérias, reforçando a necessidade da bactéria *B. subtilis* CV16 estar em contato com água para que a precipitação de CaCO_3 ocorra. Nas demais condições de exposição verificou-se uma mudança maior no comportamento das argamassas com adição de esporos quando comparadas as suas respectivas referências.

De maneira geral, observa-se que a inclinação da reta nas amostras com adição dos esporos bacterianos e em contato com água (E_Im_Água, E_Im_Cal e E_Int) foi maior nas primeiras idades. Tal fato pode estar associado a fissura ter sido fechada em sua maior profundidade, onde a espessura tende a ser menor. Além disso conforme abordado no tópico anterior, nas primeiras idades as bactérias tinham contato com lactato de cálcio e hidróxido de cálcio, os quais podem ser utilizados na produção de CaCO_3 , fazendo com que o fechamento das fissuras fosse maior durante o período inicial.

Além disso Mondal e Ghosh (2018) relataram que conforme a taxa de autocicatrização aumenta a amostra torna-se mais impermeável. Devido ao aumento da impermeabilidade na superfície da amostra, tem-se uma menor quantidade de água disponível internamente, diminuindo a velocidade de cicatrização com o passar do tempo.

Qian *et al.* (2015) estudaram a adição da bactéria *B. mucilaginous* L3 em pastas cimenticas, juntamente com nutrientes, e observaram que com a adição bacteriana juntamente com os nutrientes resultou na diminuição da permeabilidade durante o tempo de análise. Entretanto a adição dos nutrientes, sem a bactéria, resultou em uma diminuição da permeabilidade nos primeiros 5 dias, depois não houve diferença entre o grupo de amostras com nutrientes e sem (referência).

Além disso estes pesquisadores observaram que fissuras de até 0,4 mm obtiveram mais de 90% de autocicatrização após 30 dias, frente a adição do microrganismo com meio de cultivo. Entretanto verificaram que fissuras de maiores espessuras (entre 0,5 e 0,8 mm) tiveram autocicatrização entre 60 e 80%, respectivamente. Vale ressaltar que estas amostras, após a fissuração, foram armazenadas em câmara úmida a umidade de 95% e temperatura relativa de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (QIAN *et al.*, 2015).

Wang e colaboradores (2014) verificaram que a partir da adição de bactérias encapsuladas houve uma diminuição da permeabilidade, principalmente exposta ao regime intermitente (16 horas imerso/8 horas ao ar), mas que essa atuação bacteriana se estabilizou

entre 20 e 30 dias. A partir da análise das Figuras 106 e 107, observa-se que a estabilização se deu a partir dos 63 dias nas amostras em contato com água (imersa em água, em cal e exposta ao regime intermitente), sendo que quando as bactérias foram adicionadas, nesta idade a fissura estava basicamente 100% autocicatrizadas.

Rong *et al.* (2020) estudaram a incorporação da bactéria *Sp. pasteurii* em diferentes concentrações juntamente com meio de cultivo, ureia e acetato e cálcio em argamassas. Estes pesquisadores calcularam a taxa de autocicatrização a partir da medição da fissura e pelo ensaio de permeabilidade e observaram a mesma tendência verificada nos resultados deste trabalho, com uma maior autocicatrização nas primeiras idades.

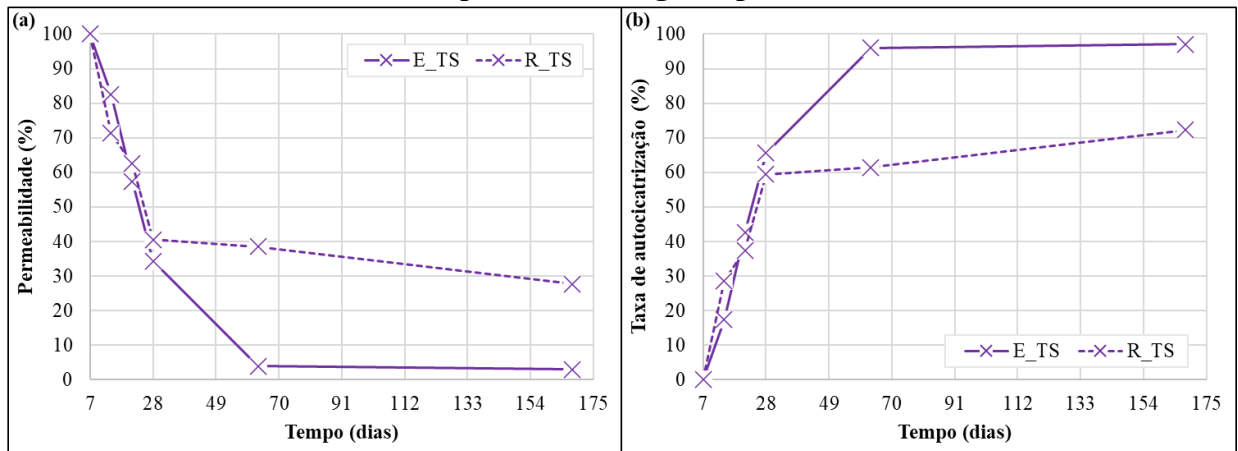
Quando os pesquisadores adicionaram a concentração de 10^7 células/mL e calcularam a taxa de autocicatrização pela medição da fissura, verificaram uma taxa de autocicatrização de fissuras entre 0,2 e 0,3 mm de 65% aos 28 dias e 68% aos 50 dias. Vale destacar que Rong e colaboradores (2020) estudaram apenas a condição de exposição imersa em água e esta mesma condição de exposição pode ser observada na Figura 105 (b), em que a taxa de autocicatrização foi próxima a 60%, sem a adição de ureia e meio de cultivo.

Com relação à permeabilidade, o ensaio realizado por Rong *et al.* (2020) foi o de carga constante, que difere da análise realizada na pesquisa (carga variável). Os resultados obtidos pelos pesquisadores na concentração de 10^7 células/mL foram de 53% de taxa de autocicatrização para fissuras entre 0,2 e 0,3 mm, que são próximas às analisadas no experimento. De maneira comparativa, no caso da permeabilidade, observou-se que a bactéria *B. subtilis* CV16 foi capaz de autocicatrizando aos 28 dias mais de 90% das fissuras quando as amostras estão em contato com água (E_Im_Água, E_Im_Cal e E_Int).

É interessante mencionar que, de acordo com Justo-Reinoso *et al.* (2021), o entendimento das condições de exposição que resultam em uma maior autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios é fundamental para que se possa ter um maior entendimento das situações reais em que essa solução pode ser adotada.

Além das amostras que receberam os esporos na água de amassamento, é importante lembrar que uma amostra não recebeu a adição dos esporos na água de amassamento, mas no tratamento de superfície. Os resultados obtidos para a permeabilidade podem ser visualizados na Figura 108 (a) e da taxa de autocicatrização na Figura 108 (b).

Figura 108 – Permeabilidade (a) e taxa de autocicatrização (b) das amostras quanto ao tratamento de superfície ao longo do período de análise



Fonte: Autora.

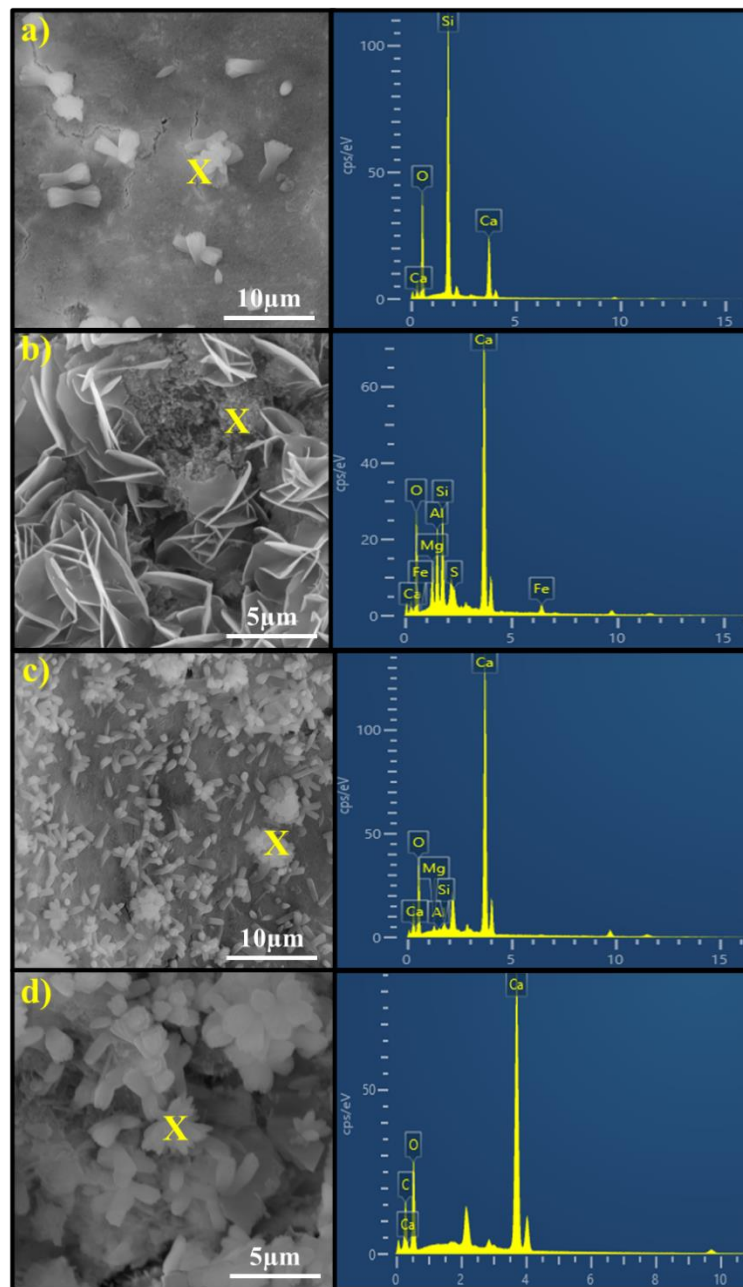
Diferentemente das amostras que receberam os esporos bacterianos na água de amassamento, no tratamento de superfície observou-se que após os 28 dias a permeabilidade continuou sendo reduzida, aumentando a taxa de autocicatrização até os 168 dias. Tal fato pode estar relacionado a fonte de cálcio ser borrifada com a bactéria diariamente, fornecendo a bactéria, lactato de cálcio, água e CO₂ constantemente para que a precipitação ocorresse.

É importante lembrar que na primeira etapa experimental, além da autocicatrização das fissuras, amostras foram extraídas para análise em MEV e EDS e que após 168 dias de análise, as fissuras foram raspadas para análise química em FRX, DRX e TG.

4.3.2.3 MEV e EDS

As análises em MEV e EDS desta campanha experimental foram realizadas no Instituto Senai de Inovação, em Maringá. O ensaio foi conduzido aos 7, 28 e 168 dias. As imagens das argamassas obtidas aos 7 dias estão apresentadas na Figura 109, sendo que o local demarcado com “X” marca o ponto onde a análise em EDS foi realizada. Vale ressaltar que aos 7 dias foram analisadas as amostras de referência (R) e a argamassa com esporos (E), lembrando que as amostras foram submetidas a diferentes condições de exposição após 7 dias de cura.

Figura 109 – MEV e EDS das amostras de referência (R) aos 7 dias obtidas com ampliação de 6.000x (a) e 12.000x (b) seguidas pelas amostras com adição dos esporos (E) nas mesmas ampliações de 6.000x (c) e 12.000x (d)



Fonte: Autora.

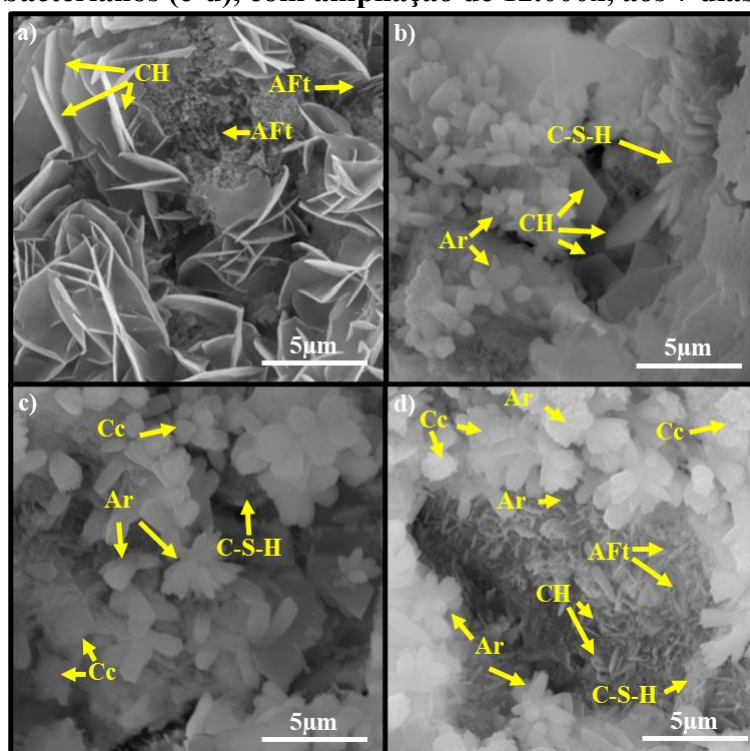
É interessante destacar que as amostras foram cobertas com ouro paládio para a aquisição das imagens e por esse motivo os elementos químicos de ouro e paládio foram excluídos do EDS. Além disso o operador do equipamento não fixou os eixos x e y e por esse motivo houve uma variação da escala. Entretanto como o ensaio é qualitativo e não quantitativo, a análise não foi prejudicada.

A partir da análise da Figura 109 (a) observa-se que na amostra de referência foram encontradas regiões mais limpas, com picos de Silício (Si), possivelmente pela presença

de areia no local onde o EDS foi realizado. Analisando a morfologia do material presente na amostra da Figura 109 (b) foram observados também produtos de hidratação, como o hidróxido de cálcio (CH), etringita (AFt) e silicato de cálcio hidratado (C-S-H), com picos de cálcio (Ca), alumínio (Al), magnésio (Mg), enxofre (S) e oxigênio (O), que são elementos presentes nas estruturas citadas.

Além dos compostos citados, diferentes polimorfos de carbonato de cálcio (CaCO_3) foram encontrados, principalmente nas amostras com adição dos esporos bacterianos (Figura 109 c-d), o que era esperado pois estes produzem CaCO_3 . Pela morfologia dos cristais encontrados, estes foram identificados como aragonita (Ar) e calcita (Cc) (KONNO *et al.*, 2002; DE MUYNCK *et al.*, 2010; WIKTOR e JONKERS, 2011; DHAMI *et al.*, 2013). O detalhamento dos cristais encontrados pode ser visualizado na Figura 110.

Figura 110 – MEV das amostras de referência (a-b) e das amostras com adição dos esporos bacterianos (c-d), com ampliação de 12.000x, aos 7 dias de idade



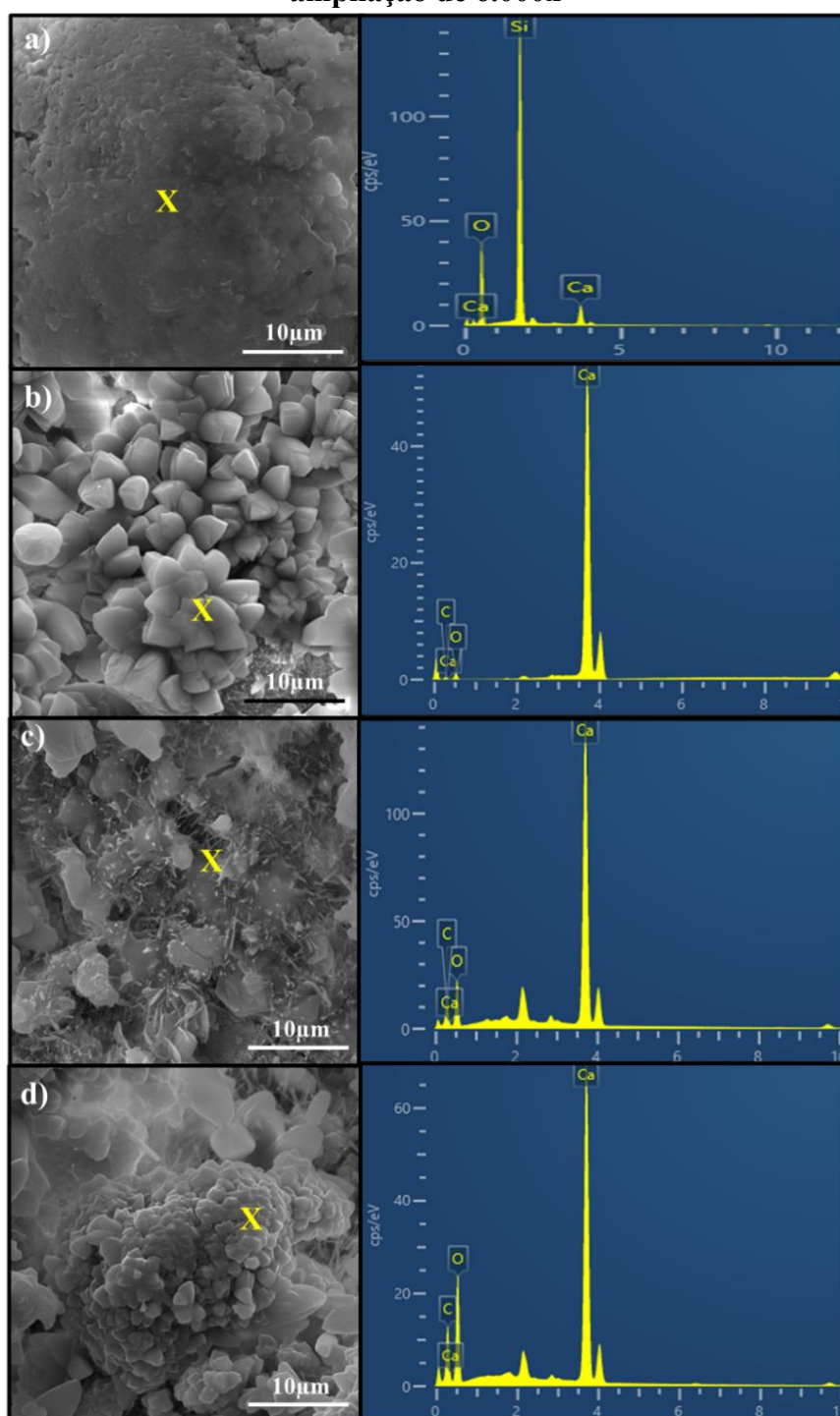
Fonte: Autora.

As morfologias típicas de AFt, CH, Cc e Ar corroboram com o levantamento bibliográfico apresentado no item 2.1.8 (KONO *et al.*, 2002; DE MUYNCK *et al.*, 2010; WIKTOR e JONKERS, 2011; SCHLANGEN e SANGADJI, 2013; PEI *et al.*, 2013; STUCKRATH *et al.*, 2014; ACHAL *et al.*, 2015).

Após o 7º dia de cura, as argamassas foram submetidas a diferentes condições de exposição e foram analisadas em MEV e EDS novamente aos 28 e 168 dias de idade. Os

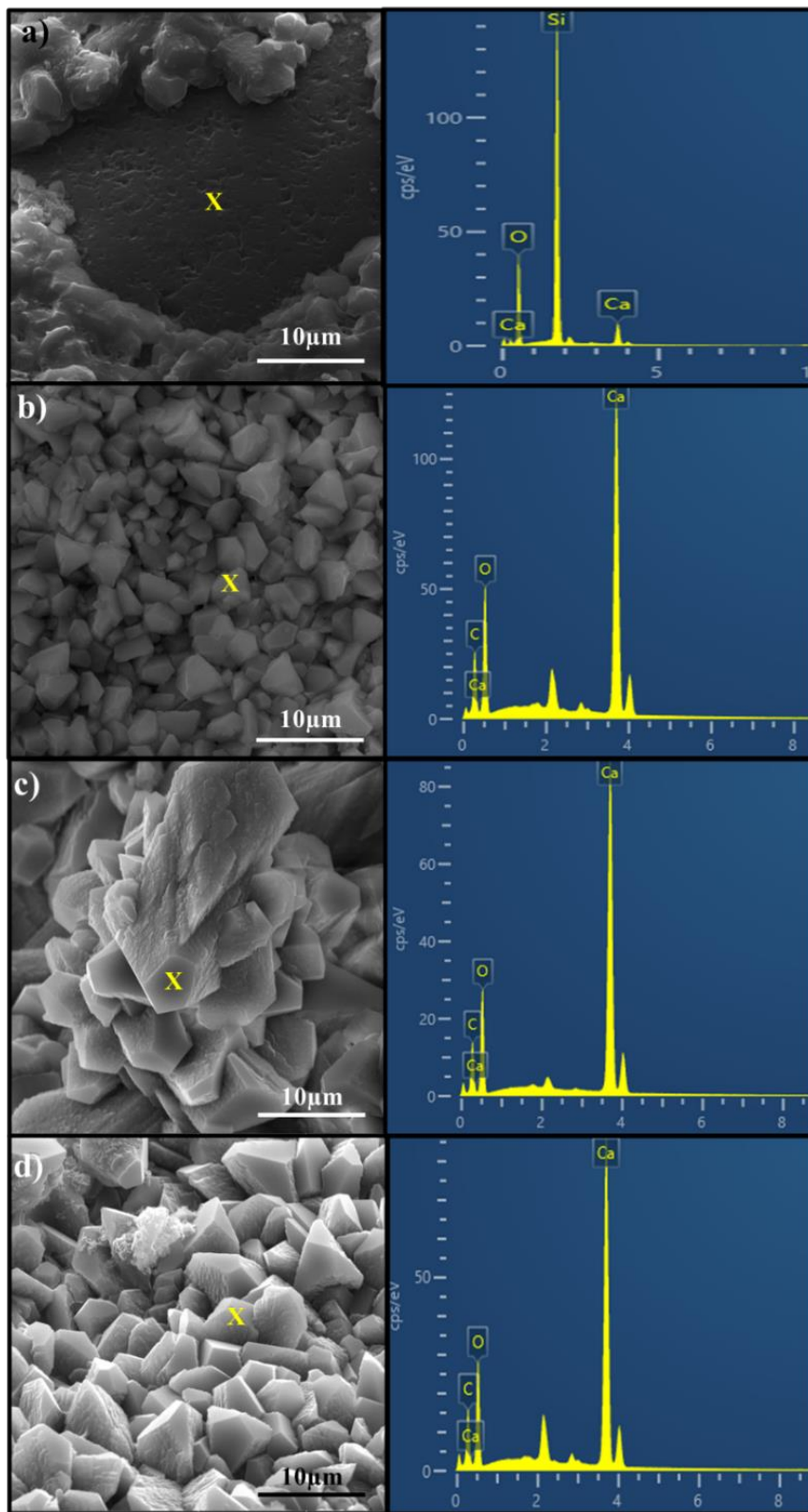
resultados obtidos das amostras expostas ao ar (R_Ar e E_Ar), imersas em água (R_Im_Água e E_Im_Água), imersas em água saturada com cal (R_Im_Cal e E_Im_Cal) e submetidas ao regime intermitente (R_Int e E_Int) aos 28 dias estão apresentadas nas Figuras 111 a 114, respectivamente.

Figura 111 – MEV e EDS das amostras R_Ar (a-b) e E_Ar (c-d) aos 28 dias com ampliação de 6.000x



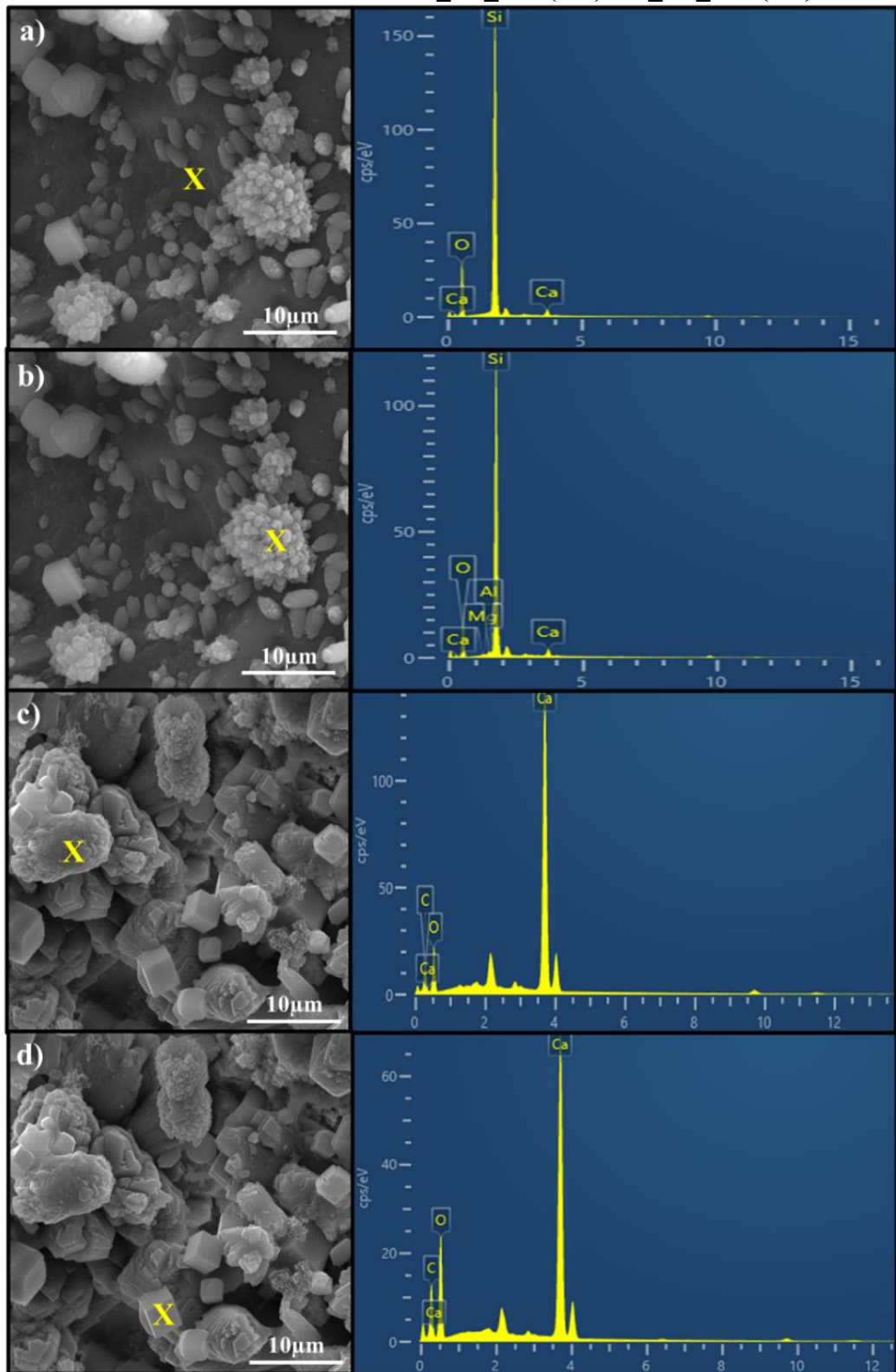
Fonte: Autora.

Figura 112 – MEV e EDS das amostras R_Im_Água (a-b) e E_Im_Água (c-d) aos 28 dias com ampliação de 6.000x



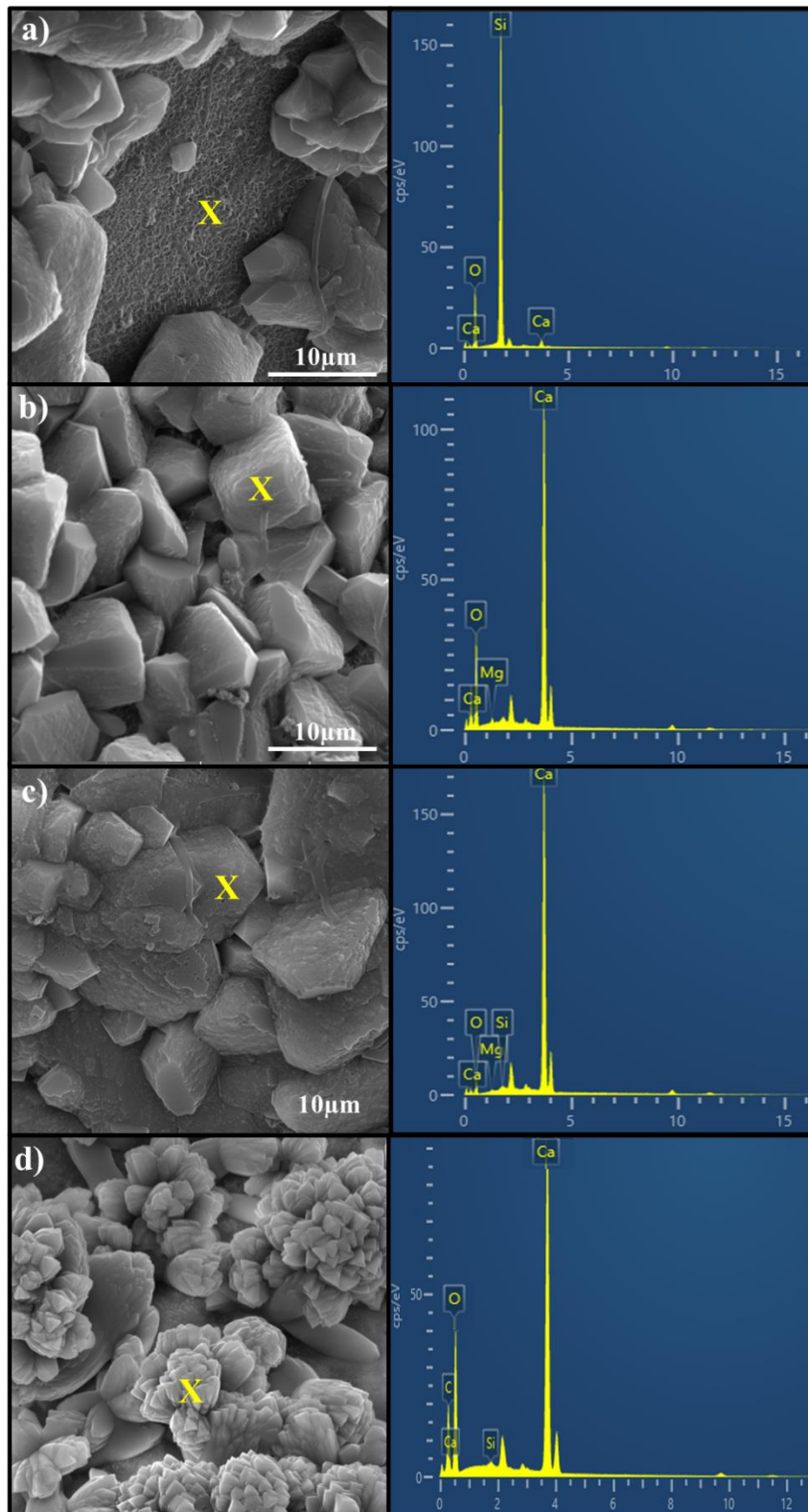
Fonte: Autora.

Figura 113 – MEV e EDS das amostras R_Im_Cal (a-b) e E_Im_Cal (c-d) aos 28 dias



Fonte: Autora.

Figura 114 – MEV e EDS das amostras R_Int (a-b) e E_Int (c-d) aos 28 dias



Fonte: Autora.

De maneira geral, avaliando as Figuras 111-114 observa-se que diferentes morfologias foram encontradas. Em se tratando das amostras de referência (R_Ar, R_Im_Água, R_Im_Cal e R_Int) observou-se que o material precipitado não cobria toda a amostra e por esse

motivo imagens e EDS's foram retirados de diferentes pontos de maneira a contribuir para o entendimento das características globais da amostra. Nos pontos mais limpos, (Figuras 111-114a) a presença de silício no EDS foi a que mais se destacou, provavelmente por se tratar de um grão de areia.

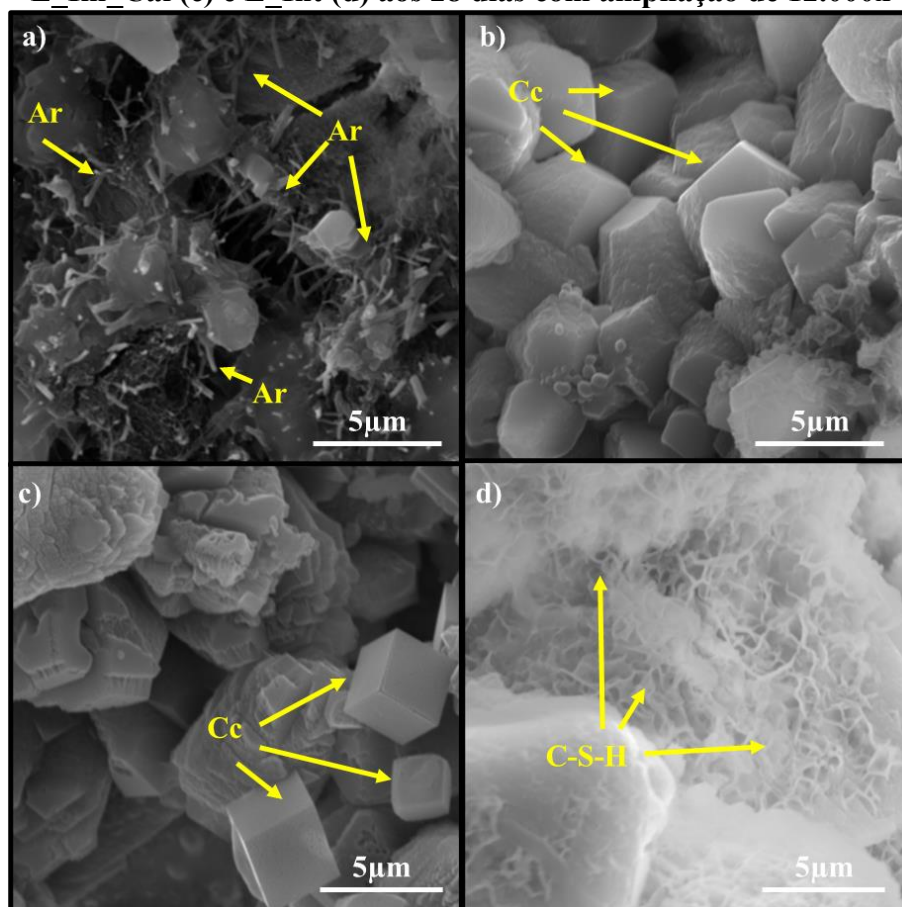
Nos locais onde havia a presença de cristais nas amostras de referência (Figuras 111-114b), picos de cálcio, carbono e oxigênio foram encontrados, indicando a presença de cristais de CaCO_3 . Essa precipitação provavelmente ocorreu a partir da carbonatação natural das argamassas frente a adição do lactato de cálcio no momento da mistura ou pela reação do CO_2 com o hidróxido de cálcio. De acordo com a literatura, o lactato de cálcio pode favorecer a autocicatrização mesmo sem a adição de bactérias. Entretanto essa autocicatrização é mais rápida e efetiva quando os microrganismos são adicionados (JONKERS *et al.*, 2010; STUCKRATH *et al.*, 2014).

Dando sequência à análise das imagens, quando os esporos bacterianos foram adicionados (Figuras 111-114 c-d), verificou-se uma maior homogeneidade no material precipitado nas amostras. Sendo que dificilmente encontravam-se espaços sem a formação de cristais, como foram encontrados nas amostras de referência. Nas amostras expostas ao ar, foram observadas morfologias típicas de calcita e aragonita, enquanto nas demais amostras a morfologia de calcita e dolomita se destacou. Analisando os EDS's observou-se picos de cálcio, magnésio, carbono e oxigênio, que corroboram com a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) e dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$).

Em se tratando das amostras imersas em cal (Figura 113) verificou-se a formação de cristais cúbicos com arestas perfeitas. De acordo com a literatura, estes são cristais de calcita (DE MUYNCK *et al.*, 2008-2010; SCHLANGEN e SANGADJY, 2013; PEI *et al.*, 2013). Vale destacar que diferentes fontes de cálcio e ambientes de exposição podem resultar em diferentes morfologias de cristais precipitados. Desta forma, observou-se que a cal juntamente com o lactato de cálcio, favoreceram esta formação cúbica aos 28 dias.

Na Figura 115 tem-se um resumo das morfologias encontradas, sendo que Cc indica a morfologia típica de calcita, Ar de aragonita e C-S-H de Silicato de Cálcio Hidratado.

Figura 115 - Morfologias encontradas nas amostras E_Ar (a), E_Im_Água (b), E_Im_Cal (c) e E_Int (d) aos 28 dias com ampliação de 12.000x

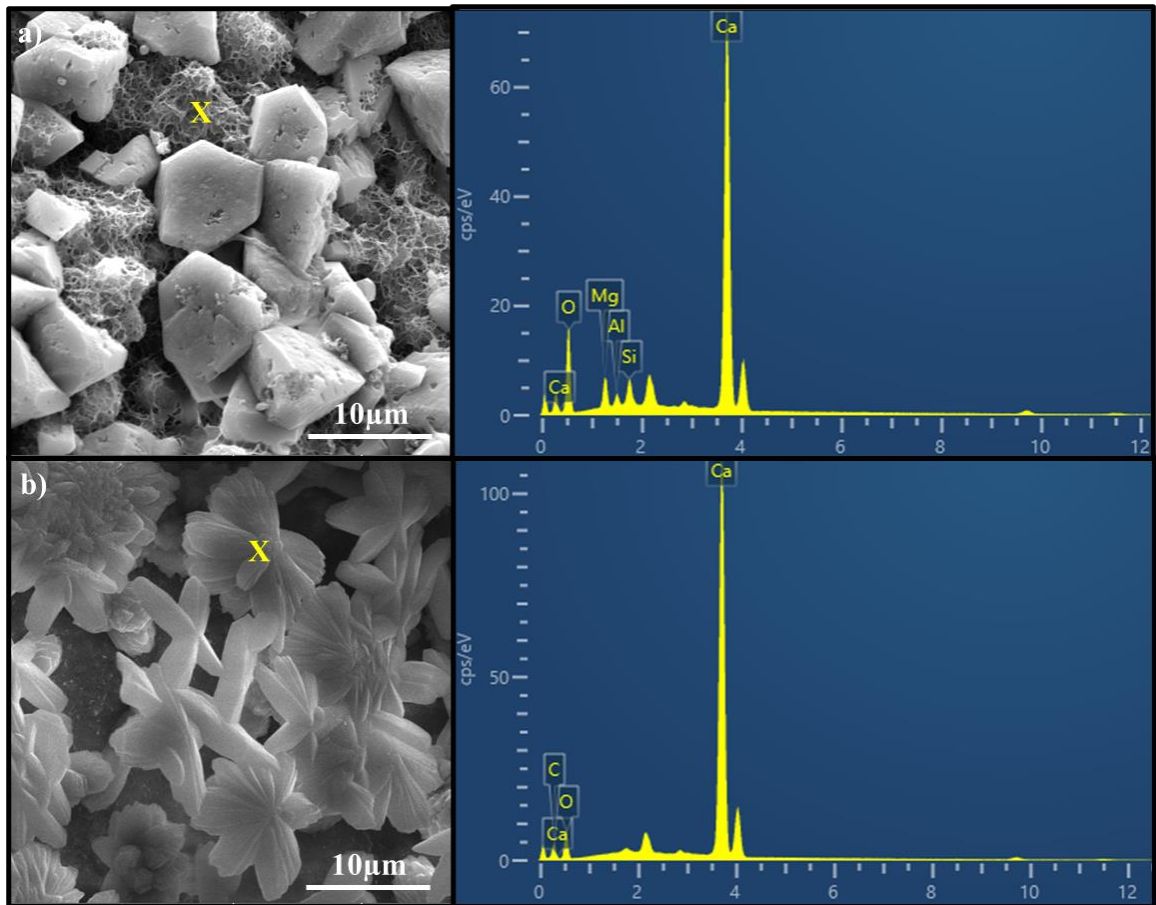


Fonte: Autora.

O C-S-H, aos 28 dias, foi encontrado apenas no regime intermitente (Figura 115d), tanto na argamassa de referência como na com adição dos esporos. Outra imagem destas estruturas está ilustrada na Figura 116a. A condição de exposição intermitente (12hrs seco/12hrs imerso) foi a única na qual se encontrou essa formação, mostrando que neste regime a bactéria terá mais locais de nucleação para a precipitação de CaCO_3 .

Além disso estruturas diferenciadas foram encontradas na argamassa em regime intermitente, em formatos de flor e com elevado pico de cálcio, conforme ilustra a Figura 116b. De acordo com a literatura, os cristais são de varita (DHAMI *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2017).

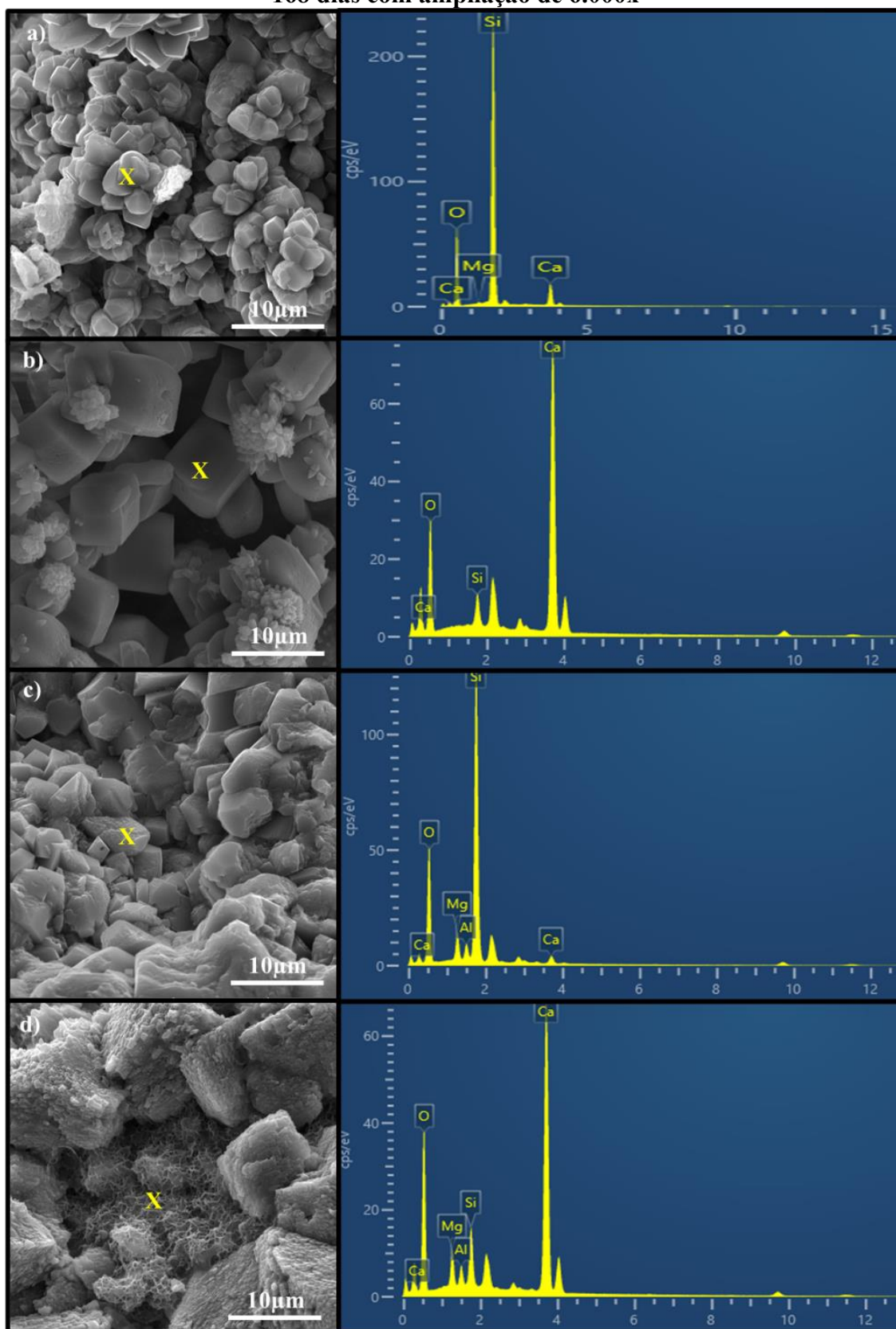
Figura 116 – MEV e EDS de regiões da amostra E_Int na ampliação de 6.000x aos 28 dias



Fonte: Autora.

Aos 168 dias apenas as argamassas expostas ao ar e submetidas ao regime intermitente foram analisadas em MEV e EDS, pois além destas análises, o material precipitado nas fissuras de todos os corpos de prova foi encaminhado para análise em MEV e EDS e havia uma limitação quanto ao tempo de uso do equipamento. A Figura 117 ilustra os resultados das argamassas expostas ao ar (a-b) e submetidas ao regime intermitente (c-d), juntamente com o EDS realizado no ponto demarcado por “X”.

Figura 117 – MEV e EDS das argamassas R_Ar (a), E_Ar (b), R_Int (c) e E_Int (d) aos 168 dias com ampliação de 6.000x



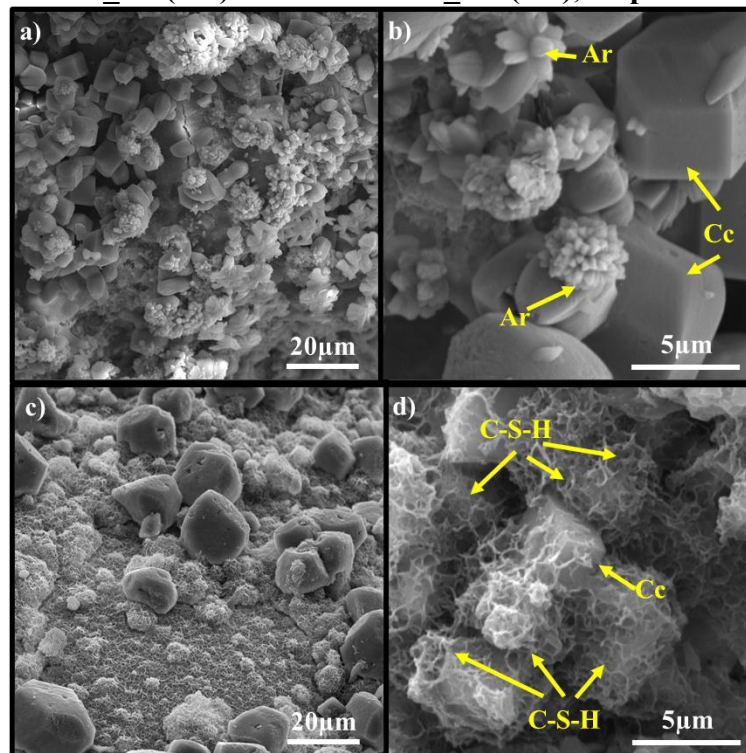
Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 117 observou-se na amostra de referência exposta ao ar (R_Ar - Figura 117a) a formação de estruturas irregulares com maior pico de silício, com picos menores de cálcio, oxigênio e magnésio, enquanto na argamassa com adição de esporos (E_Ar - Figura 117b) foram observados cristais cúbicos típicos de calcita, com elevados picos de cálcio no EDS.

O comportamento da amostra R_Int (Figura 117c) foi semelhante ao R_Ar, com estruturas irregulares e pico elevado de silício no EDS. Quando os esporos foram adicionados e submetidos ao regime intermitente, por sua vez, observou-se a formação de C-S-H, comportamento já verificado aos 28 dias e que se manteve até os 168 dias.

Para uma melhor visualização das características da amostra elaborou-se a Figura 118, com imagens de MEV das amostras E_Ar e E_Int nas ampliações de 2.000 e 12.000 vezes, com as setas apontando para as morfologias típicas de calcita (Cc), aragonita (Ar) e silicato de cálcio hidratado (C-S-H).

Figura 118 – Imagens de MEV aos 168 dias com ampliação de 2.000x e 12.000 da amostra E_Ar (a-b) e da amostra E_Int (c-d), respectivamente



Fonte: Autora.

É importante observar que as imagens com a ampliação de 2.000x (Figura 118 a e c) ilustram uma área maior do corpo de prova analisado, mostrando que ao ar os cristais não foram precipitados em toda a superfície da amostra e também evidenciando que no regime intermitente o C-S-H estava cobrindo toda a amostra (com exceção de alguns grãos de areia).

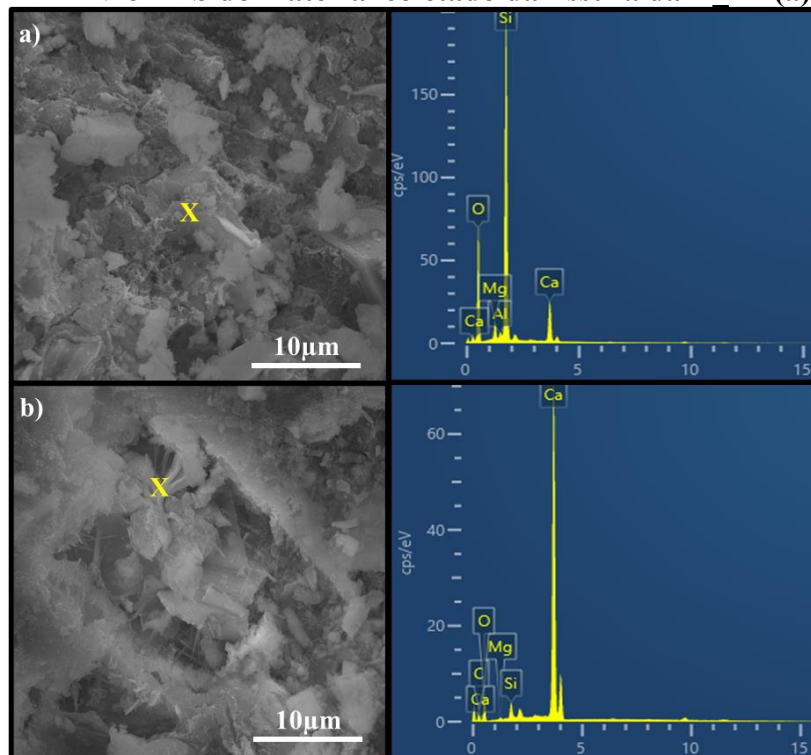
Além disso a partir da ampliação de 12.000x no regime intermitente (Figura 118d), observou-se que o C-S-H cobriu também um cristal de calcita.

De acordo com Mehta e Monteiro (2014) o C-S-H fornece a maioria da resistência e durabilidade aos compósitos cimentícios a longo prazo e que a sua morfologia pode variar de fibras pouco cristalinas a redes reticulares.

Vale ressaltar que aos 28 dias, na condição de exposição ao ar, não havia sido verificada a formação de cristais cúbicos. A calcita é a forma mais estável de CaCO_3 , logo, ao longo do tempo, os cristais de aragonita e varita tendem a se transformar em calcita.

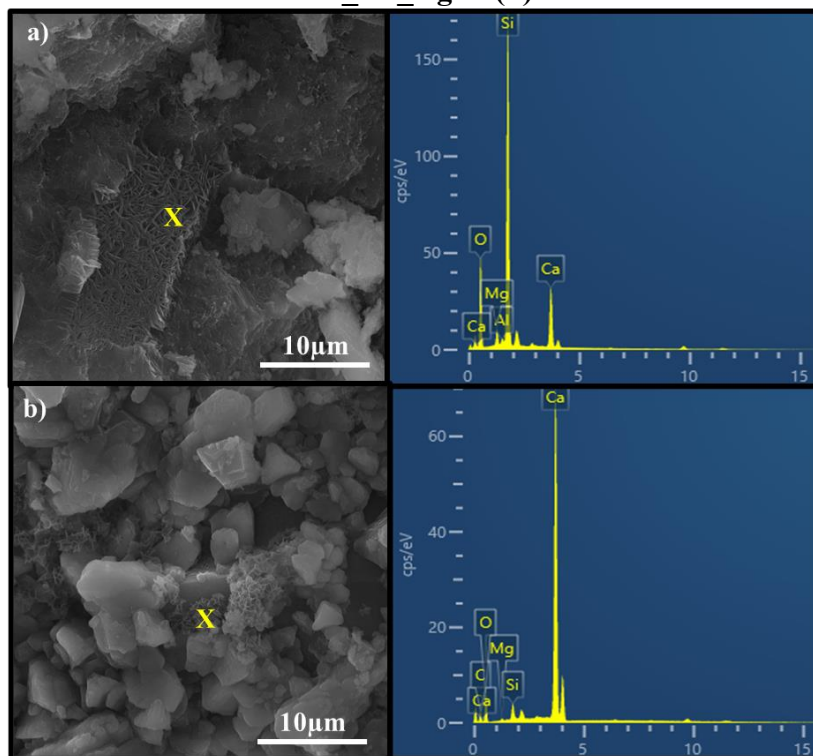
Após a análise das argamassas, o material retirado da fissura também foi avaliado em MEV e EDS. Os resultados obtidos das amostras expostas ao ar estão apresentados na Figura 119, seguidos pelos resultados obtidos do material retirado das fissuras das argamassas imersas em água (Figura 120), em cal (Figura 121), submetidas ao regime intermitente (Figura 122) e ao tratamento de superfície (Figura 123). Estas figuras foram obtidas com 6.000x de ampliação e o EDS foi realizado no ponto “X”.

Figura 119 – MEV e EDS do material coletado da fissura da R_Ar (a) e E_Ar (b)



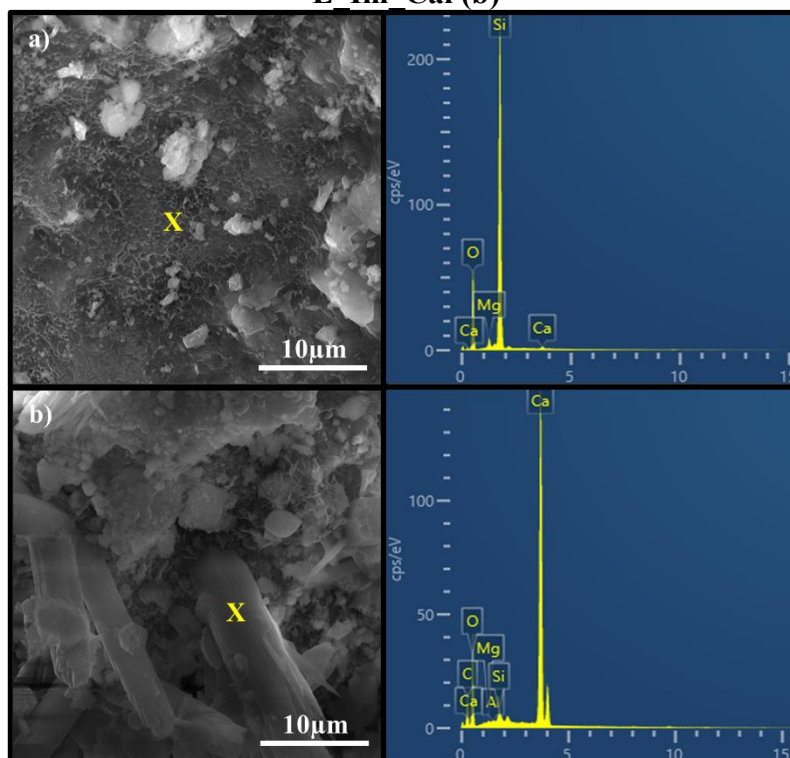
Fonte: Autora.

Figura 120 – MEV e EDS do material coletado da fissura da argamassa R_Im_Água (a) e E_Im_Água (b)



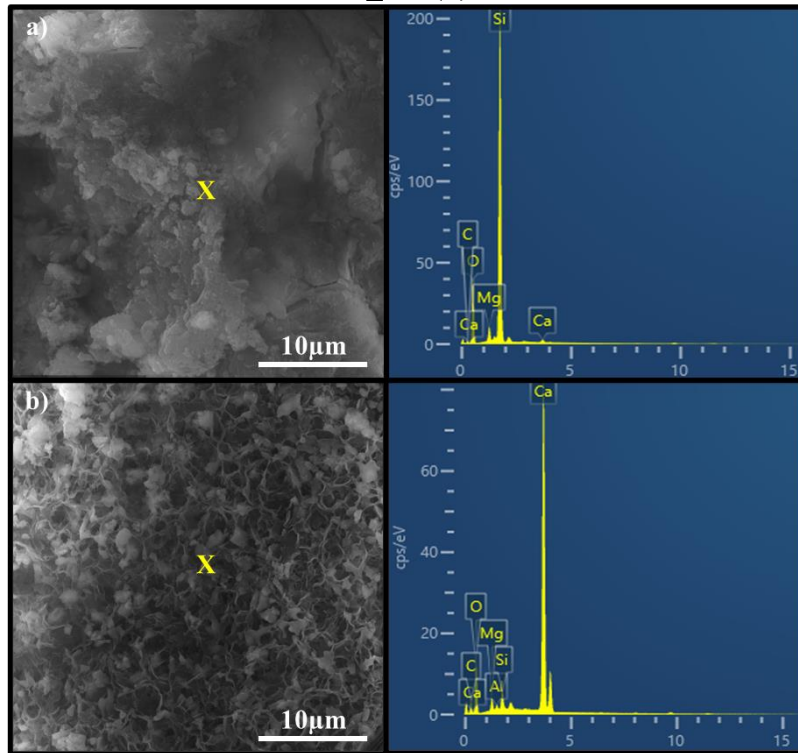
Fonte: Autora.

Figura 121 – MEV e EDS do material coletado da fissura da argamassa R_Im_Cal (a) e E Im Cal (b)



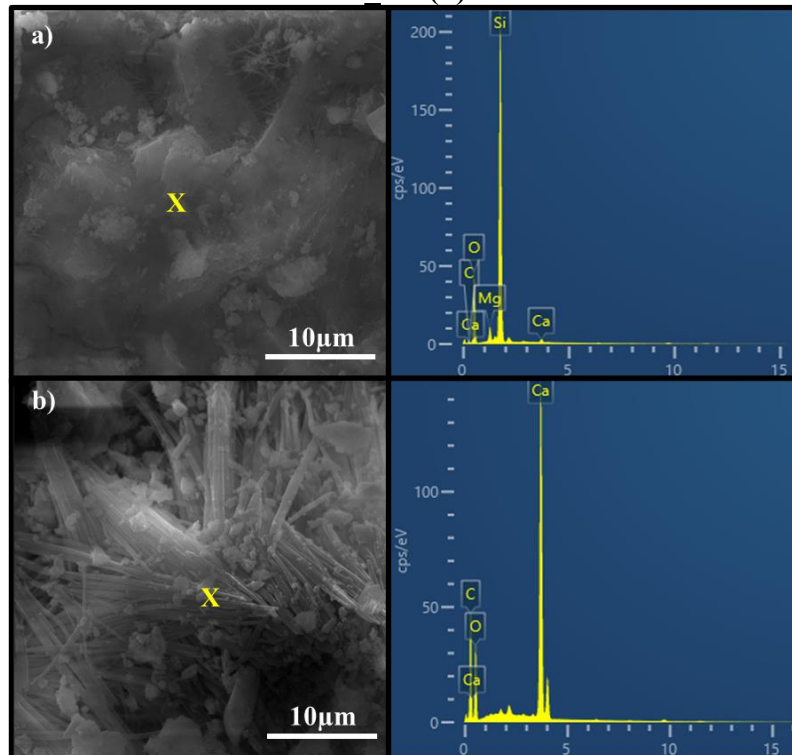
Fonte: Autora.

Figura 122 – MEV e EDS do material coletado da fissura da argamassa R_Int (a) e E_Int (b)



Fonte: Autora.

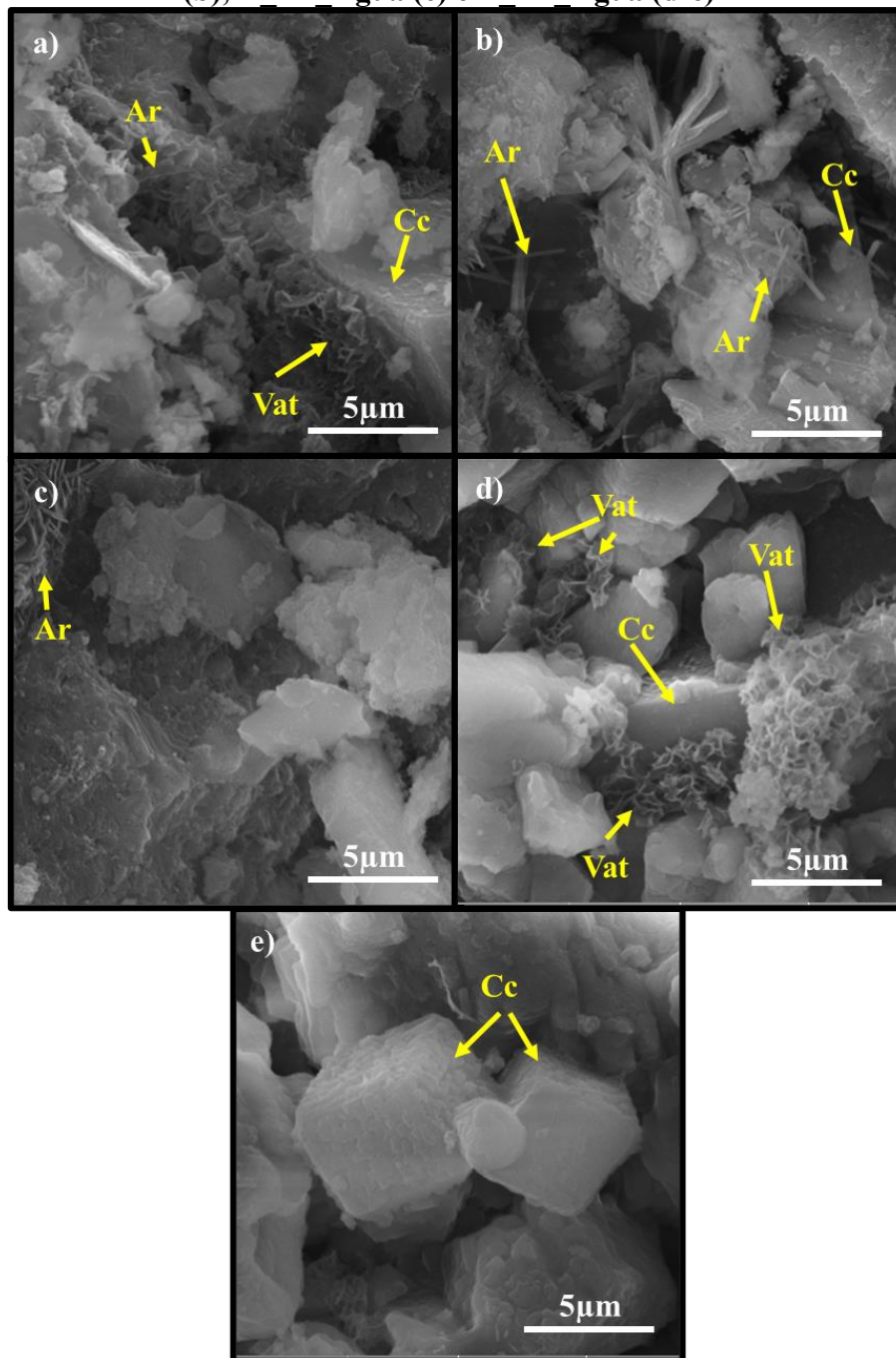
Figura 123 – MEV e EDS do material coletado da fissura da argamassa R_TS (a) e E_TS (b)



Fonte: Autora.

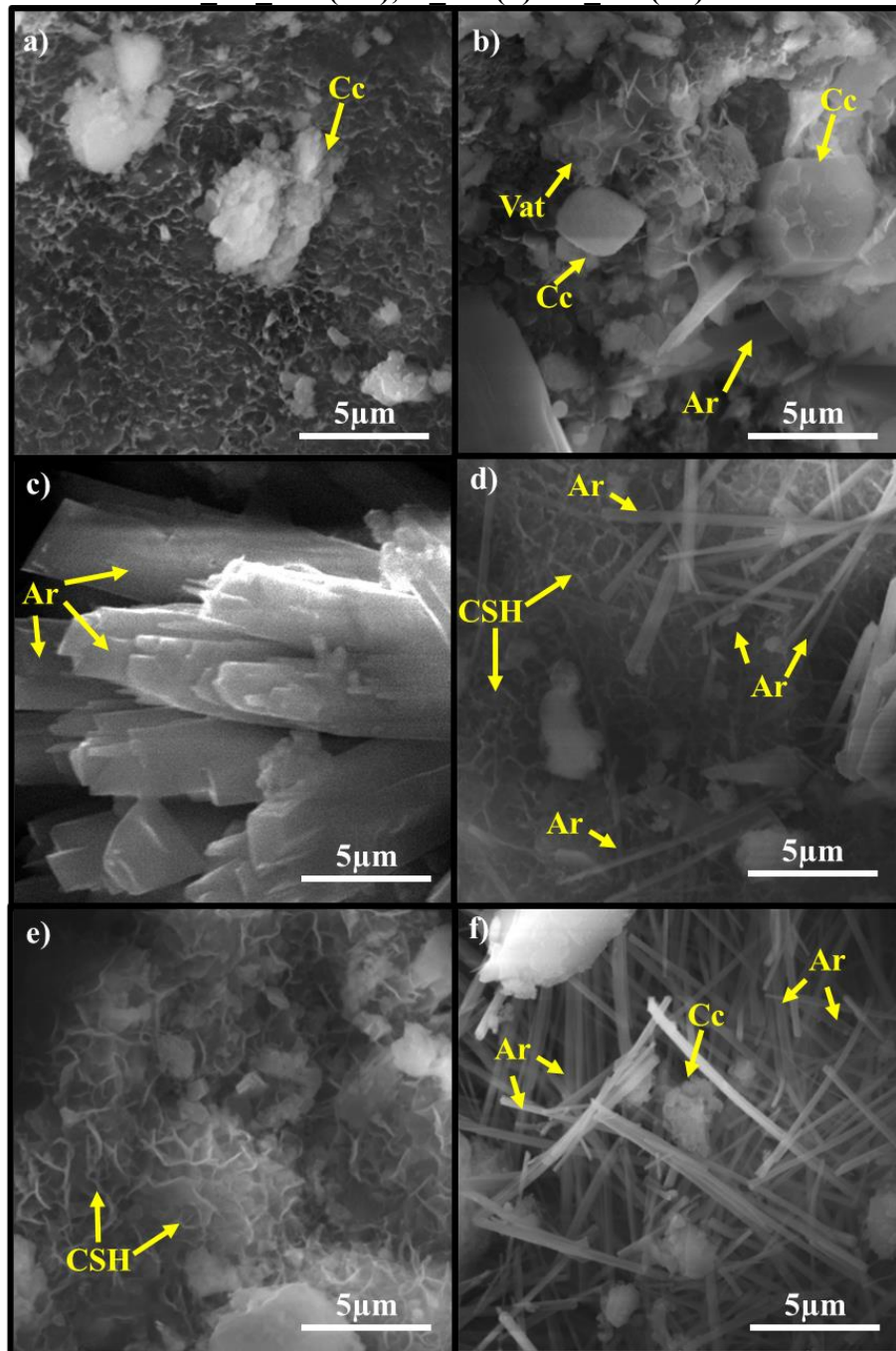
De maneira geral, os picos de cálcio dos difratogramas foram mais intensos quando os esporos estavam presentes na matriz cimentícia, em decorrência da bioprecipitação de CaCO_3 . Ressalta-se também que as taxas de autocicatrização também foram maiores nestas amostras. Para uma melhor visualização do material precipitado, as Figuras 124-126 ilustram as morfologias típicas de calcita (Cc), varita (Vat), aragonita (Ar) e C-S-H encontradas nas amostras.

Figura 124 – Imagens de MEV na ampliação de 12.000x das amostras R_Ar (a), E_Ar (b), R Im Água (c) e E Im Água (d-e)



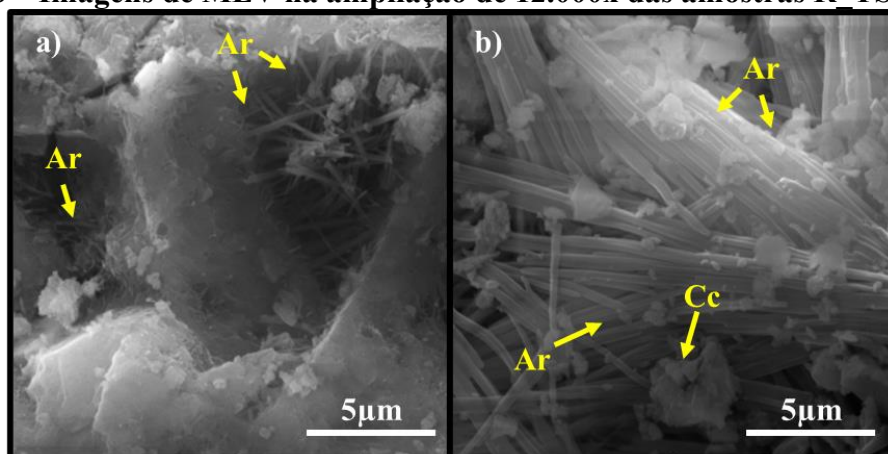
Fonte: Autora.

Figura 125 – Imagens de MEV na ampliação de 12.000x das amostras R_Im_Cal (a), E_Im_Cal (b-c), R_Int (d) e E_Int (e-f)



Fonte: Autora.

Figura 126 – Imagens de MEV na ampliação de 12.000x das amostras R_TS (a) e E_TS



Fonte: Autora.

É interessante observar que os cristais de aragonita (Ar) foram encontrados com maior frequência nas amostras retiradas da fissura do que nas amostras de argamassa estudadas. Tal fato é interessante, pois os cristais de aragonita podem atuar na autocicatrização das fissuras costurando-as, o que promove uma autocicatrização mais efetiva do que a deposição de cristais cúbicos nestes locais.

É importante destacar ainda, que mesmo que evidenciado em menor quantidade, era esperado que houvesse cristais de CaCO_3 nas amostras de referência, pois a carbonatação natural tende a acontecer na superfície da fissura, a qual pode resultar na autocicatrização de fissuras de pequena espessura.

Além da análise em MEV e EDS do material retirado da fissura, essas amostras também foram encaminhadas para os ensaios de Fluorescência de Raio X (FRX), Difração de Raio X (DRX) e Termogravimetria (TG), seus resultados estão apresentados na sequência.

4.3.2.4 *Fluorescência de Raio X (FRX)*

Os resultados do ensaio de FRX obtidos no ensaio realizado no Laboratório LARX-UDEL, podem ser observados na Tabela 17. Vale lembrar que as amostras encaminhadas para este ensaio foram retiradas das fissuras, após 168 dias submetidas as diferentes condições de exposição.

Tabela 17 – Elementos químicos encontrados nas amostras

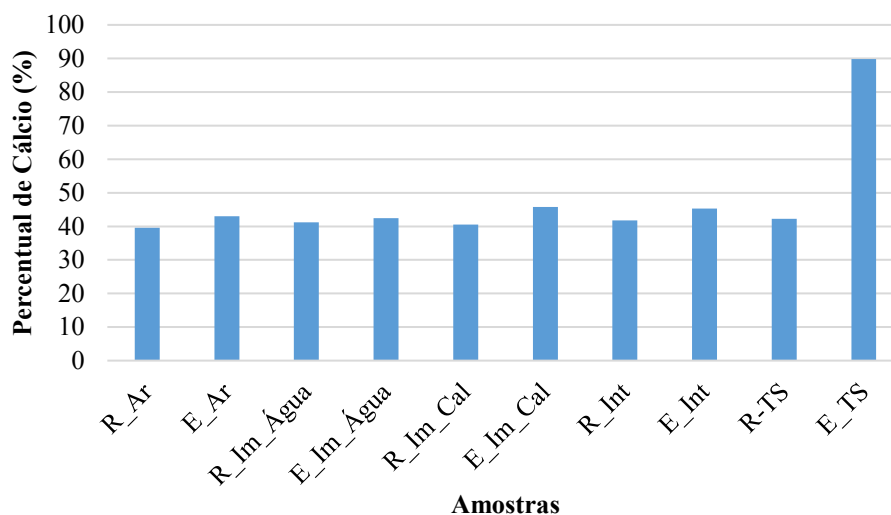
Elemento químico	Quantidade na amostra (%)									
	R_Ar	E_Ar	R_Im_Água	E_Im_Água	R_Im_Cal	E_Im_Cal	R_Int	E_Int	R_TS	E_TS
Silício (Si)	52,68	50,17	52,54	50,14	53,37	47,69	51,64	48,67	50,30	6,50
Cálcio (Ca)	39,56	43,02	41,24	42,44	40,48	45,81	41,74	45,29	42,21	89,81
Ferro (Fe)	3,82	3,33	3,15	3,84	2,86	3,33	3,41	3,25	3,46	1,27
Enxofre (S)	0,56	0,80	1,35	1,36	1,16	1,24	1,29	0,96	2,30	0,53
Potássio (K)	2,00	2,00	0,96	1,31	1,14	0,92	0,94	0,86	0,89	1,57
outros < 0,5%	1,06	0,75	0,76	0,90	0,99	1,00	0,97	0,96	0,83	0,08

Fonte: Autora.

Como o material foi raspado da fissura, seguindo o procedimento recomendado por Stuckrath *et al.* (2014), grãos de areia se desprenderam e foram quantificados no ensaio, assim o silício (Si) foi o elemento químico mais encontrado em todas as amostras com exceção da E_TS. Esse resultado é interessante porque mostra que o tratamento de superfície (E_TS), por ter o lactato de cálcio de fácil acesso aos esporos na fissura, foi capaz de precipitar mais carbonato de cálcio.

Para facilitar a comparação entre as amostras, no que tange à quantidade de cálcio (Ca), o gráfico (Figura 127) foi elaborado.

Figura 127 – Percentual de cálcio presente nas amostras



Fonte: Autora.

A partir da análise da Figura 127 observa-se que, quando os esporos bacterianos foram adicionados, houve um aumento na quantidade de cálcio presente nas amostras. Entretanto esse aumento foi de pequena magnitude (entre 1 e 5%) nas amostras expostas ao ar, imersas em água, imersas em cal e em regime intermitente. A maior quantidade de cálcio encontrada foi na amostra E_TS, na qual o lactato de cálcio foi adicionado no tratamento de superfície, juntamente com os esporos. Acredita-se que a maior quantidade de

cálcio está associada à facilidade de a bactéria encontrar a fonte de cálcio na superfície da fissura. Vale destacar que o objetivo principal do ensaio de FRX foi facilitar a identificação dos picos de DRX, sendo que os resultados destes estão apresentados na sequência.

4.3.2.5 Difração de Raio X (DRX)

Assim como para a Fluorescência de Raio X, o ensaio de Difração de Raio X também foi realizado para nas amostras extraídas das fissuras, aos 168 dias, de forma a possibilitar a análise do CaCO_3 precipitado e corroborar com o encontrado em MEV, EDS e FRX. Este ensaio foi realizado no laboratório LARX-UEL utilizando o equipamento X'Pert PRO MPD. Os resultados obtidos com relação aos percentuais dos compostos encontrados estão apresentados na Tabela 18.

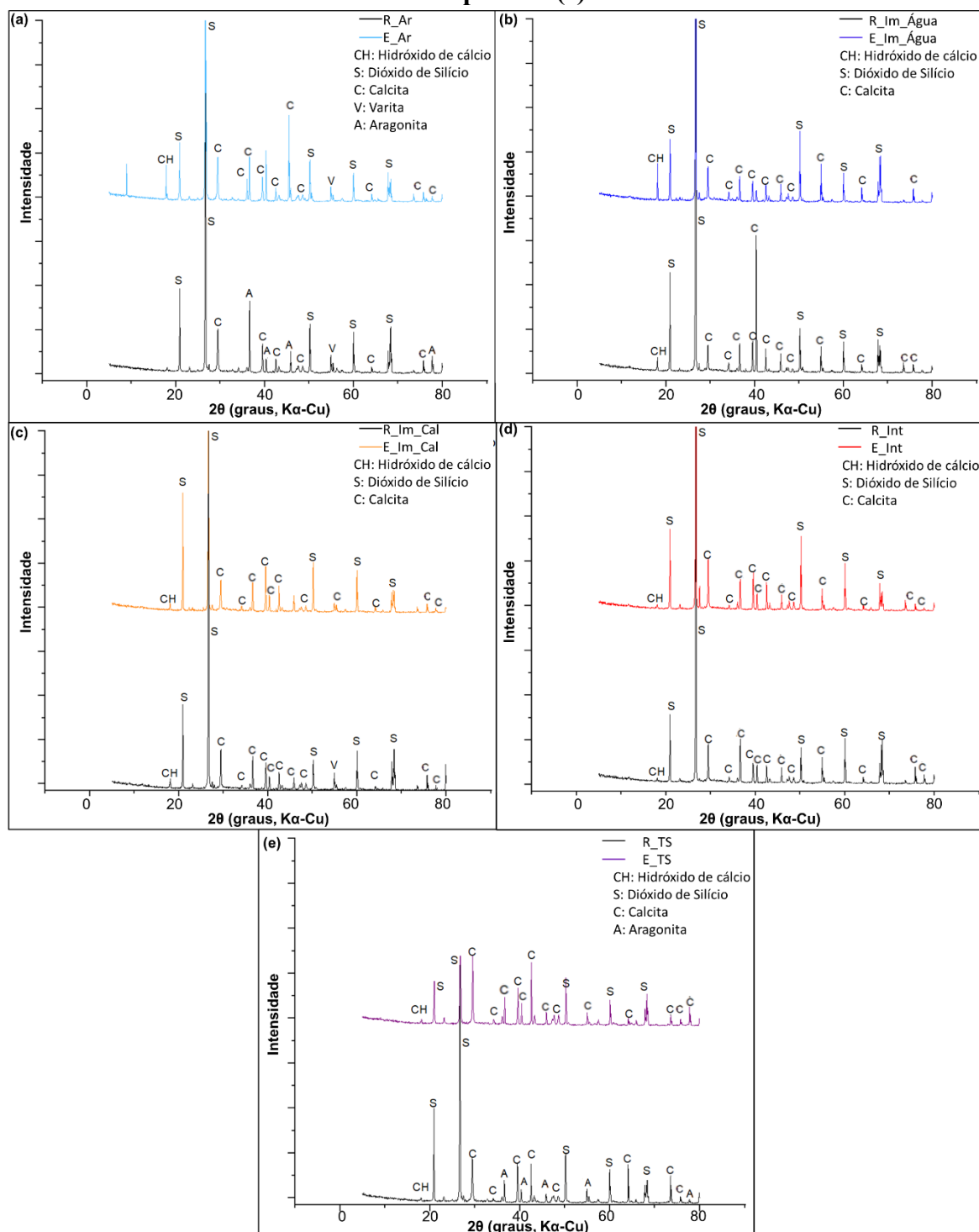
Tabela 18 – Quantidade dos compostos encontrados nas amostras

Composto	Quantidade na amostra (%)													
	R Ar	E Ar	R Im	Água	E Im	Água	R Im	Cal	E Im	Cal	R Int	E Int	R TS	E TS
SiO₂	74,0%	71,0%	82,0%		82,0%		84,0%		82,0%		85,0%	75,0%	71,0%	46,0%
Ca(CO₃) romboédrico (Calcita)	20,7%	20,0%	12,8%		15,2%		14,5%		15,2%		13,6%	23,0%	20,9%	54,0%
Ca(OH)₂	1,8%	1,0%	4,3%		2,4%		1,9%		2,4%		1,7%	1,7%	2,1%	-
Ca(CO₃) ortorrômbica (Aragonita)	3,3%	-	-		-		-		-		-	-	5,6%	-
Ca(CO₃) hexagonal (Vaterita)	-	8,0%	-		-		-		-		-	-	-	-

Fonte: Autora.

Na sequência estão apresentados os difratogramas obtidos (Figura 128), juntamente com a identificação dos picos de dióxido de silício (Si), hidróxido de cálcio (CH) e carbonato de cálcio na forma de calcita (C), varita (V) e aragonita (A) (RYU *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2016; WO, CHIANG e ZHOW, 2017).

Figura 128 – Difratogramas obtidos das amostras expostas ao ar (a), imersas em água (b), imersas em cal (c), expostas ao regime intermitente (d) e submetidas ao tratamento de superfície (e)



Fonte: Autora.

Os resultados obtidos a partir do ensaio de DRX corroboram com o MEV e FRX, onde encontrou-se areia (SiO₂), carbonato de cálcio (CaCO₃) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂). Ao analisar as quantidades dos compostos de CaCO₃ e Ca(OH)₂ conclui-se que:

- a quantidade total de CaCO_3 precipitado nas amostras com adição de esporos bacterianos expostas ao ar, imersas em água e imersas em cal foi próxima às suas respectivas referências, tal fato pode ser justificado pela carbonatação natural;
- o tratamento de superfície (E_TS) foi o que apresentou maior quantidade de CaCO_3 (54%) e a maior diferença (quando comparado a referência R_TS (27,5%);
- o tratamento bacteriano submetido ao regime intermitente (E_Int) apresentou o segundo maior percentual de CaCO_3 (23%) e a segunda maior diferença com relação à referência R_Int, de 11,1%;
- na amostra E_TS não houve hidróxido de cálcio na área da fissura, apontando também uma maior atuação bacteriana na conversão deste em CaCO_3 . Vale ressaltar que a referência R_TS (sem tratamento e sem lactato de cálcio na matriz cimentícia) apresentou um percentual de 2,1% deste composto.

Além disso a análise identificou carbonato de cálcio (CaCO_3) na forma de calcita (C), aragonita (A) varita (V). A calcita é a forma mais estável de CaCO_3 ; vários pesquisadores apontam que a autocicatrização ocorre devido à capacidade da bactéria de precipitar calcita (DE MUYNCK *et al.*, 2008; CHUNXIANG *et al.*, 2009; DHAMI *et al.*, 2012; KRISHNAPRIYA *et al.*, 2015; LUO, QIAN e LI, 2015; QIAN *et al.*, 2015; KALHORI e BAGHERPOUR, 2017; CHOI *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; SU *et al.*, 2020). Varita e a aragonita também foi identificada por vários pesquisadores no processo de autocicatrização (DE MUYNCK *et al.*, 2008; CHUNXIANG *et al.*, 2009; DHAMI *et al.*, 2012).

Porém na carbonatação natural, o CO_2 ambiental dissolvido na água dos poros acessa os materiais à base de cimento e, por meio de uma série de reações, o Ca(OH)_2 é convertido em CaCO_3 (JOSHI, GOYAL e REDDY, 2018). Por isso, nas argamassas de referência, o carbonato de cálcio também está presente. Alguns pesquisadores encontraram CaCO_3 devido à carbonatação natural em argamassas de referência por análise de DRX (JOSHI, GOYAL e REDDY, 2018). Vale destacar que o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) também foi encontrado em amostras argamassas em pequena quantidade (RAMACHANDRAN *et al.*, 2001; DHAMI *et al.*, 2012).

É válido ressaltar que, nas análises em estereoscópio, as fissuras das argamassas de referência não foram fechadas. Desta forma, verifica-se que os cristais precipitados pela carbonatação natural não foram capazes de autocicatrizarem as fissuras. A

literatura aponta que a largura máxima de fissura que pode sofrer cura autógena é estimada entre 0,1 e 0,3 mm, dependendo das condições de exposição (WIKTOR e JONKERS, 2011; QIAN *et al.*, 2010).

Além dos ensaios de FRX e DRX, o material retirado da fissura também foi encaminhado para análise de termogravimetria.

4.3.2.6 Termogravimetria (TG)

O ensaio de termogravimetria foi realizado nas amostras retiradas das fissuras, após 168 dias de cura. Para o ensaio, aproximadamente 10mg de amostra foram utilizados, os quais foram aquecidos da temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) até 900°C sob taxa de aquecimento de 20°C/min.

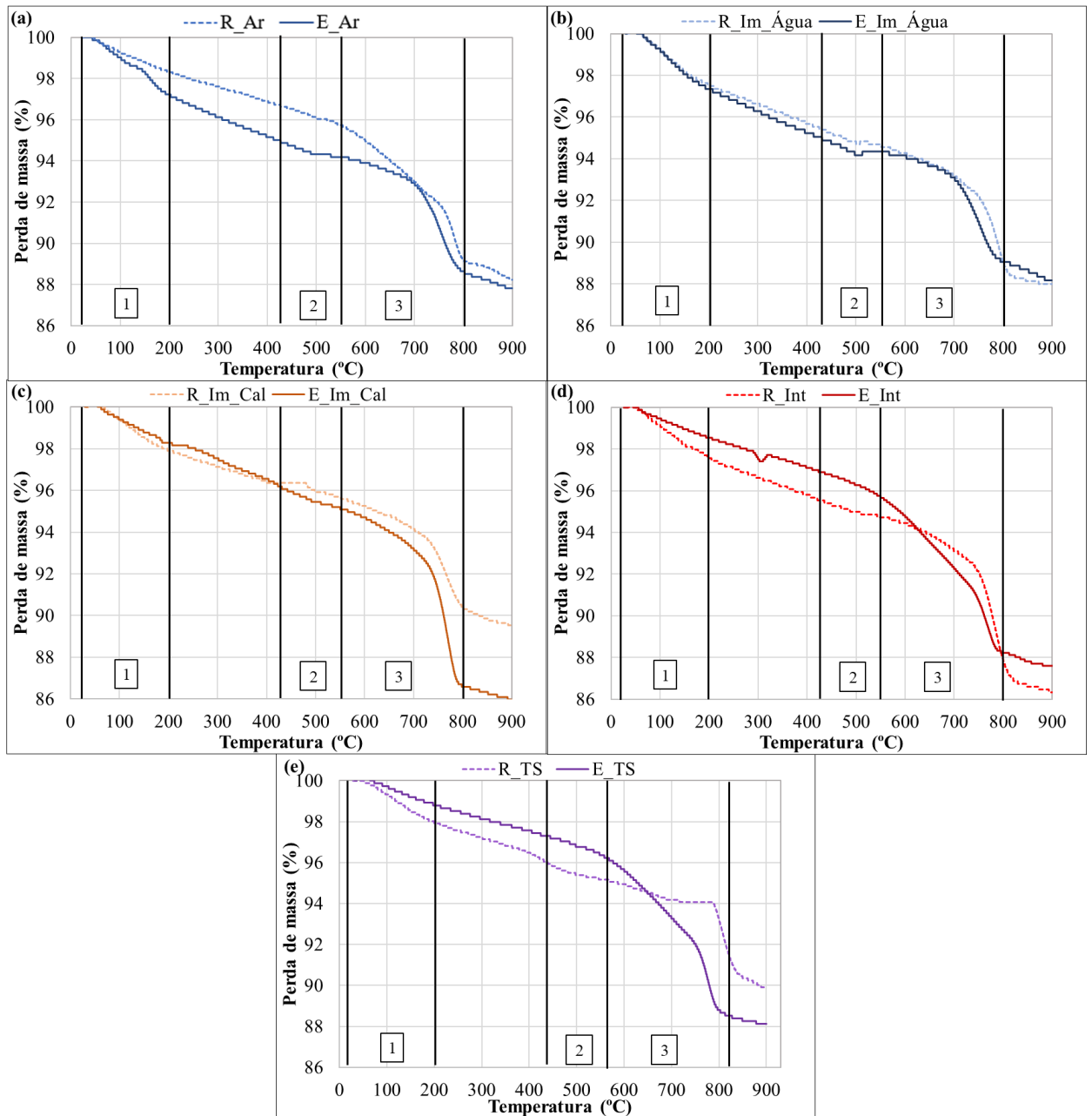
Para a análise de materiais cimentícios com adição de bactéria, a termogravimetria é utilizada para verificar a presença de carbonato de cálcio. Quando os cristais de CaCO₃ estão presentes no material de reparação, que se decompõe em CaO e CO₂ em temperaturas entre 550 e 800°C, de acordo com a Equação 18 (VAN TITTELBOOM *et al.*, 2010).



Os resultados obtidos quanto à perda de massa e derivada da perda de massa podem ser visualizados nas Figuras 129 e 130. As imagens foram separadas por faixas de temperatura, da seguinte forma:

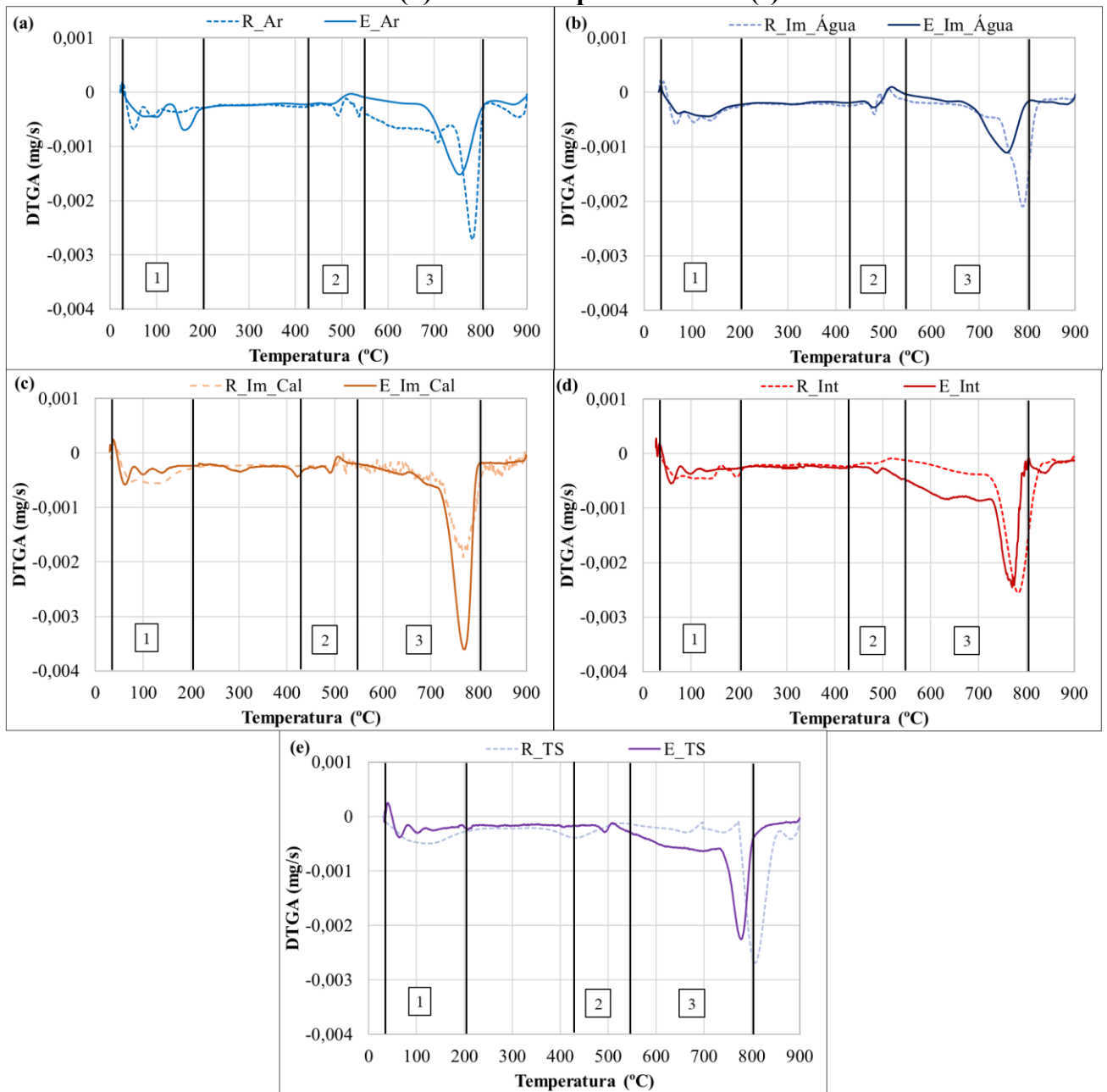
- faixa 1: Temperatura de 30 a 200°C. Esta faixa temperatura, de acordo com a literatura é referente à perda de massa oriunda da evaporação da água e da decomposição de produtos de hidratação, como etringita e C-S-H (TAYLOR, 1990).
- faixa 2: Temperatura de 425 a 550°C. Esta faixa temperatura, de acordo com Taylor (1990), está relacionada à perda de massa decorrente da decomposição do hidróxido de cálcio presente na matriz cimentícia.
- faixa 3: Temperatura de 550 a 800°C. A faixa de temperatura citada está relacionada à perda de massa em decorrência da decomposição do carbonato de cálcio (CaCO₃) (TAYLOR, 1990; ONIYAMA e WAHLBECK, 1995; VAN TITTELBOOM *et al.*, 2010; STUCKRATH *et al.*, 2014; JOSHI *et al.*, 2018).

Figura 129 – Perda de massa obtida pelo ensaio de termogravimetria das amostras expostas ao ar (a), imersas em água (b), imersas em cal (c), em regime intermitente (d) e tratada superficialmente (e)



Fonte: Autora.

Figura 130 – Derivada da perda de massa obtida pelo ensaio de termogravimetria das amostras expostas ao ar (a), imersas em água (b), imersas em cal (c), em regime intermitente (d) e tratada superficialmente (e)



Fonte: Autora.

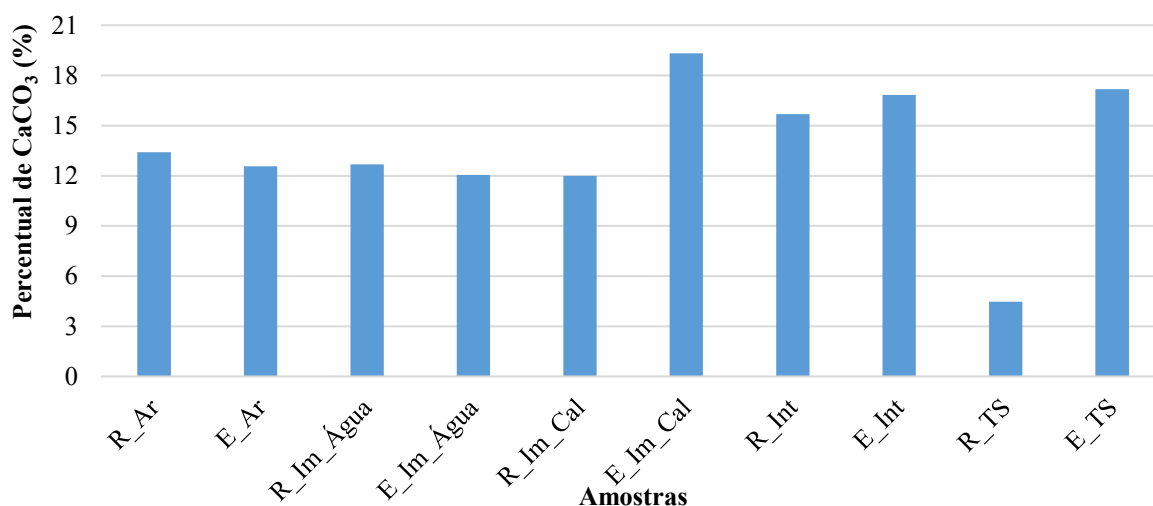
Além da análise gráfica, o percentual de perda de massa foi tabelado para as faixas mais importantes para a pesquisa. Estes resultados estão apresentados na Tabela 19 e graficados na Figura 131. Vale ressaltar que o CaCO_3 precipitado foi calculado por estequiometria, considerando que a perda de massa quantificada na faixa de temperatura entre 550°C e 800°C está relacionada à liberação de CO_2 e aplicando a Eq.18.

Tabela 19 – Resultados de perda de massa nos intervalos de 425-550°C, 550-800°C e percentual de CaCO₃ precipitado

AMOSTRA	Perda de massa (%) (425-550°C)	Perda de massa (%) (550-800°C)	CaCO ₃ precipitado (%)
R_Ar	1,00	5,90	13,41
E_Ar	0,84	5,53	12,57
R_Im_Água	0,84	5,58	12,68
E_Im_Água	0,71	5,30	12,05
R_Im_Cal	0,66	5,28	12,00
E_Im_Cal	1,11	8,50	19,32
R_Int	0,81	6,90	15,68
E_Int	1,24	7,41	16,84
R_TS	0,98	1,97	4,48
E_TS	0,94	7,56	17,18

Fonte: Autora.

Figura 131 – Percentual de CaCO₃ presente nas amostras analisadas



Fonte: Autora.

A partir da análise dos resultados, verificou-se que em todas as amostras houve uma perda de massa na faixa 1 menor que 3%, em decorrência principalmente da evaporação de água, mas que também pode ter ocorrido pela decomposição de etringita e C-S-H (TAYLOR, 1990).

Na faixa 2, de 425 a 550°C, a perda de massa foi menor do que 2%. Nesta temperatura ocorre a decomposição do hidróxido de cálcio. Uma pequena perda de massa era esperada, pois as amostras possuíam idades avançadas e foram retiradas de fissuras. Nesta situação, o hidróxido de cálcio disponível pode ser utilizado na carbonatação natural (BELIE *et al.*, 2019; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021) ou ainda pela própria bactéria na precipitação de CaCO₃ (VAN TITTELBOOM *et al.*, 2010).

Na faixa 3, com temperatura variando entre 550 e 800°C, ocorre a decomposição do CaCO₃, foco da análise em questão. As amostras expostas ao ar (R_Ar e

E_Ar) e imersas em água (R_Im_Água e E_Im_Água) tiveram aproximadamente 12% de CaCO₃ formado, não apresentando muitas diferenças frente ao tratamento bacteriano, quando comparado à referência sem bactérias.

Em contrapartida, nas argamassas imersas em cal verificou-se uma diferença de 7,32% comparando à R_Im_Cal com a E_Im_Cal. Uma diferença ainda maior foi encontrada no tratamento de superfície, onde o tratamento bacteriano foi capaz de formar 17,18% de CaCO₃ em comparação a 4,48% na argamassa de referência.

Um fato que é importante de ser ressaltado é que a argamassa R_TS não possuía lactato de cálcio na sua composição e nesta argamassa a formação de CaCO₃ foi inferior a todas as demais (em torno de 4,48%), corroborando assim com o apresentado na literatura, que o lactato de cálcio, assim como o hidróxido de cálcio, pode ser consumido na formação de CaCO₃ a partir da carbonatação natural (JONKERS *et al.*, 2010; STUCKRATH *et al.*, 2014).

Com relação ao regime intermitente, verificou-se que a formação de CaCO₃ foi maior na referência (R_Int - 15,68%) quando comparada às demais argamassas de referência (R_Ar, R_Im_Água, R_Im_Cal e R_TS). Tal fato é corroborado pela condição intermitente favorecer a carbonatação natural, fazendo com que a formação de CaCO₃ ocorra a partir do consumo de hidróxido de cálcio e lactato de cálcio (TZIVILOGLOU *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2020). Entretanto uma diferença de menor magnitude foi verificada entre a R_Int e a E_Int, sendo de aproximadamente 1,16%.

De maneira global, é importante destacar que como as amostras foram retiradas de fissuras e ficaram em diferentes condições de exposição durante um período de quase 6 meses, era esperado que houvesse carbonato de cálcio nas fissuras, mesmo quando as bactérias não foram adicionadas. Tal fato era esperado pois, conforme já apontado anteriormente, a carbonatação natural acontece em pequenas fissuras (EDVARSEN, 1999; VAN TITTELBOOM e DE BELIE, 2013, DE BELIE *et al.*, 2019; JUSTO-REINOSO *et al.*, 2021).

Abo-El-Enein *et al.* (2012) estudaram os resultados da termogravimetria de uma argamassa de traço 1:3 com adição de *S. pasteurii* (antigamente conhecido como *B. pasteurii*) na água de amassamento com adição de cloreto de cálcio, acetato de cálcio e nitrato de cálcio. Os autores observaram que quando as células bacterianas foram adicionadas com cloreto de cálcio houve uma perda de massa de 12,6%, com acetato de cálcio de 10,4% e com nitrato de cálcio 6,7%, atribuindo maiores quantidades de CaCO₃ quando as bactérias foram adicionadas com cloreto de cálcio.

Entretanto de acordo com Schreiberová e colaboradores (2019) cuidados maiores devem ser tomados na adição de cloreto de cálcio, pois esta adição pode resultar na corrosão da armadura em elementos de concreto armado.

Frente às análises realizadas das fissuras e do material retirado delas, observa-se que as condições de exposição em contato com água obtiveram uma maior autocatrização e conseqüentemente uma maior precipitação de CaCO_3 , principalmente na condição imersa em cal e no regime intermitente, quando os esporos bacterianos foram adicionados. Entretanto observou-se que o tratamento de superfície foi superior a estes, apontando que este pode ser uma solução a ser adotada para fissuras em edificações existentes.

Além da análise das fissuras, na Etapa 2 ensaios de absorção de água, índice de vazios e PIM foram conduzidos. Os resultados obtidos estão apresentados na sequência.

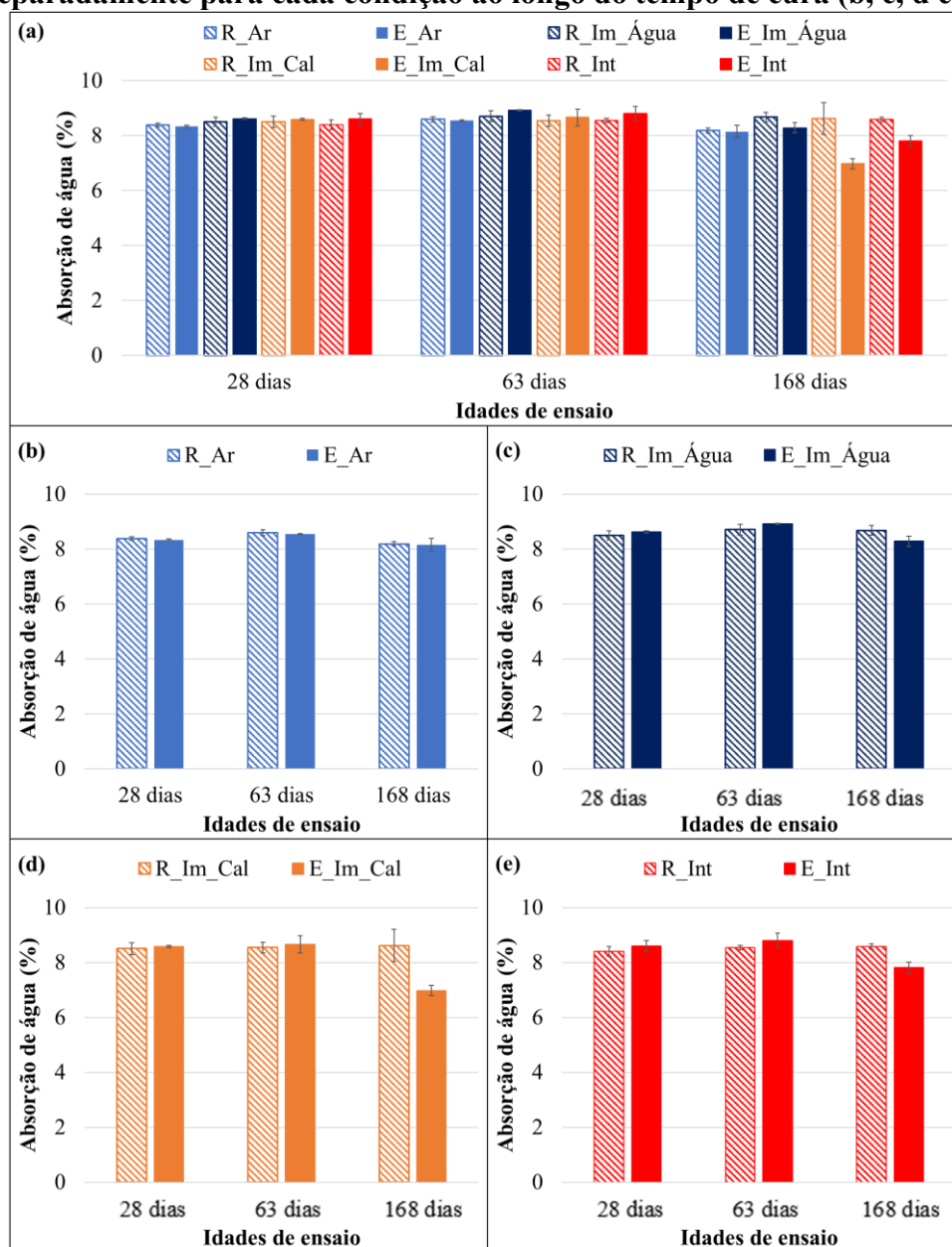
4.3.3 Etapa 2

4.3.3.1 *Absorção de água e Índice de vazios*

Os ensaios de absorção de água e índice de vazios foram conduzidos nas idades de 28, 63 e 168 dias. A Figura 132 ilustra os resultados obtidos para todas as condições de exposição (a) e separados por condição de exposição (b-e) para facilitar a comparação do tratamento bacteriano com a sua respectiva referência.

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que basicamente não houve variação da absorção de água nas idades de 28 e 63 dias em todas as amostras, quando comparadas às suas respectivas referências. Aos 168 dias o comportamento foi diferente nas amostras imersas em água, em cal e em regime intermitente, nas quais verificou-se uma diminuição da absorção de água frente a adição dos esporos.

Figura 132 – Resultados da absorção de água para todas as condições de exposição (a) e separadamente para cada condição ao longo do tempo de cura (b, c, d e e)



Fonte: Autora.

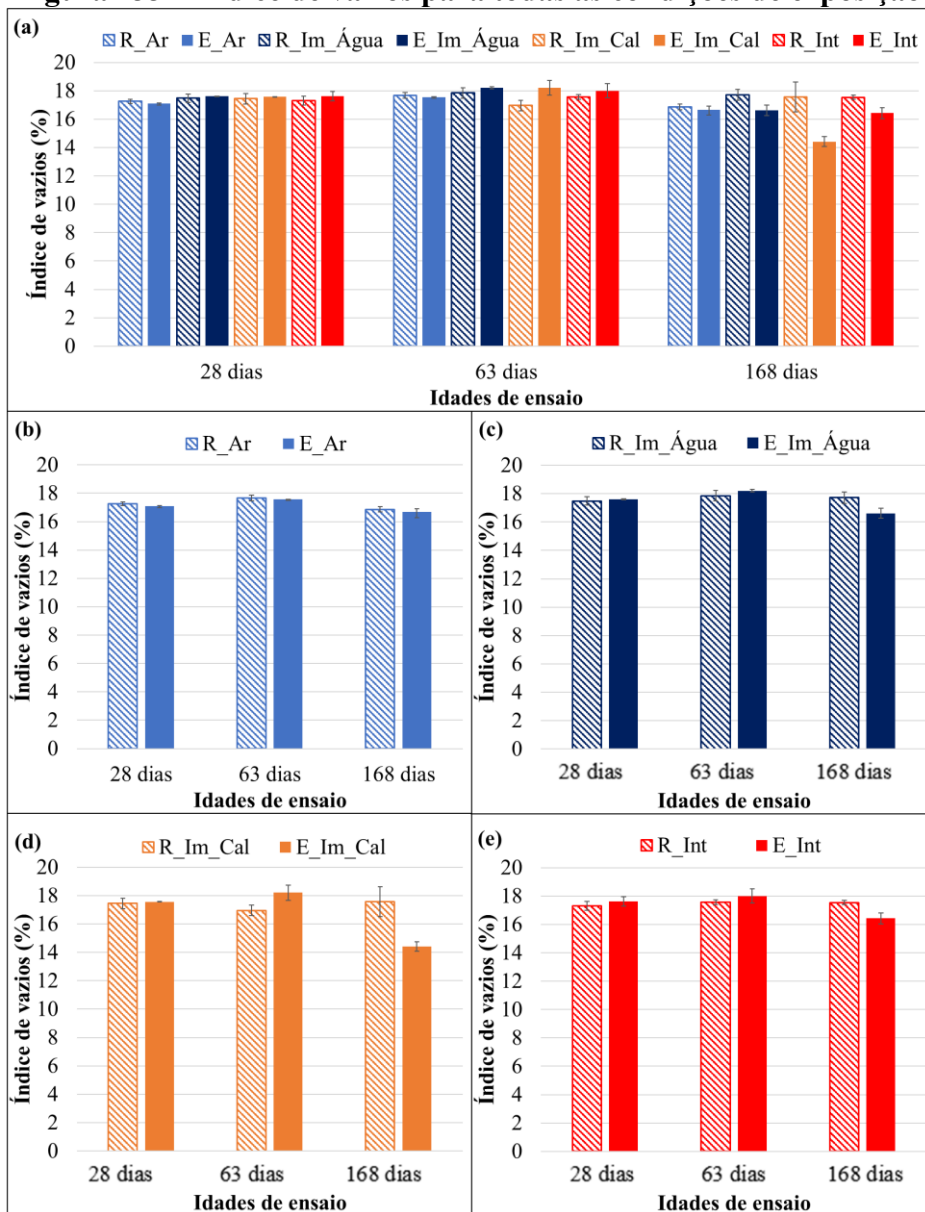
Para verificar se houve diferenças significativas, o teste Tukey a 5% de significância foi realizado para cada condição de exposição. A partir dos resultados obtidos verificou-se que houve apenas diferenças significativas na absorção de água aos 168 dias nas argamassas imersas em água, saturadas com cal e em regime intermitente, quando comparadas às suas referências. As demais amostras estavam dentro do mesmo grupo estatístico. As tabelas contendo os dados do Teste Tukey estão apresentadas no Anexo 5.

Pesquisadores afirmam que as bactérias, quando adicionadas aos materiais cimentícios, tendem a diminuir a absorção de água através do fechamento de poros pela

precipitação de CaCO_3 (TIANO *et al.*, 1999; ACHAL, MUKHERJEE e REDDY, 2011; ABO-EL-ENEIN *et al.*, 2013; CHAHAL *et al.*, 2012; CHAHAL e SIDDIQUE; 2013; WANG *et al.*, 2014; XU, YAO e JIANG, 2014; KALHORI e BAGHERPOUR, 2017; ALAZHARI *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2019; JANG *et al.*, 2020; MOHAMMED *et al.*, 2020).

A Figura 133 ilustra os resultados do índice de vazios para todas as condições de exposição (a) e separados por condição de exposição (b-e) para facilitar a comparação do tratamento bacteriano com a sua respectiva referência. Os resultados obtidos para o índice de vazios seguiram a mesma tendência dos dados de absorção de água, com uma diminuição do índice de vazios apenas aos 168 dias nas amostras E_Im_Água, E_Im_Cal e E_Int.

Figura 133 – Índice de vazios para todas as condições de exposição



Fonte: Autora.

A análise estatística (Teste Tukey – Anexo 6), revelou que as únicas argamassas que são diferentes estatisticamente das suas respectivas referências foram a E_Im_Água, E_Im_Cal e E_Int, na idade de 168 dias. Vale destacar, que nos ensaios de autocicatrização estas também foram as argamassas que apresentaram maior fechamento de fissuras, associado a precipitação de CaCO_3 .

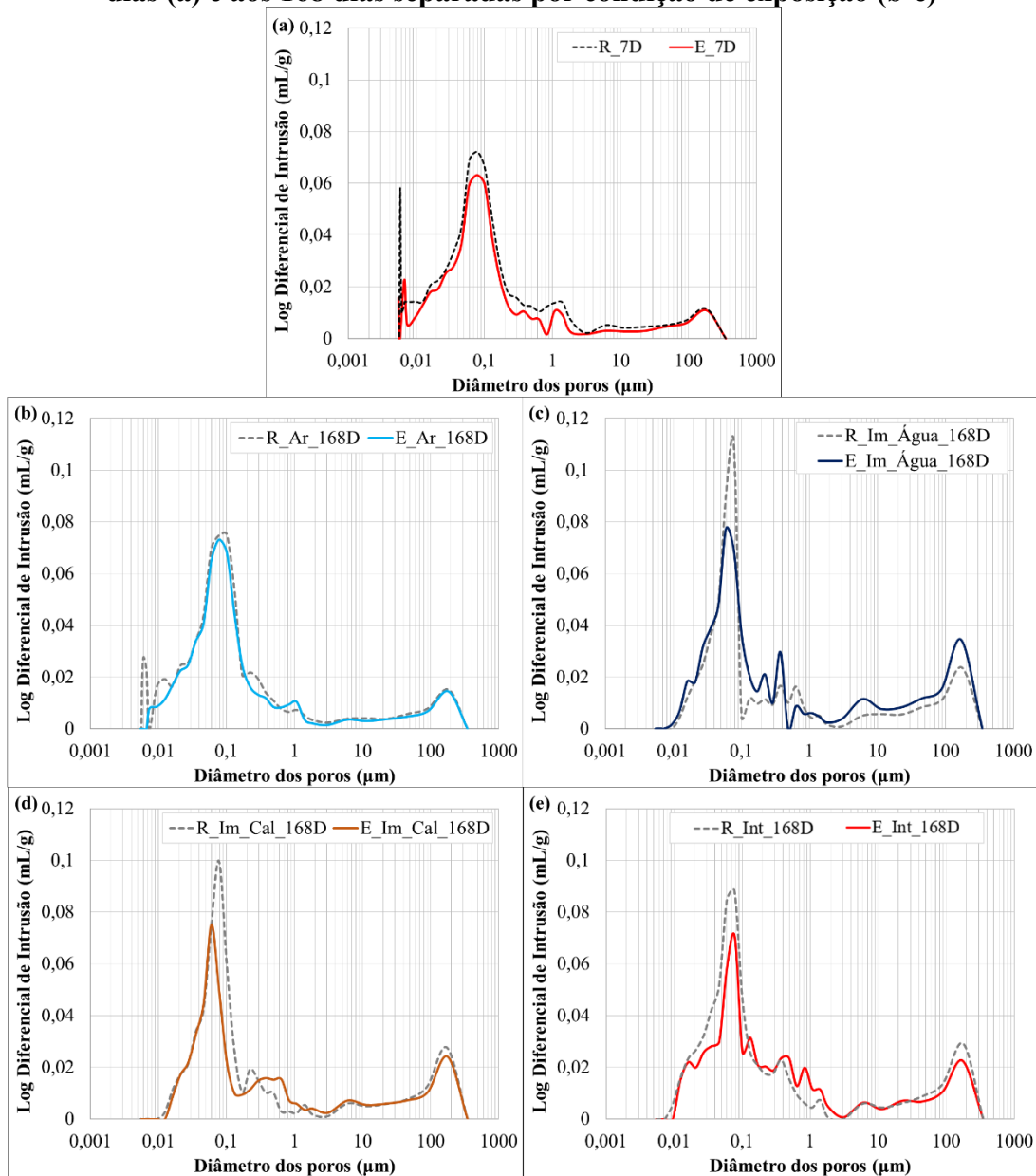
Com relação à análise dos poros, o último ensaio realizado foi o de Porosimetria por Intrusão de Mercúrio, o qual está apresentado na sequência.

4.3.3.2 *Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM)*

A PIM foi realizada em duas idades, aos 7 e 168 dias. Vale lembrar que até os 7 dias as argamassas foram submetidas a cura em tanque de água saturada com cal, sendo que nesta idade apenas dois grupos de argamassa existiam: a referência e a argamassa com adição dos esporos. Após os 7 dias de cura as argamassas foram submetidas às diferentes condições de exposição. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 134 (a) para a idade de 7 dias e na Figura 134 (b-e) para os 168 dias das argamassas expostas ao ar, imersas em água, imersas em água saturada com cal e submetidas ao regime intermitente, respectivamente.

Aos 7 dias, observou-se que as argamassas apresentaram um comportamento semelhante, com exceção do pico no menor tamanho de poro da argamassa de referência. Conforme já abordado na segunda campanha experimental, este pode ser justificado pela presença de poros capilares que estejam conectados com poros maiores. Nesta situação, com o aumento da pressão e a inserção do mercúrio no poro capilar e o acesso ao poro de maior dimensão, este poro de maior dimensão acaba sendo contabilizado com o tamanho do capilar (ALDERETE *et al.*, 2017).

Figura 134 - Diâmetro dos poros *versus* log diferencial de intrusão das argamassas aos 7 dias (a) e aos 168 dias separadas por condição de exposição (b-e)

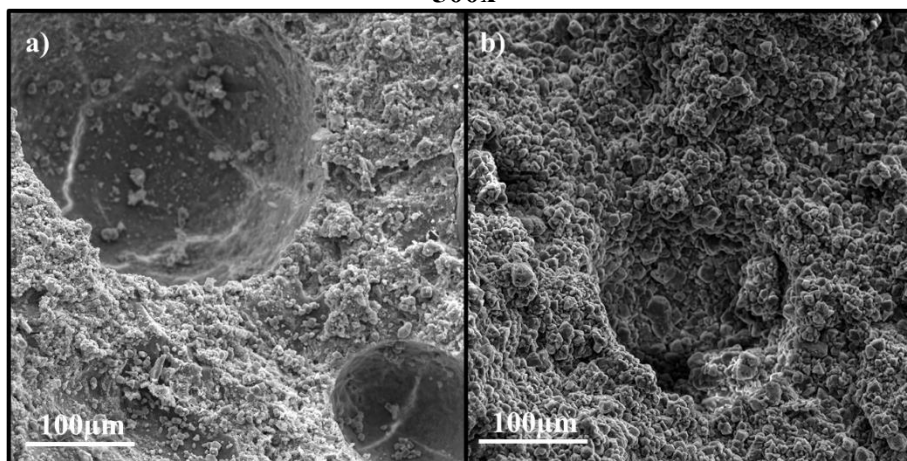


Fonte: Autora.

Aos 168 dias o comportamento das duas argamassas expostas ao ar (Figura 134b) foi semelhante, o que corrobora com os resultados anteriores e ressalta a importância da presença de água para que a precipitação de CaCO_3 aconteça pela adição bacteriana (ALAZHARI *et al.* 2018). Quando as argamassas tiveram contato com água, nas condições de exposição imersa em água, imersa em cal e em regime intermitente (Figura 134 b, c e d, respectivamente), houve uma diminuição dos picos entre os poros de 0,02 e 0,2 µm, pela adição bacteriana.

Conforme relatado na segunda campanha experimental, as bactérias podem atuar na precipitação de cristais nos poros, o que tende a diminuir o tamanho desses na amostra ao longo do tempo. É interessante mencionar que tal fato foi observado em imagens de MEV, aos 168 dias. A Figura 135 ilustra poros encontrados na amostra E_Ar (a) e E_Int, na qual pode-se observar que na condição de exposição ao ar, pouco material foi depositado nos poros, enquanto as argamassas submetidas ao regime intermitente a deposição de cristais foi maior.

Figura 135 – MEV das amostras E_AR (a) e E_Int (b) aos 168 dias com ampliação de 500x



Fonte: Autora.

Este resultado corrobora com o apresentado na distribuição de poros da PIM. Ghosh *et al.* (2005) também evidenciou mudanças na porosidade frente a adição bacteriana em ensaios de PIM. Este pesquisador verificou que frente a adição da bactéria *Shewanella* na água de amassamento, a concentração de 10^5 esporos/mL foi a que apresentou uma maior diminuição na porosidade.

4.3.4 Etapa 3

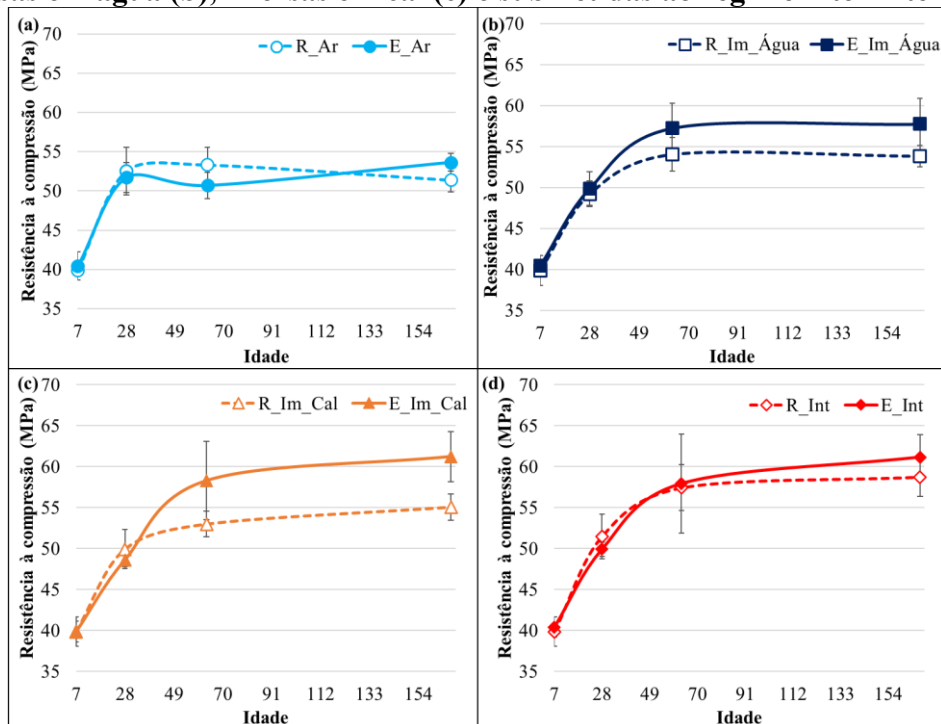
Na terceira etapa a resistência à compressão e o avanço de carbonatação foram avaliados. Os resultados obtidos estão apresentados na sequência.

4.3.4.1 Resistência à compressão

A resistência à compressão é uma propriedade importante a ser estudada em materiais cimentícios. Quando as bactérias são adicionadas, o foco das pesquisas é na autocicatrização de fissuras e no fechamento de poros. Entretanto pela importância da resistência à compressão, para os materiais cimentícios, esta propriedade também deve ser analisada, pois espera-se que frente a adição de esporos bacterianos a resistência não seja

afetada negativamente. Os resultados obtidos, separados por condição de exposição, podem ser visualizados na Figura 136.

Figura 136 – Resultados de resistência à compressão das amostras expostas ao ar (a), imersas em água (b), imersas em cal (c) e submetidas ao regime intermitente (d)



Fonte: Autora.

De maneira geral, observa-se que aos 7 dias de cura, as argamassas atingiram, em média, 40 MPa e que a resistência evoluiu para aproximadamente 50 MPa aos 28 dias, em todas as argamassas e em todas as condições de exposição. Vale lembrar que até os 7 dias todas as argamassas foram mantidas em tanque de cura, imersas em água saturada com cal, e apenas depois foram encaminhadas para suas respectivas condições de exposição.

Após os 28 dias o comportamento das argamassas não foi similar, sendo que na argamassa exposta ao ar (Figura 136a) observou-se que a resistência se manteve constante (considerando os desvios padrão) tanto para a argamassa de referência (R_Ar) como para argamassa com adição dos esporos (E_Ar).

Nas demais condições de exposição (Figura 136b-d) observou-se um aumento da resistência à compressão após os 28 dias, o qual foi maior nas amostras com adição de esporos bacterianos, resultando em resistências médias de 58 MPa para a argamassa E_Im_Água e 61 MPa para as argamassas E_Im_Cal e E_Int aos 168 dias.

A continuidade do aumento da resistência à compressão nas amostras em contato com água pode estar associada a dois fatores principais: a hidratação de partículas previamente não hidratadas, pelo contato com a água da condição de exposição, tanto na

referência como na argamassa com esporos e pela bioprecipitação de CaCO_3 , no caso das amostras com adição de esporos, que na Etapa 1 se mostrou mais eficaz nas amostras em contato com a água.

A partir da análise da Figura 136, observa-se que a argamassa com adição dos esporos bacterianos que mais se diferenciou da sua referência foi a com condição de exposição imersa em cal (E_Im_Cal - Figura 136c). Tal fato pode ter ocorrido pela bactéria utilizar a cal como uma fonte alternativa de cálcio, além do lactato de cálcio e hidróxido de cálcio presente na mistura e na própria matriz cimentícia, para precipitar cristais de carbonato de cálcio.

Conforme já relatado anteriormente, as bactérias podem atuar tanto no fechamento de fissuras como no fechamento de poros. Conforme o CaCO_3 é precipitado o diâmetro dos poros diminui, e, com isso a resistência à compressão tende a aumentar. Além disso é importante ressaltar que o carbonato de cálcio é um material de elevada resistência e ao ser precipitado também tende a elevar a resistência do material cimentício.

Além do relatado, pode-se analisar os resultados de resistência à compressão dessa etapa experimental com os da etapa anterior (Figura 80), na qual as argamassas possuem o mesmo traço, entretanto não houve a adição do lactato de cálcio e as argamassas foram analisadas apenas imersas em água saturada com cal. Na campanha experimental anterior observou-se que dos 63 aos 168 dias basicamente não houve aumento na resistência à compressão.

Em contrapartida, na última campanha experimental, através da adição do lactato de cálcio, verificou-se um aumento na resistência à compressão principalmente nas amostras imersas em cal (E_Im_Cal) e em regime intermitente (E_Int), atingindo 61,23 e 61,17 MPa, respectivamente.

Por esse motivo, pode-se concluir que a adição do lactato de cálcio não impactou de maneira negativa na resistência à compressão e, conforme foi apresentado anteriormente, favoreceu a autocicatrização.

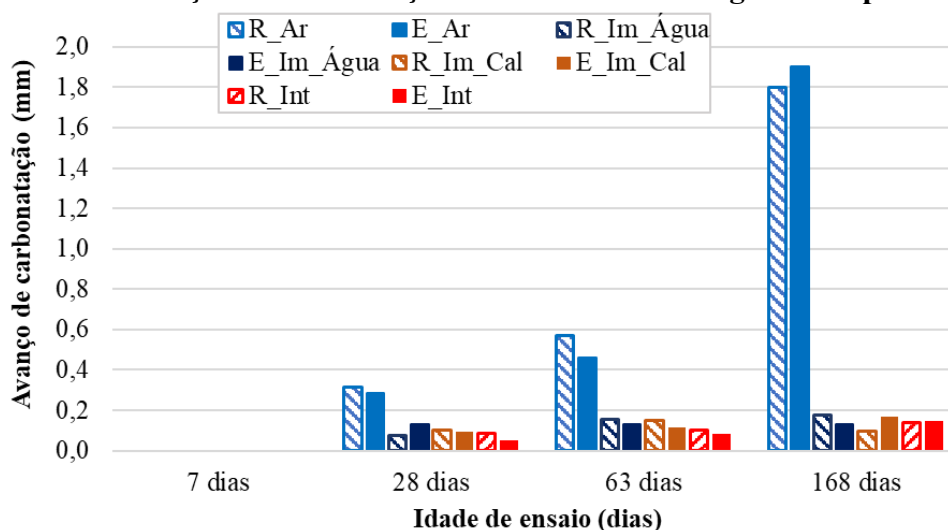
Quanto à análise estatística, a partir do Teste Tukey foi verificado que aos 7, 28, 63 e 168 dias não houve diferenças significativas entre as amostras de referência e com esporos bacterianos (ANEXO 6). Desta maneira, a partir da análise dos resultados verificou-se que todas as argamassas com adição de esporos não se diferenciaram significativamente das suas referências, em todas as idades analisadas, levando a conclusão de que a adição dos esporos não foi prejudicial a resistência à compressão.

4.3.4.2 Avanço de carbonatação

O avanço de carbonatação foi realizado com o principal objetivo de avaliar se a adição bacteriana, por precipitar CaCO_3 no fechamento de poros e fissuras, era capaz de acelerar a carbonatação das amostras. Para tal, amostras bipartidas em contato com uma solução alcoólica de fenolftaleína (1%) foram analisadas e a carbonatação foi medida conforme descreve as Recomendações do CPC – 18 (RILEM, 1988).

Na Figura 137 tem-se os resultados obtidos da espessura média carbonatada, seguido das imagens fotográficas das amostras ao longo do período analisado (Figura 138). Vale ressaltar que a espessura média carbonatada foi obtida a partir da média aritmética de 4 pontos medidos, um em cada lado da amostra, em dois corpos de prova.

Figura 137 – Avanço de carbonatação das amostras ao longo do tempo de análise

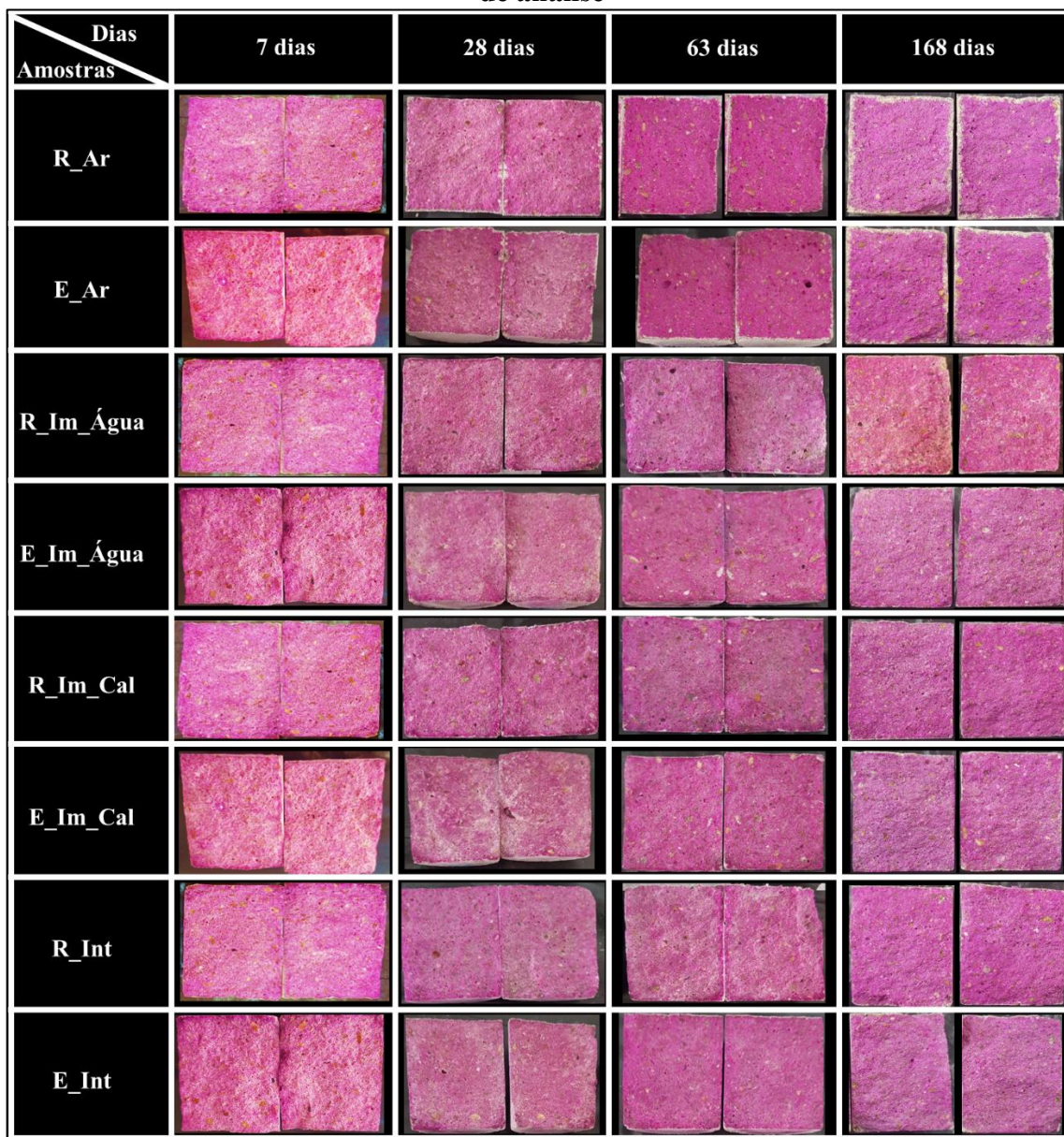


Fonte: Autora.

A partir da análise do gráfico, pode-se observar que aos 7 dias não houve carbonatação nas amostras, o que era esperado, pois elas permaneceram os primeiros 7 dias em regime de cura imersas em tanque de água saturada com cal. Após os 7 dias, as amostras foram encaminhadas para as suas respectivas condições de exposição e depois disso ensaiadas novamente aos 28, 63 e 168 dias.

A maior carbonatação foi obtida na condição de exposição ao ar, o que era esperado decorrente da exposição das amostras ao dióxido de carbono (CO_2) atmosférico, fazendo com que este reaja com o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e precipite carbonato de cálcio (CaCO_3). Nas demais condições de exposição a carbonatação foi menor que 0,2 mm em todas as idades.

Figura 138 – Imagens obtidas do avanço de carbonatação das amostras durante o tempo de análise



Fonte: Autora.

Além disso observa-se que não houve diferenças entre as amostras de referência e com adição de esporos em cada condição de exposição. A maior variação encontrada foi de 0,11 mm entre as amostras R_Ar e E_Ar, nas idades de 63 e 168 dias.

De acordo com Joshi, Goyal e Reddy (2018) a bactéria *Bacillus sp.* não foi capaz de acelerar a carbonatação nas amostras estudadas. Estes pesquisadores avaliaram o pH de amostras em diferentes profundidades quando submetidos a diferentes condições de exposição, aos 28 dias de cura, e verificaram que os valores de pH em todas as amostras estavam na faixa de 12,0 a 12,4.

As condições de exposição estudadas pelos autores foram imersas em água na argamassa de controle (sem adição bacteriana), imersa em meio de cultivo com ureia e cloreto de cálcio, imersa em meio de cultivo com ureia, cloreto de cálcio e bactéria e mediante ao tratamento de superfície por aspersão duas vezes ao dia (JOSHI, GOYAL e REDDY, 2018). Vale ressaltar que a bactéria utilizada pelos pesquisadores é ureolítica e que o período analisado pelos pesquisadores foi menor do que o avaliado neste trabalho, entretanto foi a única pesquisa encontrada na área que avaliou o pH do material.

5 CONCLUSÃO

A autocicatrização de fissuras promovida pela precipitação bacteriana de CaCO_3 nos materiais cimentícios é um estudo relativamente novo, que tem ênfase na busca de melhorias nas propriedades em geral e na durabilidade desses materiais. Estas melhorias ocorrem pela colmatação de poros e fissuras por bioprecipitação, o que tende a aumentar a vida útil desses materiais.

Dentro das delimitações da pesquisa, conclui-se que os resultados obtidos na primeira campanha experimental evidenciaram um maior potencial de precipitação *in vitro* de CaCO_3 quando bactérias isoladas de caverna são utilizadas. A bactéria selecionada, que foi identificada como *B. subtilis* isolado CV16, apresenta os genes envolvidos na precipitação de CaCO_3 , produção de biofilme e formação de esporos.

Em todas as campanhas experimentais os esporos bacterianos testados foram capazes de precipitar cristais de CaCO_3 sem o contato com uma fonte de ureia, fazendo com que a precipitação fosse efetuada de forma involuntária, pela oxidação de compostos orgânicos em contato com um meio alcalino.

Em relação à segunda campanha experimental, observou-se uma diminuição da absorção de água, do índice de vazios, do tamanho de poros a partir da técnica de Porosimetria por Intrusão de Mercúrio (PIM) e da espessura das fissuras quando os esporos bacterianos foram adicionados aos materiais cimentícios nas concentrações de 10^5 e 10^7 esporos/mL, sem prejuízos às propriedades mecânicas.

Além disso na análise de absorção de água e índice de vazios, a argamassa com adição de 10^5 células por mL não se diferenciou estatisticamente da incorporação da concentração de 10^7 esporos/mL. Entretanto na análise do fechamento de fissura por imagem, a adição de 10^7 esporos/mL se mostrou vantajosa e por isso foi selecionada.

Quando a concentração de 10^7 foi adicionada aos materiais cimentícios juntamente com uma fonte complementar de cálcio, na terceira campanha experimental, e submetida a diferentes condições de exposição verificou-se que a autocicatrização foi potencializada na presença de água. As referências, nessa etapa experimental também continham lactato, o que proporcionou uma autocicatrização nestas argamassas. Entretanto em todas as condições de exposição em contato com água as argamassas com adição de bactérias e lactato de cálcio tiveram autocicatrização superior às suas respectivas referências. Em contrapartida, quando as argamassas ficaram exposta ao ar, não houve diferenças entre as

tratadas com os esporos e a não tratadas. Conclui-se então que a condição de exposição pode influenciar na autocicatrização de materiais cimentícios frente a adição de bactérias.

Além disso observou-se que a autocicatrização foi potencializada nos primeiros 28 dias, pois nesse período a bactéria pôde estar em contato com duas fontes de cálcio: o hidróxido de cálcio, presente na própria matriz cimentícia, e o lactato de cálcio. Além disso com o passar do tempo, a precipitação do CaCO_3 dificulta o acesso a água na fissura, diminuindo assim a autocicatrização.

Desta forma, verificou-se que a adição de bactérias isoladas da caverna Pedra da Cachoeira em materiais cimentícios é capaz de promover a autocicatrização de fissuras, principalmente em contato com água. Tal fato aponta para uma limitação do tratamento bacteriano em edificações convencionais e ressalta que este tratamento teria potencial de ser aplicado em locais em contato com água, como reservatórios, tubulações e barragens.

É interessante ressaltar que o tratamento de superfície, com a solução de esporos bacterianos e lactato de cálcio, se mostrou efetivo quanto ao fechamento de fissuras, podendo ser utilizado como tratamento de fissuras em edificações existentes.

Com relação ao material precipitado nas fissuras, observou-se que o carbonato de cálcio foi biodepositado em diferentes polimorfos (calcita, aragonita e varita). Nas argamassas de referência, o CaCO_3 também foi encontrado, em menor quantidade, em decorrência da carbonatação natural.

Além disso tem-se que a adição bacteriana promoveu uma diminuição do tamanho de poros, contudo tal fato não ocorreu em todas as condições de exposição. Quando as argamassas foram imersas em água, em água saturada com cal e submetidas ao regime intermitente, essa atuação foi maior. Nas argamassas expostas ao ar, o comportamento foi semelhante entre as argamassas com e sem adição dos esporos bacterianos.

É importante destacar ainda que a adição bacteriana, na concentração de 10^7 esporos/mL, na água de amassamento não foi prejudicial para a resistência à compressão e não acelerou a carbonatação em amostras bipartidas. Tal resultado é interessante, pois o tratamento bacteriano não é realizado para aumentar a resistência e sim para autocicatrização de fissuras.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Frente ao conhecimento adquirido sobre assunto de autocicatrização por adição de bactérias, as análises laboratoriais realizadas e as lacunas do conhecimento na área, tem-se as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- análise de diferentes espessuras de fissuras e a posterior verificação do potencial de autocicatrização;
- realização de uma correlação entre a espessura da fissura e a sua taxa de autocicatrização ao longo do tempo, para que se possa realizar uma previsão do tempo necessário para a autocicatrização frente ao tratamento bacteriano;
- análise da autocicatrização por adição de bactérias em fissuras tardias, para avaliar a capacidade de atuação bacteriana ao longo do tempo;
- estudo do tratamento de superfície em uma parede revestida com pintura;
- verificação do impacto do uso de aditivos na autocicatrização por adição de bactérias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO-EL-ENEIN, S. A.; ALI, A. H.; TALKHAN, F. N.; ABDEL-GAWWAD, H. A.

Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of cement mortar. HBRC Journal, v. 9, p. 36-40, 2013.

ACHAL, V.; MUKERJEE, A.; REDDY, M. S. **Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures.** Construction and Building Materials, v. 48, p. 1-5, 2013.

ACHAL, V.; MUKHERJEE, A. **A review of microbial precipitation for sustainable construction.** Construction and Building Materials, v. 93, p. 1224–1235, 2015.

ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; KUMARI, D.; ZHANG, Q. **Biomining for sustainable construction—A review of processes and applications.** Earth-Science Reviews, V. 148, p. 1-17, 2015.

ACHAL, V.; MUKHERJEE, A.; REDDY, M.S. **Biocalcification by Sporosarcina pasteurii using Corn steep liquor as nutrient source.** Ind. Biotechnol, v. 6, p. 170–174, 2010.

ALAZHARI, M., SHARMA, T., HEATH, A., COOPER, R., & PAINE, K. **Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete.** Construction and Building Materials, v. 160, p. 610-619, 2018.

ALDERETE, N.; VILLAGRÁN, Y.; MIGNON, A.; SNOECK, D.; DE BELIE N. **Pore structure description of mortars containing ground granulated blast-furnace slag by mercury intrusion porosimetry and dynamic vapour sorption.** Construction and Building Materials, v. 145 [1], p. 157-165, 2017.

ALGAIFI, H. A.; BAKAR, S. A.; SAM, A. R. M.; ISMAIL, M.; ABIDIN, A. R. Z.; SHAHIR, S.; ALTOWAYTI, W. A. H. **Insight into the role of microbial calcium carbonate and the factors involved in self-healing concrete.** Construction and Building Materials, v. 254, n. 119258, 2020.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. **Basic local alignment search tool.** Journal of molecular biology, v. 215 [3], p. 403-410, 1990.

ANBU, P.; KANG, C.H.; SHIN, Y.J.; SO, J.S. **Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications,** Springerplus, v. 5 [1], p. 1-26, 2016.

ANDREWS S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.** 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 7215: **Cimento Portland - Determinação da resistência à compressão.** Rio de Janeiro: ABNT. 1997.

_____. NBR 6118: **Projeto de estruturas de concreto - Procedimento.** Rio de Janeiro: ABNT. 2014.

_____. NBR 13276: **Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Preparo da mistura e determinação do índice de consistência.** Rio de Janeiro: ABNT. 2005.

_____. NBR 13279: **Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Determinação da resistência à tração na flexão e à compressão.** Rio de Janeiro: ABNT. 2005.

_____. NBR 7211: **Agregados para concreto - Especificação.** Rio de Janeiro: ABNT. 2009.

_____. NBR 7222: **Concreto e argamassa — Determinação da resistência à tração por compressão diametral de corpos de prova cilíndricos.** Rio de Janeiro: ABNT. 2011.

_____. NBR 9778: **Argamassa e concreto endurecidos - Determinação da absorção de água, índice de vazios e massa específica.** Rio de Janeiro: ABNT. 2005.

_____. NBR 5738: **Moldagem e cura de corpos-de-prova cilíndricos ou prismáticos de concreto.** Rio de Janeiro: ABNT. 2015.

_____. NBR 9833: **Concreto fresco - Determinação da massa específica, do rendimento e do teor de ar pelo método gravimétrico.** Rio de Janeiro: ABNT. 2009.

_____. NBR NM 248: **Agregados - Determinação da composição granulométrica.** Rio de Janeiro: ABNT. 2003.

_____. NBR NM 45: **Agregados - Determinação da massa unitária e do volume de vazios.** Rio de Janeiro: ABNT. 2006.

_____. NBR NM 52: **Agregado miúdo - Determinação da massa específica e massa específica aparente.** Rio de Janeiro: ABNT. 2009.

AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A. **The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology.** BMC Genomics, v. 9[1], p. 75, 2008.

BACHMEIER, K.L.; WILLIAMS, A.E.; WARMINGTON, J.R.; BANG, S.S. **Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation.** Journal of Biotechnology, v. 93, p. 171–181, 2002.

BANG, S.S.; GALINAT, J.K.; RAMAKRISHNAN, V. **Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized Bacillus pasteurii.** Enzyme and microbial technology, v. 28 [4-5], p. 404-409, 2001.

BANKS, E. D.; TAYLOR, N. M.; GULLEY, J.; LUBBERS, B. R.; GIARRIZO, J. G.; BULLEN, H. A. **Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis.** Geomicrobiology Journal, v. 27, p. 444–454.

BARABESI, C.; GALIZZI, A.; MASTROMEI, G.; ROSSI, M.; TAMBURINI, E.; PERITO, B. **Bacillus subtilis gene cluster involved in calcium carbonate biomineralization.** Journal of bacteriology, v. 189, p. 228-235, 2007.

BASHEER, L.; KROPP, J.; CLELAND, D. J.; **Assessment of the durability of concrete from its permeation properties: a review.** *Construction and Building Materials*, v. 15, p. 93–103, 2001.

BÄUERLEIN, E. **Biomining of Unicellular Organisms: An Unusual Membrane Biochemistry for the Production of Inorganic Nano- and Microstructures.** *Angewandte Chemie International Edition*, v. 42, n. 6, 614–641, 2003.

BELBAHRI, L.; CHENARI BOUKET, A.; REKIK, I.; ALENEZI, F.N.; VALLAT, A.; LUPTAKOVA, L. **Comparative Genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* Strains Reveals a Core Genome with Traits for Habitat Adaptation and a Secondary Metabolites Rich Accessory Genome.** *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1438, 2017.

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D.L. **GenBank.** *Nucleic Acids Research*, v. 39, p. D32, 2007.

BOQUET, E., BORONAT, A., & RAMOS-CORMENZANA, A. **Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon.** *Nature*, v. 246(5434), p. 527–529, 1973.

BRAISSANT, O.; CAILLEAU, G.; DUPRAZ, C.; VERRECCHIA, E. P. **Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of exopolysaccharides and amino acids.** *Journal of Sedimentary Research*, v. 73(3), p. 485–490, 2003.

BUNDUR, Z. B.; KIRISITS, M. J.; R. D. FERRON. **Biomining of cement-based materials: impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength.** *Cement and Concrete Research*, v. 67, p. 237–245, 2015.

CACCHIO, P.; CONTENTO, R.C.; ERCOLE, G.; CAPPUCIO, M.P.; MARTINEZ LEPIDI, A. **Involvement of microorganisms in the formation of carbonate speleothems in the Cervo Cave (La`quila-Italy).** *Geomicrobiology*, v. 21, p. 497–509, 2004.

CACCHIO, P.; ERCOLE, C.G.; CAPPUCIO LEPIDI, A. **Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from limestone cave and from a loamy soil.** *Geomicrobiology*, v. 20, p. 85–98, 2003.

CANAVERAS, J.C.; SANCHEZ-MORAL, S.V.; SOLER SAIZ-JIMENEZ, C. **Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls.** *Geomicrobiology*. J. 18:223–240, 2001.

CASTANIER, S.; LE METAYER-LEVREL, G.; AND PERTHUISOT, J. P. **Ca-carbonates precipitation and limestone genesis – the microbiogeologist point of view.** *Sedimentary geology*, v. 126, p. 9–23, 1999.

CHAHAL, N.; SIDDIQUE, R. **Permeation properties of concrete made with fly ash and silica fume: influence of Ureolytic bacteria.** *Construction and Building Materials*, v. 49, p. 161-174, 2013.

CHAHAL, N.; SIDDIQUE, R.; RAJOR, A. **Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete.** *Construction and Building Materials*, v. 28, n. 1, p. 351-356, 2012.

CHEN, C-C.; CUCOLOTTI, M. B.; BALAC, M.; WANG, S.; CHIU, C-H.; TING, W.T.E. **Evaluations of effects of nutrients, calcium precursors, and bacteria on mechanical properties of mortar specimens.** *Microorganisms-Cementitious Materials Interactions Volume 2*, p. 455-463, 2018.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; BORRIS, R. **Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens.** *Journal of biotechnology*, v. 140 [1-2], p. 27-37, 2009.

CHOI, S.; WANG, K.; WEN, Z.; CHU, J. **Mortar crack repair using microbial induced calcite precipitation method.** *Cement e Concrete Composites*, v. 83, p. 209-221, 2017.

CHONG, T. H.; SHEIKHOESLAMI, R. **Thermodynamics and kinetics for mixed calcium carbonate and calcium sulfate precipitation.** *Chemical Engineering Science*, v. 56, n. 18, p. 5391-5400, 2001.

CHU, F.; KEARNS, D. B.; MCLOON, A.; CHAI, Y.; KOLTER, R.; LOSICK, R. **A novel regulatory protein governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*.** *Molecular microbiology*, v. 68 [5], p. 1117-1127, 2008.

CHUNXIANG, Q.; JIANYUN, W., RUIXING, W.; LIANG, C. **Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO₃ by *Bacillus pasteurii*.** *Materials Science and Engineering*, V. 29, n. 4, p. 1273-1280, 2009.

CHUO, S. C.; MOHAMED, S. F.; MOHD SETAPAR, S. H.; AHMAD, A.; JAWAID, M.; WANI, W. A.; MOHAMAD IBRAHIM, M. N. **Insights into the Current Trends in the Utilization of Bacteria for Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation.** *Materials*, v. 13 [21], n. 4993, 2020.

CIUFO, S.; KANNAN, S.; SHARMA, S.; BADRETDIN, A.; CLARK, K.; TURNER S. **Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI.** *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 68 [7], p.2386-2392, 2018.

DASKALAKIS, M. I.; RIGAS, F.; BAKOLAS, A.; MAGOULAS, A.; KOTOULAS, G.; KATSIKIS, I., ... & MAVRIDOU, A. **Vaterite bio-precipitation induced by *Bacillus pumilus* isolated from a solutional cave in Paiania, Athens, Greece.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, p. 73-84, 2015.

DE BELIE, N. **Microorganisms versus stony materials: a love–hate relationship.** *Materials and Structures*, v, 43 [9], p. 1191-1202, 2010.

DE BELIE, N.; VAN BELLEGHEM, B.; ERŞAN, Y. Ç.; VAN TITTELBOOM, K. **Durability of self-healing concrete.** In *MATEC Web of Conferences*, v. 289, p. 01003, EDP Sciences, 2019.

DE BRITO, J.; KURDA, R. **The past and future of sustainable concrete: A critical review and new strategies on cement-based materials.** *Journal of Cleaner Production*, n. 123558, 2020.

DE MUYNCK⁽¹⁾, W.; COX, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. **Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete.** *Construction and Building Materials*, v. 22, n. 5, p. 875-885, 2008.

DE MUYNCK⁽²⁾, W.; DEBROUWER, D.; DE BELIE, N., VERSTRAETE, W. **Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials.** *Cement and Concrete Research*, v. 38; p. 1005–1014, 2008.

DE MUYNCK, W.; BELIE, N. DE.; VERSTRAETE, W. **Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review.** *Ecological Engineering*, v. 36, p. 118-136, 2010.

DE MUYNCK, W.; VERBEKEN, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. **Influence of temperature on the effectiveness of a biogenic carbonate surface treatment for limestone conservation.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, p. 1335–1347, 2013.

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H.; KUIPER, I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. **Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15 [11], p. 1173-1180, 2002.

DHAMI, N. K.; MUKHERJEE, A.; REDDY, S. M.; SETO, J. **Biofilm and microbial applications in biomineralized concrete.** INTECH Open Access Publisher, 2012.

DHAMI, N. K.; REDDY, M. S.; MUKHERJEE, A. **Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review.** *Frontiers in microbiology*, v. 4 [314], p. 1-13, 2013.

DHAMI, N.K.; REDDY, M.S.; MUKHERJEE, A. **Bacillus megaterium mediated mineralization of calcium carbonate as biogenic surface treatment of green building materials.** *World J. Microbiol. Biotechnol*, v. 29, p. 2397–2406, 2013.

DIAMOND, S. **Mercury porosimetry: An inappropriate method for the measurement of pore size distributions in cement-based materials.** *Cement and Concrete Research*, v. 30 [10], p. 1517-1525, 2000.

- DONG, Y.; GAO, J.; WU, Q.; AI, Y.; HUANG, Y.; WEI, W.; ... WENG, Q. **Co-occurrence pattern and function prediction of bacterial community in Karst cave.** BMC Microbiology, v. 20 [1], p. 1-13, 2020.
- DUARTE, L. C.; JUCHEM, P. L.; PULZ, G. M.; BRUM, T. M. M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A. C.; ACAUAN, R. B. **Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros difração de Raio X.** Pesquisas em Geociências, v. 30, n. 2, p. 3-15, 2003.
- DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. **Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*.** International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 65 [7], p. 2104-2109, 2015.
- DUPRAZ⁽¹⁾, C.; REID, R. P.; BRAISSANT, O.; DECHO, A. W.; NORMAN, R. S.; VISSCHER, P. T. **Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats.** Earth-Science Reviews, v. 96, n. 3, p. 141-162, 2009.
- DUPRAZ⁽²⁾, S.; PARMENTIER, M.; MÉNEZ, B.; GUYOT, F. **Experimental and numerical modeling of bacterially induced pH increase and calcite precipitation in saline aquifers.** Chemical Geology, v. 265, v. 1, p. 44-53, 2009.
- DUPRAZ, C.; VISSCHER, P. T.; BAUMGARTNER, L. K.; REID, R. P. **Microbe-mineral interactions: early carbonate precipitation in a hypersaline lake (Eleuthera Island, Bahamas).** Sedimentology, v. 51, p. 745–765, 2004.
- EDVARDBSEN, C. **Water permeability and autogenous healing of cracks in concrete.** ACI Materials Journal, p. 448-455, 1999.
- EL-TURKI, A., BALL, R. J., HOLMES, S., ALLEN, W. J., & ALLEN, G. C. **Environmental cycling and laboratory testing to evaluate the significance of moisture control for lime mortars.** Construction and Building Materials, v. 24 [8], p. 1392-1397, 2010.
- ENGEL, A.S.; STERN, L.A.; BENNETT, P.C. **Microbial contributions to cave formation: new insights into sulfuric acid speleogenesis.** Geology, v. 32, p. 369–372, 2004.
- ERŞAN, Y. Ç.; DE BELIE, N.; BOON, N. **Microbially induced CaCO₃ precipitation through denitrification: an optimization study in minimal nutrient environment.** Biochemical engineering journal, 101, 108-118, 2015.
- FENG, J.; CHEN, B.; SUN, W.; WANG, Y. **Microbial induced calcium carbonate precipitation study using *Bacillus subtilis* with application to self-healing concrete preparation and characterization.** Construction and Building Materials, v. 280, n. 122460, 2021.

FERENHOF, H. A.; FERNANDES, R. F. **Desmistificando a revisão de literatura como base para redação científica: método SSF**. Revista ACB, 21(3), 550-563, 2016.

FRIIS, A. K.; DAVIS, T. A.; FIGUEIRA, M. M.; PAQUETTE, J.; MUCCI, A. **Influence of Bacillus subtilis cell walls and EDTA on calcite dissolution rates and crystal surface features**. Environmental science e technology, v. 37, n. 11, p. 2376-2382, 2003.

GALARDINI, M.; BIONDI, E.G.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. **CONTIGuator: a bacterial genomes finishing tool for structural insights on draft genomes**. Source Code Biol Med, v. 6 [1], p. 11, 2011.

GAO, M.; GUO, J.; CAO, H.; WANG, H.; XIONG, X.; KRASSTEV, R.; LIU, L. **Immobilized bacteria with pH-response hydrogel for self-healing of concrete**. Journal of Environmental Management, v. 261, n. 110225, 2020.

GE, B.; LIU, B.; NWET, T. T.; ZHAO, W.; SHI, L.; ZHANG, K. **Bacillus methylotrophicus strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent**. PloS one, v. 11 [11], 2016.

GHOSH, P.; MANDAL, S.; CHATTOPADHYAY, B. D.; PAL, S. **Use of microorganism to improve the strength of cement mortar**. Cement and Concrete Research, v. 35, n. 10, p. 1980-1983, 2005.

GOMES, M. **Gênero Bacillus spp. Tópicos em Bacteriologia Veterinária**. FAVET-FRGS, 2013.

GONZÁLEZ, Y. V.; SANTANAB, A. P.; de CARVALHOC, J. C. **Bactérias nativas indutoras de precipitação de minerais de carbonato de cálcio em solos tropicais**. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, v. 34, p. 15-21, 2014.

GRANGER, S.; LOUKILI, A.; PIJAUDIER-CABOT, G.; CHANVILLARD, G. **Experimental characterization of the self-healing of cracks in an ultra high performance cementitious material: mechanical tests and acoustic emission analysis**. Cement and Concrete Research, v. 37 (4), p. 519–527, 2007.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. Academic Press, London, UK, p. 313, 1982.

GROTH, I.; SCHUMANN, P.; LAIZ, L.; SANCHEZ-MORAL, S.; CANAVERAS, J.C.; SAIZ-JIMENEZ, C. **Geomicrobiological study of the Grotta di Cervi, Porto Badisco, Italy**. Geomicrobiology, v. 18, p. 241–258, 2001.

GU, H. J.; SUN, Q. L.; LUO, J. C.; ZHANG, J.; SUN, L. **A first study of the virulence potential of a Bacillus subtilis isolate from deep-sea hydrothermal vent**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 9, p. 183, 2019.

GUPTA, S.; KUA, H. W. DAI PANG, S. **Healing cement mortar by immobilization of bacteria in biochar: An integrated approach of self-healing and carbon sequestration.** Cement and Concrete Composites, v. 86, p. 238-254, 2018.

HAMMES, F.; BOON, N.; DE VILLIERS, J.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. **Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation.** Applied And Environmental Microbiology, p. 4901–4909, 2003.

HILLOULIN, B.; GRONDIN, F.; MATALLAH, M.; LOUKILI, A. **Modelling of autogenous healing in ultra high performance concrete.** Cement and Concrete Research, v. 61, p. 64-70, 2014.

ITAMBÉ. Brasil começa a desenvolver concreto cicatrizante. Disponível em: <<https://www.cimentoitambe.com.br/brasil-concreto-cicatrizante/>>. Acesso em: 07 de abril de 2020.

JANG, I.; SON, D.; KIM, W.; PARK, W.; YI, C. **Effects of spray-dried co-cultured bacteria on cement mortar.** Construction and Building Materials, v. 243, n. 118206, 2020.

JENA, S.; BASA, B.; PANDA, K. C.; SAHOO, N. K. **Impact of Bacillus subtilis bacterium on the properties of concrete.** Materials Today: Proceedings, Article in press, 2020.

JOHNSTON, M. D.; MUENCH, B. A.; BANKS, E. D.; BARTON, H. A. **Human urine in Lechuguilla Cave: the microbiological impact and potential for bioremediation.** Journal of Cave and Karst Studies, v. 74, p. 278–291, 2012.

JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. **Development of a bacteria-based self healing concrete.** In Proc. int. FIB symposium, v. 1, p. 425-430, 2008.

JONKERS, H. M.; THIJSEN, A.; MUYZER, G.; COPUROGLU, O.; SCHLANGEN, E. **Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete.** Ecological Engineering, v. 36, p. 230-235, 2010.

JOSHI, S.; GOYAL, S.; REDDY, M. S. **Influence of nutrient components of media on structural properties of concrete during biocementation.** Construction and Building Materials, v. 158, p. 601-613, 2018.

JUNG, Y.; KIM, W.; KIM, W.; PARK, W. **Complete Genome and Calcium Carbonate Precipitation of Alkaliphilic Bacillus sp. AK13 for Self-Healing Concrete.** Journal of microbiology and biotechnology, v. 30 [3], p. 404-416, 2020.

JUSTO-REINOSO, I.; HEATH, A.; GEBHARD, S.; PAINE, K. **Aerobic non-ureolytic bacteria-based self-healing cementitious composites: A comprehensive review.** Journal of Building Engineering, n. 102834, 2021.

JR. MATTANA, A. **Metodologia de avaliação da porosidade de estruturas cimentícias endurecidas através de microtomografia de Raio X – avaliação de pasta cimentícias e**

argamassas de revestimento. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KALHORI, H.; BAGHERPOUR, R. **Application of carbonate precipitating bacteria for improving properties and repairing cracks of shotcrete.** Construction and Building Materials, v. 148, p. 249-260, 2017.

KIESEWALTER, H. T.; LOZANO-ANDRADE, C. N.; MARÓTI, G.; SNYDER, D.; COOPER, V. S.; JØRGENSEN, T. S.; KOVÁCS, Á. T. **Complete Genome Sequences of 13 Bacillus subtilis Soil Isolates for Studying Secondary Metabolite Diversity.** Microbiology Resource Announcements, v. 9 [2], 2020.

KONNO, H., NANRI, Y.; KITAMURA, M. **Crystallization of aragonite in the causticizing reaction.** Powder Technology, v. 123, n. 1, p. 33-39, 2002.

KRISHNAPRIYA, S.; VENKATESH BABU, D. L.; PRINCE ARULRAJ G. **Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete.** Microbiological research, v. 174, p. 48-55, 2015.

KRUMBEIN, W.; PATERSON, D.; ZAVARZIN, G. **Fossil and Recent Biofilms: A Natural History of the Impact of Life on Planet Earth.** Dordrecht: Kluwer Scientific Publishers, 482, 2003.

KUMARI, D.; LI, M.; PAN, X.; XIN-YI, Q. **Effect of bacterial treatment on Cr (VI) remediation from soil and subsequent plantation of Pisum sativum.** Ecological Engineering, v. 73, p. 404–408, 2014.

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; ALBERTINI, A. M.; ALLONI, G. O.; AZEVEDO, V.; BORRIS, R. **The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis.** Nature, v. 390 [6657], p. 249-256, 1997.

LEE, I.; KIM, Y.O.; PARK, S.C.; CHUN, J. **OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity.** Int J Syst Evol Microbiol, v. 66 [2], p. 1100-1103, 2016.

LI, M.; FANG, C.; KAWASAKI, S.; HUANG, M.; ACHAL, V. **Bio-consolidation of cracks in masonry cement mortars by Acinetobacter sp. SC4 isolated from a karst cave.** International biodeterioration & biodegradation, v. 141, p. 94-100, 2019.

LIU, C.; XU, X.; LV, Z.; XING, L. **Self-healing of Concrete Cracks by Immobilizing Microorganisms in Recycled Aggregate.** Journal of Advanced Concrete Technology, v. 18 [4], p. 168-178, 2020.

LUO, M.; QIAN, C. **Influences of bacteria-based self-healing agents on cementitious materials hydration kinetics and compressive strength.** Construction and Building Materials, 121, 659-663, 2016.

- LUO, M.; QIAN, C.; LI, R. **Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete.** *Construction and Building Materials*, v. 87, p. 1-7, 2015.
- LUO, M.; QIAN, C.; LI, R.; RONG, H. **Efficiency of concrete crack-healing based on biological carbonate precipitation.** *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, v. 30 [6], p. 1255-1259, 2015.
- MA, L.; PANG, A.-P.; LUO, Y.; LU, X.; LIN, F. **Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii*.** *Microb. Cell Fact*, v. 19, p. 12, 2020.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARL, D. P. **Microbiologia de Brock.** Porto Alegre: Artmed, 12^a Edição: 2010.
- MAIGNIEN, L.; DEPREITER, D.; FOUBERT, A.; REVEILLAUD, J.; DE MOL, L.; BOECKX, P.; BOON, N. **Anaerobic oxidation of methane in a cold-water coral carbonate mound from the Gulf of Cadiz.** *International Journal of Earth Sciences*, v. 100(6), p. 1413-1422, 2011.
- MARVASI, M.; DAVILA-VARQUEZ, Y. C.; MARTINEZ, L. C. **Supplemental Materials for Laboratory Activivy to Effectively Teach Introductory Geomicrobiology Concepts to Non-Geology Majors.** *Journal of Microbiology e Biology Education*, v. 14, n. 2, p. 206-212, 2013.
- MARVASI, M.; VISSCHER, P. T.; PERITO, B.; MASTROMEI, G.; CASILLAS-MARTÍNEZ, L. **Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm development of *Bacillus subtilis* etfA mutant.** *FEMS Microbiology Ecology*, v. 71, n. 3, p. 341-350, 2010.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P., AUCH, A. F., KLENK, H. P., & GÖKER, M. **Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions.** *BMC bioinformatics*, v. 14 [1], p. 60, 2013.
- MOHAMMED, H.; ORTONEDA-PEDROLA, M.; NAKOUTI, I.; BRAS, A. **Experimental characterisation of non-encapsulated bio-based concrete with self-healing capacity.** *Construction and Building Materials*, v. 256, n. 119411, 2020.
- MONDAL, S.; GHOSH, A. D. **Investigation into the optimal bacterial concentration for compressive strength enhancement of microbial concrete.** *Construction and Building Materials*, 183, 202-214, 2018.
- MONTOYA, C.; MARQUEZ, M. A.; LOPEZ, J. M.; CUERVO, C. **Characterization of calcite bioprecipitated by a native *Bacillus subtilis* isolate.** *Revista Colombiana de Biotecnologia*, v. 2, 2005
- MORDINI, S.; OSERA, C.; MARINI, S.; SCAVONE, F.; BELLAZZI, R.; GALIZZI, A.; CALVIO, C. **The role of SwrA, DegU and PD3 in fla/che expression in *B. subtilis*.** *PLoS One*, v. 8 [12], 2013.

MORS, R. M.; JONKERS, H. M. **Carbon source selection for microbial conversion to minerals in cementitious materials**. Proceedings pro123-2: Final Conference of RILEM TC 253-MCI: Microorganisms-Cementitious Materials Interactions Volume 2, p. 445-454, 2018.

MORS, R.; JONKERS, H. M. **Bacteria-based self-healing concrete: evaluation of full scale demonstrator projects**. RILEM Technical Letters, 4, 138-144, 2019.

NEVILLE, A. **Consideration of durability of concrete structures: Past, present, and future**. Materials and structures, v. 34 [2], p. 114-118, 2001.

NEVILLE, A. M. **Properties of Concrete**. Longman, London, 1995.

NEVILLE, A. M.; BROOKS, J. J. Tecnologia do Concreto. 2º ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2013.

NGUYEN, T. H.; GHORBEL, E.; FARES, H.; COUSTURE, A. **Bacterial self-healing of concrete and durability assessment**. Cement and Concrete Composites, v. 104, p. 103340, 2019.

NUGROHO, A.; SUMARNO, A.; NGELJARATAN, L.N.; ZULFIANA, D.; RATNA AYU KRISHANTI, N.P.; TRIASTUTIL, T.; WIDODO, E. **Self-Healing Concrete Using Bacteria Calcification from Karst Cave Environment**. J. Kim. Terap. Indones [21], p. 7-13, 2019.

OKWADHA, G. D., e LI, J. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. Chemosphere, 81(9), 1143-1148, 2010.

OKYAY, T. O.; RODRIGUES, D. F. **Biotic and abiotic effects on CO₂ sequestration during microbially-induced calcium carbonate precipitation**. FEMS microbiology ecology, v. 91 [3], p. 1-13, 2015.

OLIVEIRA, A. A. de. **Inativação de endósporos bacterianos com fotossensibilizadores porfirínicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

ONIYAMA, E.; WAHLBECK, P. G. **Application of transpiration theory to TGA data: calcium carbonate and zinc chloride**. Thermochemica acta, v. 250, p. 41-53, 1995.

ORTIZ, M.; NEILSON, J. W.; NELSON, W. M.; LEGATZKI, A.; BYRNE, A.; YU, Y. **Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ**. Microbial ecology, v. 65 [2], p. 371-383, 2013.

PACHAIVANNAN, P.; HARIHARASUDHAN, C.; MOHANASUNDRAM, M.; BHAVANI, M. A. **Experimental analysis of self healing properties of bacterial concrete**. Materials Today: Proceedings, 2020.

PAN, X.; SHI, Z.; SHI, C.; LING, T. C., LI, N. **A review on surface treatment for concrete – Part 2: performance**. Construction and Building Materials, v. 133, p. 81-90, 2017.

PARK, S. J.; PARK, J. M.; KIM, W. J.; GHIM, S. Y. **Application of *Bacillus subtilis* 168 as a multifunctional agent for improvement of the durability of cement mortar**. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 22, p. 1568-1574, 2012.

PEI, R., LIU, J.; WANG, S.; YANG, M. **Use of bacterial cell walls to improve the mechanical performance of concrete**. Cement e Concrete Composites, v. 39, p. 122–130, 2013.

PENG, Y.; LEUNG, H.C.M.; YIU, S.M.; CHIN, F.Y.L. **IDBA - A practical iterative De Bruijn graph De Novo assembler**. In: Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics). p. 426–440, 2010.

PERITO, B.; CASILLAS, L.; MARVASI, M. **Factors affecting formation of large calcite crystals (≥ 1 mm) in *Bacillus subtilis* 168 biofilm**. Geomicrobiology journal, v. 35 [5], p. 385-391, 2018.

PERITO, B.; MARVASI, M.; BARABESI, C.; MASTROMEI, G.; BRACCI, S.; VENDRELL, M.; TIANO, P. **A *Bacillus subtilis* cell fraction (BCF) inducing calcium carbonate precipitation: biotechnological perspectives for monumental stone reinforcement**. Journal of Cultural Heritage, v. 15, n. 4, p. 345-351, 2014.

PHILLIPS, A. J.; GERLACH, R.; LAUCHNOR, E.; MITCHELL, A. C.; CUNNINGHAM, A. B.; SPANGLER, L. **Engineered applications of ureolytic biomineralization: a review**. Biofouling, v. 29, p. 715–733, 2013.

PORCHERON, F.; MONSON, P. A. **Modeling mercury porosimetry using statistical mechanics**. Langmuir, V. 20, p. 6482-6489, 2004.

PORTLAND CEMENT ASSOCIATION. **Types and Causes of Concrete Deterioration**. Portland Cement Association, Skokie, IL, 2002.

PUNGRASMI, W.; INTARASOONTRON, J.; JONGVIVATSAKUL, P.; LIKITLERSUANG, S. **Evaluation of Microencapsulation Techniques for MICP Bacterial Spores Applied in Self-Healing Concrete**. Scientific reports, v. 9 [1], p. 1-10, 2019.

QIAN, C.; CHEN, H.; REN, L.; LUO, M. (2015). **Self-healing of early age cracks in cement-based materials by mineralization of carbonic anhydrase microorganism**. Frontiers in microbiology, v. 6, n. 1225, 2015.

QIAN, C.; ZHENG, T.; ZHANG, X.; SU, Y. **Application of microbial self-healing concrete: Case study**. Construction and Building Materials, v. 290, n. 123226, 2021.

QIAN, S. Z.; ZHOU, J.; SCHLANGEN, E. **Influence of curing condition and precracking time on the self-healing behavior of engineered cementitious composites**. Cement and concrete composites, v. 32 [9], p. 686-693, 2010.

QIAN, S.; ZHOU, J.; DE ROOIJ, M. R.; SCHLANGEN, E.; YE, G.; VAN BREUGEL, K. **Self-healing behavior of strain hardening cementitious composites incorporating local waste materials.** *Cement and Concrete Composites*, v. 31 [9], p. 613-621, 2009.

RAMACHANDRAN, S.K.; RAMAKRISHNAN, V.; BANG, S.S. **Remediation of concrete using micro-organisms.** *ACI Materials Journal*, v. 98, p. 3–9, 2001.

REDDY, S., RAO, M., APARNA, P., e SASIKALA, C. **Performance of standard grade bacterial (*Bacillus subtilis*) concrete.** *Asian J Civ Eng (Build Housing)*, v. 11, p. 43-55, 2010.

REEKSTING, B. J.; HOFFMANN, T. D.; TAN, L.; PAINE, K.; Gebhard, S. **In-depth profiling of calcite precipitation by environmental bacteria reveals fundamental mechanistic differences with relevance to application.** *Applied and environmental microbiology*, v. 86 [7], n. e02739-19, 2020.

RICHTER, M.; ROSSELLO-MORA, R. **Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition.** *Proc Natl Acad Sci*, v. 106 [45], p. 19126-19131, 2009.

RIDING, R. **Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms.** *Sedimentology*, v. 47, p. 179–214, 2000.

RILEM - Réunion Internationale des Laboratoires et Experts des Matériaux, systèmes de construction et ouvrages. 221-SHC: Self-healing phenomena in cement-based materials, 2013.

RILEM CPC-18. Measurement of hardened concrete carbonation depth. *Materials and Structures*, 1988, p. 453-455.

ROBERTSON, J. B.; GOCHT, M.; MARAHIEL, M. A.; ZUBER, P. **AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86 [21], p. 8457-8461, 1989.

RONG, H.; WEI, G.; MA, G.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.; ZHANG, L.; XU, R. **Influence of bacterial concentration on crack self-healing of cement-based materials.** *Construction and Building Materials*, v. 244, n. 118372, 2020.

RÜCKERT, C.; BLOM, J.; CHEN, X.; REVA, O.; BORRIS, R. **Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42.** *Journal of biotechnology*, v. 155 [1], p. 78-85, 2011.

RUSZNYÁK, A.; AKOB, D. M.; NIETZSCHE, S.; EUSTERHUES, K.; TOTSCHKE, K. U.; NEU, T. R.; KATZSCHMANN, L. **Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic Herrenberg cave.** *Applied and environmental microbiology*, v. 78 [4], p. 1157-1167, 2012.

RYPAROVÁ, P.; PROŠEK, Z.; SCHREIBEROVÁ, H.; BÍLÝ, P.; TESÁREK, P. **The role of bacterially induced calcite precipitation in self-healing of cement paste**. Journal of Building Engineering, v. 39, n. 102299, 2021.

RYU, M.; KIM, H.; LIM, M.; YOU, K.; AHN, J. **Comparison of dissolution and surface reactions between calcite and aragonite in L-glutamic and L-aspartic acid solutions**. Molecules, 15(1), 258-269, 2010.

SANCHEZ-MORAL, S.; CANAVERAS, J. C.; LAIZ, L.; SAIZ-JIMENEZ, C.; BEDOYA, J.; LUQUE, L. **Biomediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments: a short review**. Geomicrobiology, v. 20, p. 491–500, 2003.

SANDOVAL, G. F. B. *et al.* **Assessing the phenomenon of clogging of pervious concrete (Pc): Experimental test and model proposition**. Journal of Building Engineering, v. 29, n. August 2019, 2020.

SCHLANGEN, E.; SANGADJI, S. **Addressing infrastructure durability and sustainability by self healing mechanisms-Recent advances in self healing concrete and asphalt**. Procedia Engineering, v. 54, p. 39-57, 2013.

SCHMITT, M. **Caracterização do Sistema Poroso de Rochas Selantes combinando-se Adsorção de Nitrogênio e Intrusão de Mercúrio**. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2009.

SCHREIBEROVÁ, H.; BÍLÝ, P.; FLÁDR, J.; ŠEPS, K.; CHYLÍK, R.; TRTÍK, T. **Impact of the self-healing agent composition on material characteristics of bio-based self-healing concrete**. Case Studies in Construction Materials, v. 11, n. e00250, p. 1-8, 2019.

SCHWANTES, N. **DESEMPENHO DE *Bacillus sp.* NA BIOCIMENTAÇÃO DE MATERIAIS CIMENTÍCIOS**. 2017. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Saneamento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

SCHWANTES-CEZARIO, N., MEDEIROS, L. P., DE OLIVEIRA JR, A. G., NAKAZATO, G., KOBAYASHI, R. K. T., & TORALLES, B. M. **Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 123, p. 200-205, 2017.

SCHWANTES-CEZARIO, N.; NOGUEIRA, G. S. F.; COUTO, A. F.; PORTO, M. F.; ANDRELLO, A. C.; TORALLES, B. M. **Mortars with the addition of bacterial spores evaluation of porosity by different test methods**. Journal of Building Engineering, v. 30, p.1-10, 2020.

SCHWANTES-CEZARIO, N.; PORTO, M. F.; SANDOVAL, G. F. B.; NOGUEIRA, G. S. F.; COUTO, A. F.; TORALLES, B. M. **Effects of *Bacillus subtilis* biocementation on the mechanical properties of mortars**. Revista IBRACON de estruturas e materiais. v.12, p.31 - 38, 2018.

SECKBACH, J.; CHELA-FLORES, J. **Habitable environments by extremophiles on earth, the solar system, and elsewhere.** Joseph Seckbach (Ed.), Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, v. 22, p. 859–870, 2012.

SHARMA, T. K.; ALAZHARI, M.; HEATH, A.; PAINE, K.; COOPER, R.M. **Alkaliphilic Bacillus species show potential application in concrete crack repair by virtue of rapid spore production and germination then extracellular calcite formation.** Journal of applied microbiology, v. 122 [5], p. 1233–1244, 2017.

SINGH, M., KUMAR, S. V., WAGHMARE, S. A., SABALE, P. D. **Aragonite–vaterite–calcite: Polymorphs of CaCO₃ in 7th century CE lime plasters of Alampur group of temples, India.** Construction and Building Materials, 112, 386-397, 2016.

SKEVI, L.; REEKSTING, B.; GEBHARD, S.; PAINE, K. **Bacteria Based Self-healing of Later-Age Cracks in Concrete.** International RILEM Conference on Early-age and Long-term Cracking in RC Structures, p. 367-376, Springer, Cham, 2021.

SOYSAL, A.; MILLA, J.; KING, G. M.; HASSAN, M.; RUPNOW, T. **Evaluating the Self-Healing Efficiency of Hydrogel-Encapsulated Bacteria in Concrete.** Transportation Research Record, n. 0361198120917973, 2020.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J.K.; BANG, S.S. **Microbiological precipitation of CaCO₃.** Soil Biology and Biochemistry, v. 31, p. 1563–1571, 1999.

STRAUCH, M. A.; BOBAY, B. G.; CAVANAGH, J.; YAO, F.; WILSON, A.; LE BRETON, Y. **Abh and AbrB control of Bacillus subtilis antimicrobial gene expression.** Journal of bacteriology, v. 189 [21], p. 7720-7732, 2007.

STRAUCH, M.; WEBB, V.; SPIEGELMAN, G.; HOCH, J. A. **The SpoOA protein of Bacillus subtilis is a repressor of the abrB gene.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 87 [5], p. 1801-1805, 1990.

STUCKRATH, C.; SERPELL, R.; VALENZUELA, L. M.; LOPEZ, M. **Quantification of chemical and biological calcium carbonate precipitation: performance of self-healing in reinforced mortar containing chemical admixtures.** Cement and Concrete Composites, v. 50, p. 10-15, 2014.

SU, J. F.; SCHLANGEN, E.; WANG, Y. **Investigation the self-healing mechanism of aged bitumen using microcapsules containing rejuvenator.** Construction and Building Materials, v. 85, p. 49–56, 2015.

SU, Y.; FENG, J.; ZHAN, Q.; ZHANG, Y.; QIAN, C. **Non-ureolytic microbial self-repairing concrete for low temperature environment.** Smart Materials and Structures, v. 28 [7], n. 075041, 2019.

SWERTS, M. S., COSTA, A. M., & FIORINI, J. E. **Efeito da solução associada de clorexidina e própolis na inibição da aderência de Streptococcus spp.** Rev. Int. Periodont. Clín, 2, 10-16, 2005.

TAKAGI, Emílio M. **Concretos autocicatrizantes com cimentos brasileiros de escória de alto-forno ativadas por catalisador cristalino**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Infraestrutura Aeronáutica – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, 2013. Disponível em: <<http://www.bdata.bibl.ita.br/tesesdigitais/65639.pdf>>. Acesso em: 02 mai 2018.

TAN, L.; REEKSTING, B.; FERRANDIZ-MAS, V.; HEATH, A.; GEBHARD, S.; PAINE, K. **Effect of carbonation on bacteria-based self-healing of cementitious composites**. *Construction and Building Materials*, v. 257, p. 119501, 2020.

TANG, W.; KARDANI, O.; CUI, H. **Robust evaluation of self-healing efficiency in cementitious materials – a review**. *Construction and Building Materials*, v. 81, p. 233–247, 2015.

TAYLOR, H. F. W. **Cement chemistry**. London: Thomas Telford, 1997. 199p

TIANO, P.; BIAGIOTTI, L.; MASTROMEI, G. **Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation**. *Journal of microbiological methods*, v. 36, n. 1, p. 139-145, 1999.

TZIVILOGLOU, E.; WIKTOR, V.; JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. **Bacteria-based self-healing concrete to increase liquid tightness of cracks**. *Construction and Building Materials*, v. 122, p. 118-125, 2016.

VAN MULLEM, T.; GRUYAERT, E.; CASPEELE, R.; DE BELIE, N. **First Large Scale Application with Self-Healing Concrete in Belgium: Analysis of the Laboratory Control Tests**. *Materials*, v. 13 [4], p. 1-20, 2020.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N. **Self-healing in cementitious materials—A review**. *Materials*, v. 6 [6], p. 2182-2217, 2013.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N.; DE MUYNCK, W.; VERSTRAETE, W. **Use of bacteria to repair cracks in concrete**. *Cement and Concrete Research*, v. 40, p. 157-166, 2010.

VAN TITTELBOOM, K.; GRUYAERT, E.; RAHIER, H.; DE BELIE, N. **Influence of mix composition on the extent of autogenous crack healing by continued hydration or calcium carbonate formation**. *Construction and Building Materials*, v. 37, p. 349–359, 2012.

WANG, J. Y.;^(a) SOENS, H.; VERSTRAETE, W.; DE BELIE, N. **Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores**. *Cement and Concrete Research*, v. 56, p. 139-152, 2014.

WANG, J. Y.;^(b) SNOECK, D.; VAN VLIERBERGHE, S.; VERSTRAETE, W.; DE BELIE, N. **Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete**. *Construction and building materials*, v. 68, p. 110-119, 2014.

WANG, J.; DEWANCKELE, J.; CNUDDÉ, V.; VAN VLIERBERGHE, S.; VERSTRAETE, W.; DE BELIE, N. **X-ray computed tomography proof of bacterial-based self-healing in concrete**. *Cement and Concrete Composites*, v. 53, p. 289-304, 2014.

WANG, J.; VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. **Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete**. *Construction and Building Materials*, v. 26 [1], p. 532-540, 2012.

WEN, Y.; XIANG, L.; JIN, Y. **Synthesis of plate-like calcium carbonate via carbonation route**. *Materials Letters*, v. 57, n. 16-17, p. 2565-2571, May 2003.

WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. **Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete**. *Cement e Concrete Composites*, v. 33, p. 763–770, 2011.

WILLIAMS, S. L.; KIRISITS, M. J.; FERRON, R. D. **Optimization of growth medium for *Sporosarcina pasteurii* in bio-based cement pastes to mitigate delay in hydration kinetics**. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 43 [4], p. 567-575, 2016.

WU, S.; CHIANG, C. Y.; ZHOU, W. **Formation mechanism of CaCO₃ spherulites in the myostracum layer of limpet shells**. *Crystals*, 7(10), 319, 2017.

XIANG, L.; XIANG, Y.; WANG, Z. G.; JIN, Y. **Influence of chemical additives on the formation of super-fine calcium carbonate**. *Powder Technology*, v. 126, n. 2, p. 129-133, 2002.

XU, J.; WANG, X. **Self-healing of concrete cracks by use of bacteria-containing low alkali cementitious material**. *Construction and Building Materials*, v. 167, p. 1-14, 2018.

XU, J.; YAO, W. **Multiscale mechanical quantification of self-healing concrete incorporating non-ureolytic bacteria-based healing agent**. *Cement and Concrete Research*, v. 64, p. 1-10, 2014.

ZHANG, J. L.; WU, R. S.; LI, Y. M.; ZHONG, J. Y.; DENG, X.; LIU, B.; XING, F. **Screening of bacteria for self-healing of concrete cracks and optimization of the microbial calcium precipitation process**. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 100 [15], p. 6661-6670, 2016.

ZHANG, J.; ZHAO, C.; ZHOU, A.; YANG, C.; ZHAO, L.; LI, Z. **Aragonite formation induced by open cultures of microbial consortia to heal cracks in concrete: Insights into healing mechanisms and crystal polymorphs**. *Construction and Building Materials*, v. 224, p. 815-822, 2019.

ZHANG, W.; ZHENG, Q.; ASHOUR, A.; HAN, B. **Self-healing concrete composites for sustainable infrastructures: A review**. *Composites Part B: Engineering*, 107892, 2020.

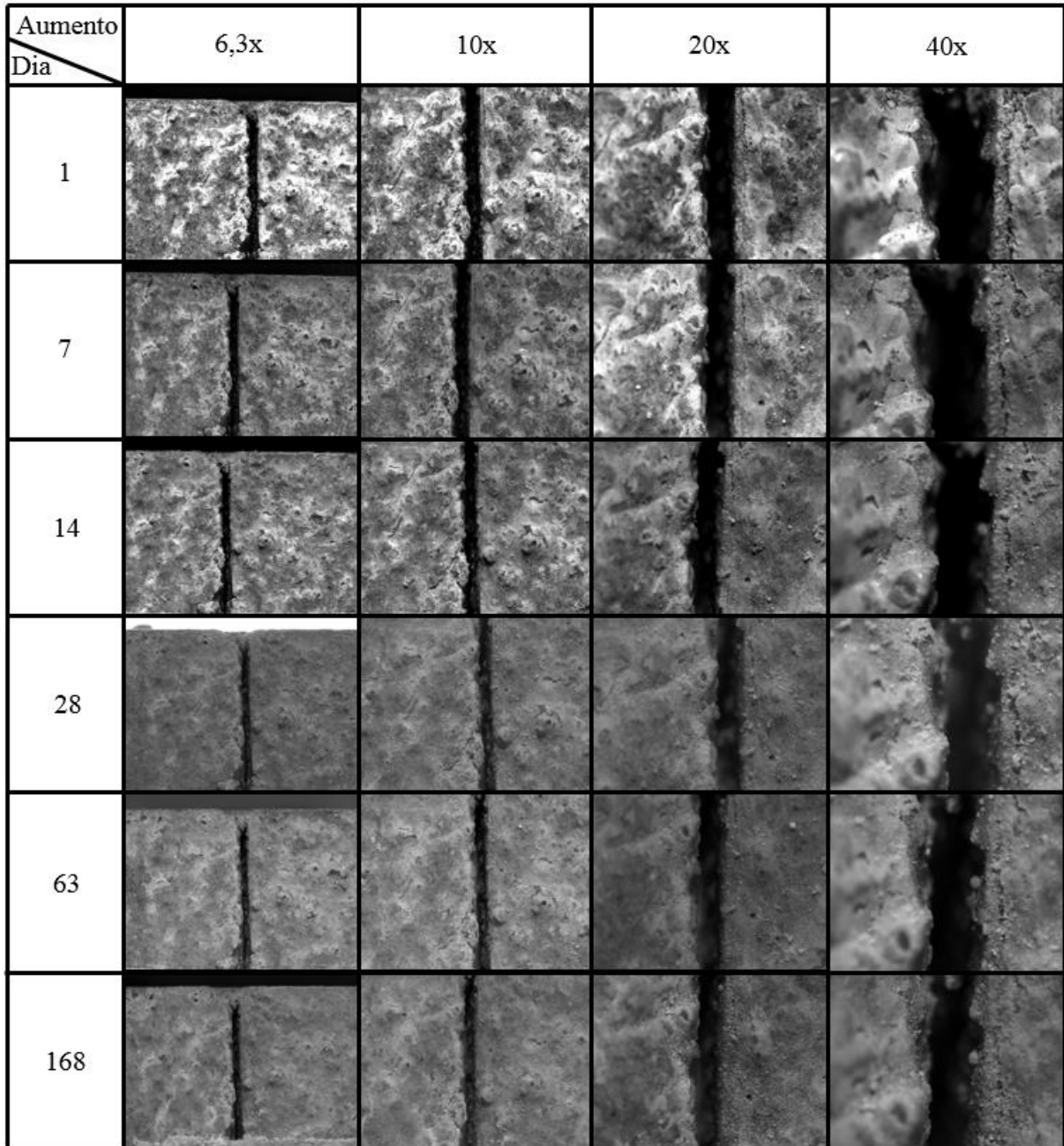
ZHU, B.; STÜLKE, J. **SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis***. *Nucleic Acids Res*, v. 46, p. D743–D748, 2018.

ZHU, T.; DITTRICH, M. **Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: a review**. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 4, p. 1-21, 2016.

ANEXOS

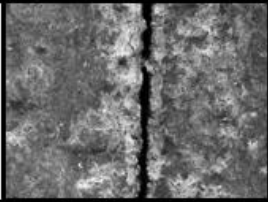
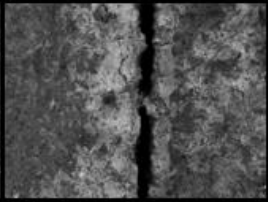


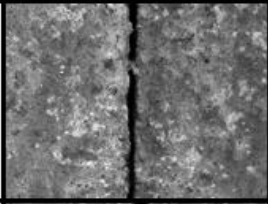
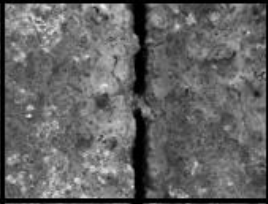
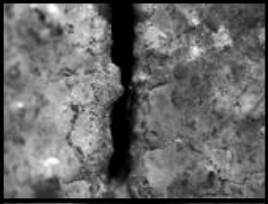
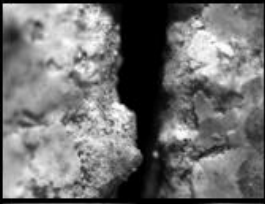
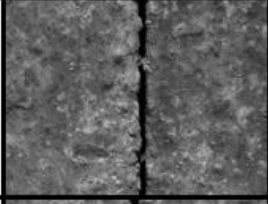
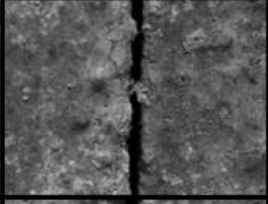
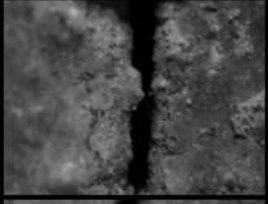
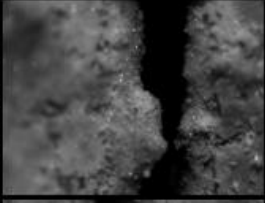
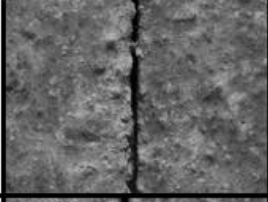
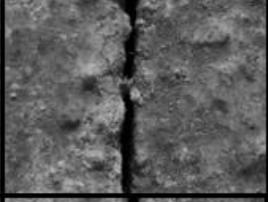
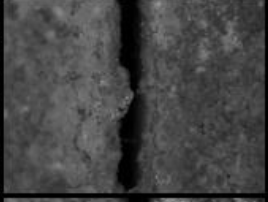



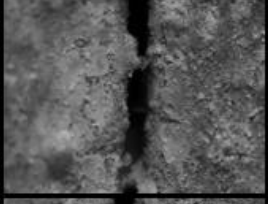

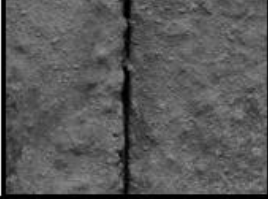



ANEXO 1:

Figura 139 – Acompanhamento da fissura da argamassa de referência (REF) durante o período de análise



Fonte: Autora.

Figura 140 – Acompanhamento da fissura da argamassa com adição de 10^3 esporos/mL (A_3) durante o período de análise

Aumento Dia	6,3x	10x	20x	40x
1				
7				
14				
28				
63				
168				

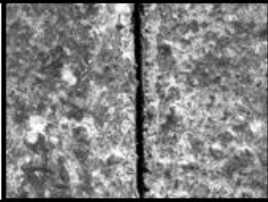
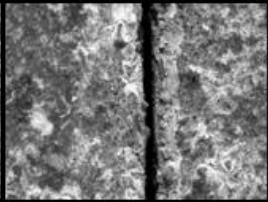
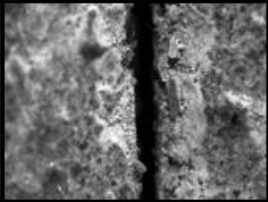
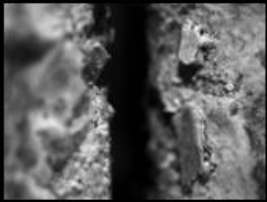
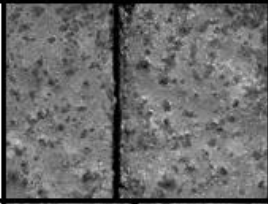
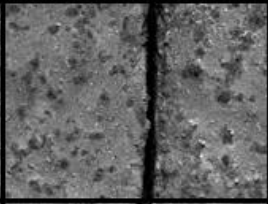
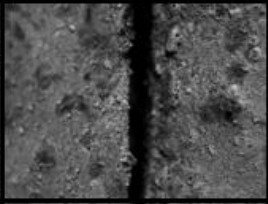

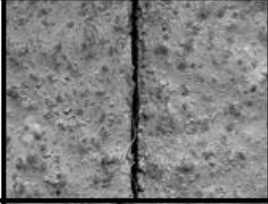
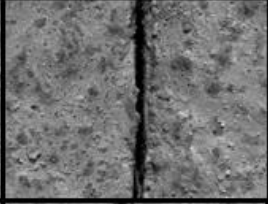
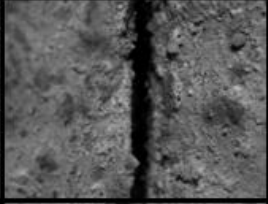
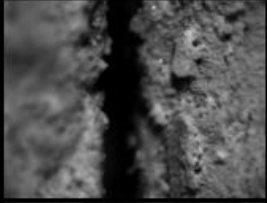
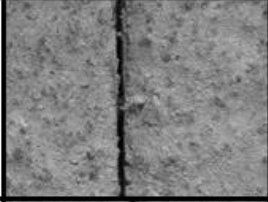
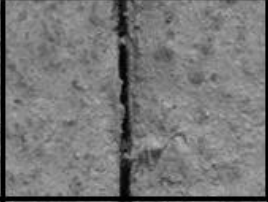
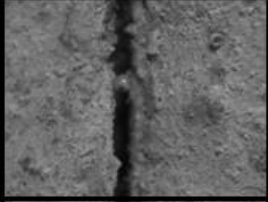
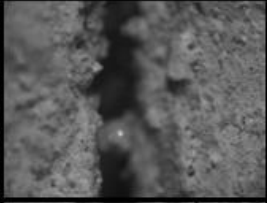
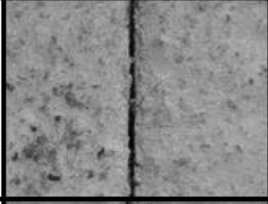
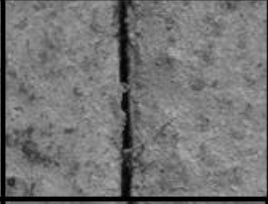
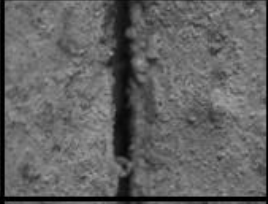
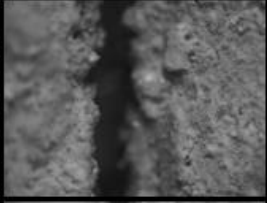
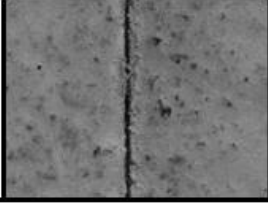
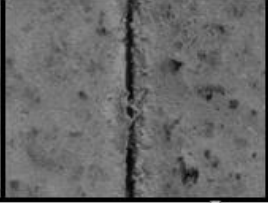
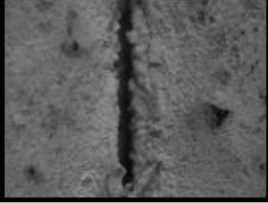
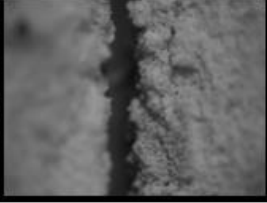
Fonte: Autora.

Figura 141 – Acompanhamento da fissura da argamassa com adição de 10^5 esporos/mL (A_5) durante o período de análise

Aumento Dia	6,3x	10x	20x	40x
1				
7				
14				
28				
63				
168				

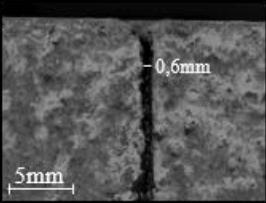
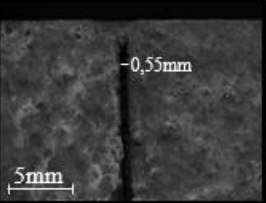
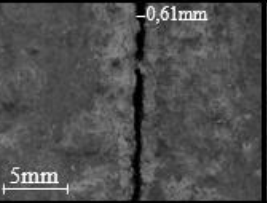
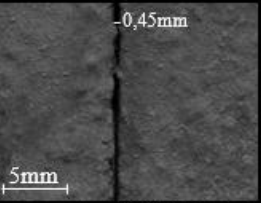
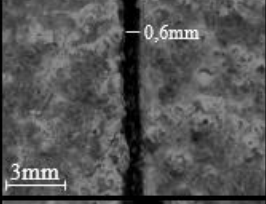
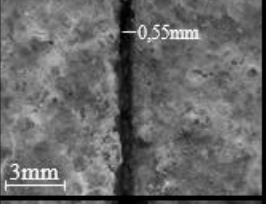
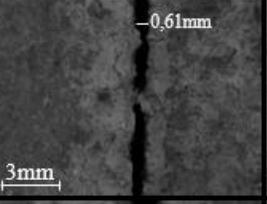
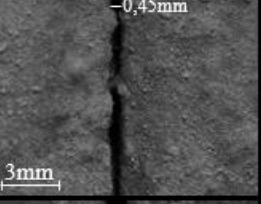
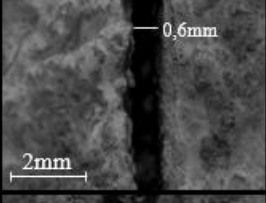
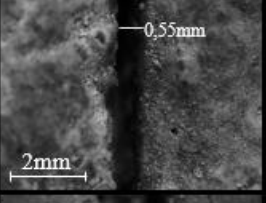
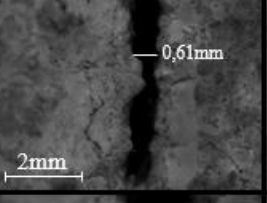
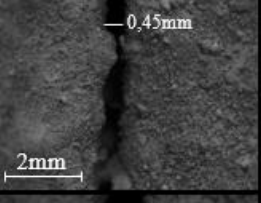
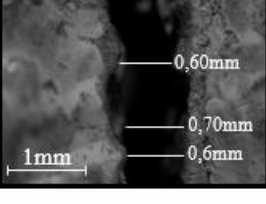
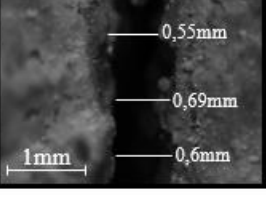
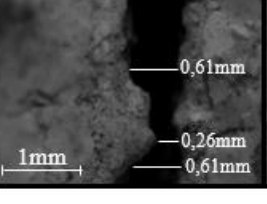
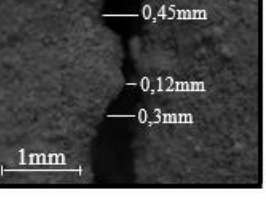
Fonte: Autora.

Figura 142 – Acompanhamento da fissura da argamassa com adição de 10^7 esporos/mL (A_7) durante o período de análise

Aumento Dia	6,3x	10x	20x	40x
1				
7				
14				
28				
63				
168				

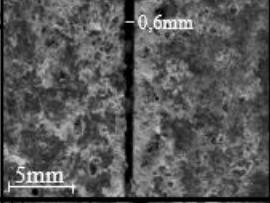
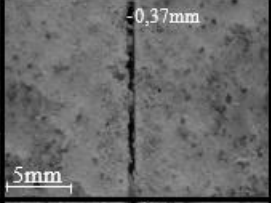
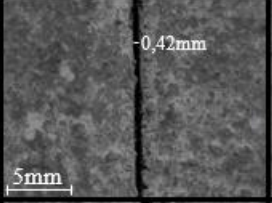
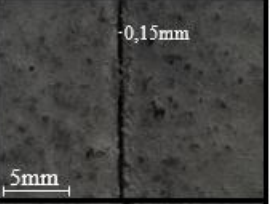
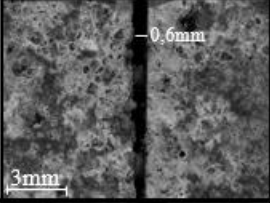
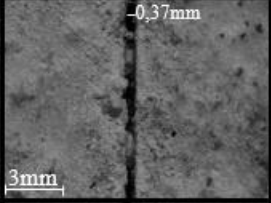
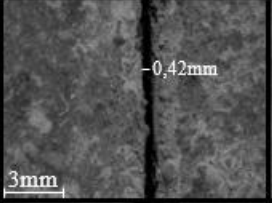
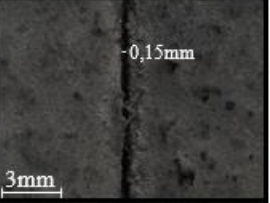
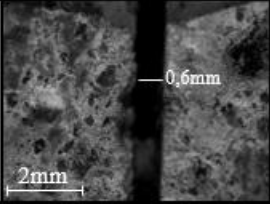
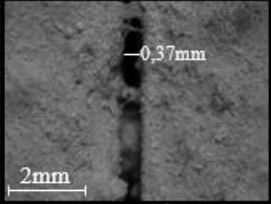
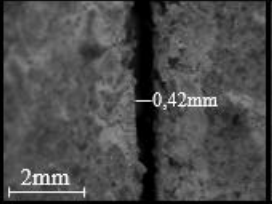
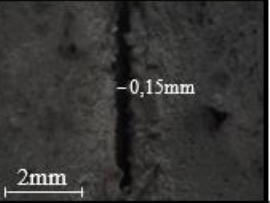
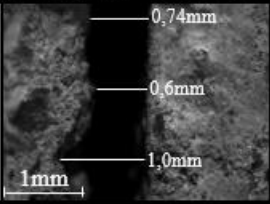
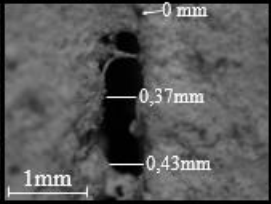
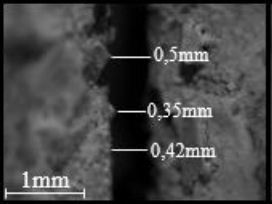
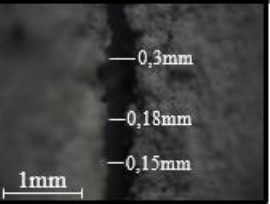
Fonte: Autora.

Figura 143 – Imagens das argamassas de referência (REF) e com adição de 10^3 esporos/mL (A_3) em estereoscópio

Amostra	REF		A 3	
Dia	1	168	1	168
Aumento				
6,3				
10				
20				
40				

Fonte: Autora.

Figura 144 – Imagens das argamassas com adição de 10^5 (A_5) e 10^7 (A_7) esporos/mL em estereoscópio

Amostra	A_5		A_7	
	1	168	1	168
6,3				
10				
20				
40				

Fonte: Autora.

ANEXO 2:

Tabela comparativa da bactéria *CV16* e de outras bactérias do gênero *Bacillus*

Cepa	Nº de adesão no GenBank	dDDH %	ANI (%)	GC (%)	Pb (Gb)	Fonte
<i>B. subtilis</i>						
CV16	***	100	100	47,30	3,99	Solo
<i>B. subtilis</i> G7	CP029609.1	89,60	98,70	43,70	4,22	Amostras marinhas da China (GU <i>et al.</i> , 2019)
<i>B. subtilis</i> 168	NC_000964.3	89,20	98,72	43,50	4,21	Microrganismo modelo (KUNST <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. subtilis</i> 75	CP045825.1	90,50	98,90	43,90	4,16	Solo em campo com grama na Alemanha (KIESEWALTER <i>et al.</i> , 2020)
<i>B. amyloliquefaciens</i>						
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7T	NC_014551.1	20,90	77,07	46,10	3,98	Não especificado (RÜCKERT <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. velezensis</i>						
<i>B. velezensis</i> NKG-1	CP024203.1	20,90	77,13	46,30	4,19	Solos vulcânicos nas montanhas Changbai (GE <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. velezensis</i> FZB42	CP000560.2	20,80	77,24	46,50	3,91	Solo (CHEN <i>et al.</i> , 2009)

dDDH: hibridação DNA-DNA digital; ANI: Identidade Média de Nucleotídeos, GC: Conteúdo de guanina e citosina no genoma, Pb: tamanho do genoma em gigabases (10⁶)

ANEXO 3:

Genes presentes na bactéria CV16 envolvidos na produção de biofilme e esporos

Genes	Posição em CV16	% de identidade com referência	Descrição da função em SUBTWIKI
<i>ABRB</i>	45162 a 44872	100 %	Repressor de genes que induzem esporulação
<i>DEGQ</i>	3179615 a 3179475	100%	Estimula a produção de enzimas degradantes e poli-gama-glutamato extracelular
<i>DEGU</i>	3607563 a 3606874	99%	Biossíntese de cápsulas (junto com SwrA), DegU não fosforilado é necessária para a motilidade no enxame
<i>KINA</i>	1465047 a 1466867	99%	Iniciação da esporulação
<i>KINB</i>	3152486 a 3153772	99%	
<i>KINC</i>	1510007 a 1511293	99%	
<i>KIND</i>	1427944 a 1426424	99%	
<i>MOTA</i>	1430183 a 1429371	99%	
<i>MOTB</i>	1429399 a 1428614	99%	Motilidade
<i>REMA</i>	1638272 a 1638541	100%	Regulador transcricional de genes da matriz extracelular, atua junto com SinR, AbrB e DegU
<i>SIGD</i>	1713096 a 1713860	100%	Regulador de motilidade
<i>SIGH</i>	116628 a 117284	99%	Responsável pela transcrição de genes da fase estacionária precoce
<i>SIGW</i>	195114 a 195677	99%	Adaptação a compostos ativos na membrana
<i>SINI</i>	2500517 a 2500690	100%	Controle de formação de biofilme
<i>SINR</i>	2500724 a 2501059	100%	Regulador transcricional de genes de respostas pós-fase exponencial
<i>SIPW</i>	2678176 a 2677592	99%	Peptidase I bifuncional de sinal que controla a formação de biofilme aderido à superfície e processa TasA e TapA
<i>SPO0A</i>	2466895 a 2466092	86%	Regulador do início da esporulação
<i>SRFAA</i>	368939 a 379702	98%	Síntese de surfactina
<i>SRFAB</i>	379715 a 378485	98%	Síntese de antibióticos
<i>SRFAC</i>	390503 a 394330	99%	
<i>SRFAD</i>	394359 a 395087	99%	
<i>SWRA</i>	3584297 a 3584297	99%	Ativador importante da biossíntese flagelar, controla o número de corpos basais flagelares, controla a atividade degU
<i>SWRB</i>	1713889 a 1714392	99%	Controla a atividade SigD. Ativa a secreção flagelar do tipo 3 pela membrana proteica Flp
<i>SWRC</i>	736614 a 739772	99%	Formação de biofilme
<i>TAPA</i>	2503318 a 2502557	99%	

ANEXO 4:

Teste Tukey referente aos ensaios de absorção de água:

Tabela 20 – Teste Tukey para a absorção de água aos 28 dias

Amostra	Grupo estatístico
E Ar	a
R Ar	a
R Int	a
R Im Água	a
R Im Cal	a
E Im Cal	a
E Int	a
E Im Água	a

Fonte: Autora.

Tabela 21 – Teste Tukey para a absorção de água aos 63 dias

Amostra	Grupo estatístico
E Ar	a
R Ar	a
R Int	a
R Im Água	a
R Im Cal	a
E Im Cal	a
E Int	a
E Im Água	a

Fonte: Autora.

Tabela 22 – Teste Tukey para a absorção de água aos 168 dias

Amostra	Grupo estatístico
E Ar	a
R Ar	b
R Int	bc
R Im Água	bc
R Im Cal	bc
E Im Cal	c
E Int	c
E Im Água	c

Fonte: Autora.

ANEXO 5:

Teste Tukey referente aos ensaios de índice de vazios:

Tabela 23 – Teste Tukey para o índice de vazios aos 28 dias

Amostra	Grupo estatístico
E Ar	a
R Ar	a
R Int	a
R Im Água	a
R Im Cal	a
E Im Cal	a
E Int	a
E Im Água	a

Fonte: Autora.

Tabela 24 – Teste Tukey para o índice de vazios aos 63 dias

Amostra	Grupo estatístico
R Im Cal	a
E Ar	ab
R Int	ab
R Ar	ab
E Im Cal	ab
R Im Água	ab
E Int	b
E Im Água	b

Fonte: Autora.

Tabela 25 – Teste Tukey para o índice de vazios aos 168 dias

Amostra	Grupo estatístico
E Im Cal	a
E Int	b
E Ar	bc
R Ar	cd
E Im Água	cde
R Int	def
R Im Cal	ef
R Im Água	f

Fonte: Autora.

ANEXO 6:

Teste Tukey referente aos ensaios de resistência à compressão:

Tabela 26 – Teste Tukey para resistência à compressão das amostras aos 28 dias

Amostra	Grupo estatístico
E Im Cal 28D	a
R Im Água 28D	a
E Im Água 28D	ab
E Int 28D	ab
R Im Cal 28D	ab
R Int 28D	ab
E Ar 28D	ab
R Ar 28D	b

Fonte: Autora.

Tabela 27 – Teste Tukey para resistência à compressão das amostras aos 63 dias

Amostra	Grupo estatístico
E Ar 63D	a
R Im Cal 63D	ab
E Int 63D	ab
R Ar 63D	ab
R Im Água 63D	b
E Im Água 63D	b
R Int 63D	b
E Im Cal 63D	b

Fonte: Autora.

Tabela 28 – Teste Tukey para resistência à compressão das amostras aos 168 dias

Amostra	Grupo estatístico
R Ar 168D	a
E Ar 168D	ab
R Im Água 168D	ab
R Im Cal 168D	abc
R Int 168D	abc
E Im Água 168D	bc
E Int 168D	c
E Im Cal 168D	c

Fonte: Autora.