UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
CURSO DE ENGENHARIA CIVIL

UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMO AUTÓGENO PARA A RECUPERAÇÃO DE FISSURAS EM CORPOS DE PROVA DE ARGAMASSA DE CIMENTO PORTLAND

Graciela Mânica

Lajeado, junho de 2019

Graciela Mânica

UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMO AUTÓGENO PARA A RECUPERAÇÃO DE FISSURAS EM CORPOS DE PROVA DE ARGAMASSA DE CIMENTO PORTLAND

Trabalho de Conclusão de curso apresentado no Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Civil.

Orientador: Profa. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza

Lajeado, junho de 2019

Graciela Mânica

UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMO AUTÓGENO PARA A RECUPERAÇÃO DE FISSURAS EM CORPOS DE PROVA DE ARGAMASSA DE CIMENTO PORTLAND

A Banca examinadora abaixo aprova a Monografia apresentada na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, na linha de formação específica em Engenharia Civil, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Bacharela em Engenharia Civil:

Profa. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Me. Rafael Mascolo
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dra. Mônica Jachetti Maciel
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Lajeado, junho de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio, incentivo e compreensão ao longo de todo curso. Sem o suporte de vocês minha graduação teria se tornado inviável. Agradeço, em especial, à minha irmã, Janaina, que foi meu porto seguro nessa jornada e à minha filha que, embora nem sempre tenha entendido minhas ausências, hoje compreende que foi necessário.

Aos amigos que entenderam minhas ausências, que apoiaram os momentos de estudo, em especial o meu TCC onde mostraram-se empolgados com o assunto questionando, ouvindo, sugerindo, incentivando e até mesmo oferecendo suas paredes fissuradas para testes.

Ao laboratorista do Latec, Vianei Pansenhagen, agradeço por toda ajuda durante a moldagem dos corpos de prova. Aos laboratoristas e bolsistas do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, especialmente Ana Julia Führ, Adriano Gennari e Gabriela Rabaioli Rama, agradeço por todo auxílio e paciência.

Agradeço ao Professor Me. Rafael Mascolo que mesmo não sendo meu orientador sempre mostrou-se disposto a sanar dúvidas e trocar ideias sobre o trabalho.

E por último, um agradecimento mais que especial à minha orientadora, Professora Dra. Cláucia Fernanda Volken de Souza que oportunizou a viabilidade deste trabalho. Sem a sua orientação e paciência o mesmo não teria acontecido. Obrigada por aceitar esse desafio, acreditar no meu trabalho, me desafiar e incentivar a seguir em frente. Juntas fizemos esse trabalho “acontecer”. Obrigada.

RESUMO

Na construção civil o cimento é o material mais consumido, e, embora apresente excelente resistência à compressão, quando tracionado tende a fissurar e romper com facilidade. Para auxiliar na resistência à tração utiliza-se armadura de aço dentro das estruturas. As fissuras são as maiores responsáveis pela deterioração da estrutura, pois permitem a entrada de gases e de umidade, que reagem com os componentes do concreto influenciando no pH e tornando um ambiente agressivo, principalmente, às armaduras. Para resolver o problema das fissuras foi proposto o uso de aditivos que reagem com água produzindo cristais para selar a abertura, e adições que impedem a fissura de aumentar e facilitam a cicatrização autógena dos materiais cimentícios utilizando as reações dos componentes do mesmo. Porém, foi observado que estas opções acabam por diminuir a resistência mecânica ou influenciar no pH. A utilização de microrganismos precipitantes de carbonato de cálcio, ou calcita ($CaCO_3$), está sendo proposta para solucionar os problemas de fissuração sem interferir de maneira negativa em propriedades de materiais cimentícios. Para adicionar os microrganismos à mistura e garantir sua sobrevivência no meio alcalino é recomendado envolvê-los em uma cápsula, juntamente com os nutrientes que necessitam para realizar a precipitação de $CaCO_3$. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de autocicatrização de corpos de prova de argamassa de cimento Portland por meio da adição do *Bacillus subtilis* ATCC6633. O microrganismo foi encapsulado por meio de extrusão tendo como material de parede o alginato de sódio, e o mesmo combinado com amido. O microrganismo foi adicionado, de forma livre e encapsulado, aos corpos de prova de concreto que tiveram as fissuras induzidas por ensaio de flexão. Após, os corpos de prova foram mergulhados em água ou água com ureia para ativação do microrganismo e posteriormente observou-se a recuperação das fissuras. As amostras contendo o microrganismo, encapsulado ou livre, foram comparadas aos corpos de prova de referência, onde o mesmo não foi adicionado e observou-se que nas amostras que continham o microrganismo encapsulado as fissuras cicatrizaram. Ao mesmo tempo, as amostras onde o microrganismo foi adicionado livre, e nas amostras de referência, não observou-se a cicatrização. Também foi verificado se as cápsulas poderiam interferir na resistência da argamassa. Os ensaios à tração e à compressão foram realizados aos sete e aos cem dias e uma redução de resistência foi verificada, principalmente na resistência à compressão.

Palavras chave: Carbonato de cálcio. Calcita. *Bacillus subtilis.* Encapsulamento. Bioconcreto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ciclo da reação do cristalizante.....21
Figura 02 – Fases da curva de crescimento.....24
Figura 03 - Diluição seriada para a contagem microbiana em placas.....27
Figura 04 - Métodos de contagem.....28
Figura 05 – *B. subtilis* ATCC6633.....37
Figura 06 – Tela utilizada no interior dos corpos de prova de argamassa.....39
Figura 07 – Fluxograma resumido do desenvolvimento do trabalho.....41
Figura 08 – Preparação do pré-inóculo.....42
Figura 09 – Determinação da densidade ótica do pré inóculo.....43
Figura 10 – Preparo do inóculo.....44
Figura 11 – Materiais utilizados na diluição seriada.....45
Figura 12 – Esquema de diluição seriada.....45
Figura 13 – Placas de petri com alíquota de diluição seriada.....46
Figura 14 – Placa de Petri feita por diluição seriada após 20 h em estufa.....46
Figura 15 – Preparação do material de parede das cápsulas.....47
Figura 16 – Encapsulamento do microrganismo.....48
Figura 17 – Materiais para preparação dos corpos de prova.....49
Figura 18 – Fôrmas de moldagem para argamassa.....49
Figura 19 – Corpos de prova moldados.....50
Figura 20 – CPs desmoldados na câmara úmida.....50
Figura 21 – Prensa hidráulica com corpo de prova prismático.....51
Figura 22 – Imagem de fissura induzida.....51

Figura 23 – Quantidade de CPs moldados e os tratamentos realizados em cada CP.. 53
Figura 24 – CPs mergulhados em água e água com ureia 53
Figura 25 – CP em prensa hidráulica. 54
Figura 26 – Registro do acompanhamento visual realizado no decorrer dos 100 dias. 55
Figura 27 – Teste de durabilidade das cápsulas dentro dos CPs de argamassa.....58
Figura 28 – Cicatrização de fissura aos 42 dias.....59
Figura 29 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP com cápsula de alginato.....59
Figura 30 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP com cápsula de alginato combinado com amido.....60
Figura 31 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP com microrganismo livre.....60
Figura 32 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP de referência mergulhado na água. 61
Figura 33 – Cápsulas inteiras aos cem dias dentro de CP cilíndrico.....63
Figura 34 – CP rompido aos cem dias para avaliação visual.. 64

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Efeitos dos aditivos e das adições no concreto.....18
Quadro 02 - Resultados encontrados com as adições.....20
Quadro 03 - Classificação dos meios de cultura 26
Quadro 04 – Resumo de alguns métodos de contagens mais comuns 27
Quadro 05 - Estudos realizados com diferentes microrganismos 34
Quadro 06 – Quantidade de CPs moldados para cada tratamento.....52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Curvas de crescimento do microrganismo.....56
Gráfico 02 – Curvas de crescimento por log UFC/ mL. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição dos meios de cultura testados para crescimento microbiano.....38
Tabela 02 – Materiais de parede para encapsulamento do microrganismo.....38
Tabela 03 – Composição dos corpos de prova de argamassa 39
Tabela 04 – Resultados das resistências à compressão em CPs cilíndricos aos sete e aos cem dias. 62
Tabela 05 – Resultados das resistências à tração em CPs prismáticos aos sete e aos cem dias. 63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
1.1 Objetivos 13
1.1.1 Objetivo Geral 13
1.1.2 Objetivos Específicos 13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 15
2.1 Concreto 15
2.1.1 Composição 16
2.1.1.1 Agregados 16
2.1.1.2 Cimento Portland 16
2.1.1.3 Aditivos e adições 17
2.1.2 Patologias do concreto 18
2.2 Microrganismos 22
2.2.1 Crescimento e cultivo de microrganismos 23
2.2.2 Determinação do crescimento microbiano 26
2.2.3 Seleção de microrganismo para a biomineralização 28
2.3 Encapsulamento 30
2.4 Estudos sobre concreto autocicatrizável com adição de microrganismo 33
3. MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1 Material 37
3.2 Métodos 39
3.2.1 Determinação da composição do meio de cultura para crescimento do microrganismo 42
3.2.2 Determinação do material de parede das cápsulas e encapsulamento do microrganismo 47

3.2.3 Adição do microrganismo em corpos de prova de argamassa.....48
3.2.4 Indução de fissuras em corpos de prova de argamassa.....51
3.2.5 Acompanhamento da cicatrização das fissuras.....54
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....56
4.1 Meio de cultura e curva de crescimento microbiano.....56
4.2 Material de parede das cápsulas.....57
4.3 Cicatrização das fissuras.....58
4.4 Ensaios de resistência à tração e compressão.....62
5. CONCLUSÃO.....65
REFERÊNCIAS.....67

1. INTRODUÇÃO

Os materiais cimentícios são os mais empregados na construção civil em todo o mundo. Isso ocorre em função de sua boa resistência à compressão e por conta do seu baixo custo quando comparado a outros materiais utilizados. Em contrapartida, a resistência à tração é limitada, o que gera fissuras nas estruturas. Para compensar essa limitação, reforços com aço são comumente utilizados e, embora aumentem a vida útil e limitem a abertura de fissuras que surgem devido esforços de tração o aparecimento das fissuras, elas acabam aparecendo com o passar dos anos na maioria dos casos (TITTELBOOM; DE BIELE, 2013).

As fissuras surgem por diversos fatores que podem advir tanto das propriedades do material cimentício e das interações entre seus constituintes (MEHTA; MONTEIRO, 2014), quanto da má execução do projeto ou da precária utilização dos usuários após o elemento estrutural estar concluído (MAZER, 2008). Outro fator apontado como responsável pela deterioração das estruturas é a constante exposição aos microrganismos, às intempéries e aos gases da atmosfera. Isso pode causar danos à parte estrutural, aumentando o custo de manutenção, além da degradação dos componentes do concreto. Ademais, podem haver danos ambientais caso a edificação prejudicada seja, por exemplo, uma estação de tratamento de efluentes (BERTRON, 2014).

Para resolver o problema das fissuras em estruturas de concreto ou argamassa que surgem ao longo da vida útil de uma edificação, é necessário produzir mais cimento. O processo de fabricação do cimento é apontado como

um dos principais responsáveis pela emissão de gases na atmosfera devido ao alto consumo de energia durante sua produção (VIEIRA, 2017). Segundo Maury e Blumenschein (2012) este processo pode causar danos ambientais, bem como prejuízos para a saúde das pessoas envolvidas na produção. Os autores apontam ainda que 3% dos gases de efeito estufa são de responsabilidade da indústria do cimento, bem como 5% da emissão de CO_2. Para diminuir a produção de cimento e, consequentemente, a emissão de gases nocivos ao meio ambiente, alguns autores vêm propondo a autocicatrização do concreto (TITTELBOOM; DE BIELE, 2013; THIVYA; CHANDRASEKAREN, 2016; JONKERS; SCHLANGEN, 2007; WIKTOR; JONKERS, 2011).

Para regenerar as fissuras que surgem nas estruturas feitas com materiais à base de cimento, Tittelboom e De Biele (2013) citam a característica de autocicatrização autógena destes materiais, a qual se manifesta quando ocorrem, dentro da mistura já endurecida, reações que podem preencher os espaços vazios, por hidratação contínua dos próprios constituintes do concreto, ou por carbonatação do hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$). Eles mencionam ainda alguns estudos em que foram utilizados aditivos ou adições para tentar induzir esse processo, como a adição de fibras ou agentes cristalizantes à mistura de material cimentício fresco.

São conhecidas diversas técnicas utilizadas para reparar as fissuras no concreto, mas elas apresentam desvantagens como degradação ambiental e diferença de coeficiente de expansão entre os materiais cimentícios e os materiais utilizados. Em função disso, surgiu a proposta de utilização de bactérias precipitantes de carbonato de cálcio como uma alternativa de reparo não agressiva ao meio ambiente (THIVYA; CHANDRASEKAREN, 2016).

Jonkers e Schlangen (2007) apontam que, embora tenham resultados satisfatórios na autoreparação de fissuras, os aditivos e adições podem alterar a resistência característica destes materiais. Os autores propõem a utilização de microrganismos precipitadores de calcita[1] ($CaCO_3$) adicionados à mistura

[1] Calcita é uma variação do carbonato de cálcio, por isso ambos os termos serão mencionados em relação à formula $CaCO_3$.

fresca de concreto ou argamassa para reparar as fissuras sem comprometer o desempenho da estrutura. Wiktor e Jonkers (2011) observaram que ao adicionar os microrganismos diretamente à mistura, estes tinham sua atividade reduzida para apenas alguns dias, pois os componentes da mistura os esmagavam ou então a alta alcalinidade da pasta de cimento deixava-os inativos.

Vieira (2017) menciona o microencapsulamento do microrganismo, no qual o mesmo é envolto por uma cápsula, como uma forma de preservar o agente de cicatrização na fase da mistura dos materiais cimentícios, além de protegê-lo da alcalinidade existente no meio. A autora cita também a possibilidade de encapsular, junto com o microrganismo, nutrientes que auxiliarão no processo metabólico de produção de cristais. Bashir et al. (2016) reforçam a importância do encapsulamento do microrganismo quando mencionam que o pH da mistura, que pode chegar a 13, torna o ambiente altamente alcalino e a maioria das bactérias não sobrevive a ambientes com pH superior a 10.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de autocicatrização de corpos de prova de argamassa de cimento Portland por meio da adição do microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC6633.

1.1.2 Objetivos Específicos

a) Determinar a composição adequada do meio de cultura para o desenvolvimento do *B. subtilis* ATCC6633;
b) Determinar a composição necessária do material de parede para o encapsulamento do microrganismo *B. subtilis* ATCC6633;

c) Comparar o efeito do *B. subtilis* ATCC6633 encapsulado e não encapsulado no processo de reparação das fissuras induzidas em corpos de prova de argamassa quando mergulhados em água e água com ureia;
d) Verificar se há diferença de resistência mecânica entre corpos de prova com e sem cápsulas, bem como com o microrganismo livre, em ensaios de tração e compressão.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Concreto

O cimento mais comumente utilizado no mundo inteiro é o Cimento Portland. É, basicamente, uma mistura composta por cimento, água e agregados, podendo ainda receber o acréscimo de aditivos químicos ou adições como pigmentos, fibras, agregados especiais e adições minerais. Busca-se encontrar a proporção adequada entre os constituintes com a finalidade de alcançar as propriedades mecânicas, físicas e de durabilidade exigidas para o concreto, bem como as características de trabalhabilidade requeridas para facilitar transporte, lançamento e adensamento (HELENE; ANDRADE, 2010).

Metha e Monteiro (2014, p. 13) definem o concreto como “um material compósito que consiste, essencialmente, de um meio aglomerante no qual estão aglutinados partículas ou fragmentos de agregado”. Se o meio aglomerante utilizado na composição do concreto não for resistente à água, este é denominado concreto de cimento não-hidráulico. Se apresentar resistência à água, é chamado de concreto de cimento hidráulico, o qual é o mais utilizado.

Os autores mencionam ainda os materiais cimentícios como o mais consumido no planeta depois da água. Estimam uma média mundial de consumo de concreto em torno de 19 bilhões de toneladas métricas ao ano e

apontam pelo menos três motivos para justificar esse consumo expressivo: maior resistência à ação da água se comparado com outros materiais como madeira e aço; facilidade de moldagem em estado fresco, obtendo-se assim variadas formas e tamanhos dos elementos, uma vez que sua consistência plástica facilita o escoamento do material no interior das fôrmas; e a facilidade de obtenção dos materiais que compõem a mistura básica (água, agregado e cimento), os quais podem ser encontrados em praticamente todas as partes do planeta, tornando o concreto um material prático e de custo relativamente baixo (MEHTA; MONTEIRO, 2014).

2.1.1 Composição

2.1.1.1 Agregados

De acordo com a NBR 7211 (ABNT, 2005), agregados são os materiais granulares que compõem a mistura do concreto e são classificados como agregado miúdo ou graúdo de acordo com seu tamanho. Partículas de material de até 75 μm são consideradas agregado miúdo, como a areia, e partículas maiores que 4,75 mm são denominadas agregado graúdo, como a brita.

Helene e Andrade (2010) ressaltam que, por ocuparem boa parte do volume do concreto – de 65 a 70% aproximadamente - os agregados têm significativa importância no controle do volume do concreto depois de endurecido e na tendência à fissuração. Os autores complementam dizendo que as formas das partículas, seu tamanho e textura podem aumentar ou diminuir o atrito interno da mistura, reduzir o volume do concreto e manter o abatimento sem que suas propriedades sejam alteradas quando endurecido.

2.1.1.2 Cimento Portland

O cimento é um composto seco, pulverulento que, ao receber adição de água, desenvolve propriedades aglomerantes como resultado das reações químicas que ocorrem nessa mistura, também chamadas de reações de hidratação. É basicamente um pó cinza constituído de partículas cujas

dimensões podem ser de 1 a 50 μm. Os cimentos cujos materiais constituintes reagem com água formando um elemento rígido que, por sua vez, também é resistente à água, são chamados de cimentos hidráulicos. Como mencionado anteriormente, o mais comum utilizado é o cimento Portland, cuja produção ocorre através da pulverização de clínqueres, que são compostos por silicatos de cálcio hidráulico cristalinos e por uma porção mínima de sulfato de cálcio, além de calcário, adicionados durante a moagem (METHA; MONTEIRO, 2014). Segundo Pedroso (2009), o clínquer é o produto obtido após a exposição à altas temperaturas de uma mistura composta por rocha calcária e argila.

Helene e Andrade (2010) explicam que, ao se misturar água no cimento, é formada uma pasta relativamente fluida, e o que determinará a fluidez da pasta será o percentual de água adicionada. A pasta, ao se misturar com os agregados, envolve-os, independente de suas dimensões, produzindo um material que, em estado fresco, pode ser facilmente moldado. Se a pasta receber adição de agregados miúdos (geralmente areia) é denominada pasta de argamassa. Se, a essa mistura for adicionado agregados graúdo (como brita, por exemplo) ou algum aditivo, é chamada de concreto. Após algum tempo, que irá variar de acordo com o tipo de cimento utilizado, a mistura endurecerá e alcançará a resistência mecânica que lhe proporcionará o desempenho estrutural desejado.

2.1.1.3 Aditivos e adições

Além dos compósitos comuns do concreto – cimento, agregados e água – também existem os aditivos e as adições, que são incorporados na mistura com a finalidade de melhorar alguma propriedade específica do concreto desejada para a estrutura que será executada. O Quadro 01 mostra alguns exemplos de aditivos e de adições e seus efeitos no concreto.

Quadro 01 - Efeitos dos aditivos e das adições no concreto

Tipo de aditivo/adição	**Efeitos no concreto**
Aditivo químico	-modificar a pega -alterar a taxa de hidratação
Redutores de água	-aumentar a plasticidade da pasta
Incorporadores de ar	-facilitar a expansão/retração aumentando a durabilidade
Adições minerais	-retardar ou selar as fissuras

Adaptado de Mehta e Monteiro, 2014.

2.1.2 Patologias do concreto

Patologia é um termo usado na construção civil para designar as falhas que podem vir a surgir nos elementos estruturais. Segundo Mazer (2008) a natureza das fissuras pode ser: levantamentos e considerações equivocados feitos pelo projetista nos estudos preliminares; falta de mão-de-obra qualificada para execução da obra; falta de controle dos materiais utilizados e má utilização da estrutura, como abertura de vãos em paredes estruturais e a falta de manutenção da estrutura.

O autor afirma ainda que as patologias apresentam sintomas que permitem a identificação de sua ocorrência. Acrescenta que a patologia mais comum e que mais chama a atenção, mesmo das pessoas ditas leigas, é a fissuração. Ademais, conforme NBR 6118 (ABNT, 2003, p. 75) “a fissuração em elementos estruturais de concreto armado é inevitável, devido à grande variabilidade e à baixa resistência do concreto à tração”.

Segundo Mehta e Monteiro (2014), a fissuração é uma causa física da deterioração do concreto que surge, principalmente, pelas deformações que ocorrem de forma comum no concreto. Essas deformações podem ocorrer devido à variação volumétrica por conta do calor de hidratação ou da pressão causada pela cristalização dos sais que compõem a mistura, ambos processos que ocorrem durante o processo de endurecimento do concreto. O carregamento estrutural a que a estrutura fica sujeita durante a vida útil, bem

como a exposição aos extremos de temperatura[2], também são apontados como fatores causadores de fissura.

Se as fissuras não forem tratadas de forma eficaz e rapidamente, elas tendem a aumentar de tamanho, e o reparo acaba se tornando bastante oneroso. Além disso, as rachaduras também diminuem a vida útil da estrutura, pois acabam por facilitar a entrada de agentes prejudiciais que podem provocar corrosão na armadura. Pode-se afirmar, então, que as rachaduras são, geralmente, as responsáveis pelas falhas estruturais (THIVYA; CHANDRASEKAREN, 2016).

Autocicatrização da fissura

A autocicatrização de fissuras em materiais cimentícios pode ocorrer de três formas: através de reações entre os materiais componentes da mistura de concreto, com o acréscimo de aditivos cristalizantes, ou pela adição de microrganismos capazes de precipitar carbonato de cálcio.

Propriedade de autocicatrização do concreto

Segundo Tittelboom e De Belie (2013) o concreto possui propriedades autógenas de autocicatrização que podem se manifestar através de dois mecanismos que se desenvolvem em diferentes idades da estrutura: no concreto jovem, ocorre o fenômeno em que os minerais que formam o clínquer sofrem contínua hidratação; em idade mais avançada, ocorre pela carbonatação do hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) dentro do elemento estrutural. Tasca (2012) explica que a carbonatação ocorre no interior da estrutura quando gases externos, principalmente o CO_2, conseguem penetrar na mesma e reagem com hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$), produto das reações de hidratação do cimento, resultando em $CaCO_3$. Porém, de acordo com Ferreira (2013) a carbonatação acaba por consumir o $Ca(OH)_2$, bem como outros componentes do concreto que são responsáveis por manter a alcalinidade da mistura. Como resultado, o pH do concreto diminui significativamente, tornando o ambiente corrosivo tanto para os componentes do concreto como para as armaduras.

[2] Extremos de temperatura: (ciclos de congelamento-degelo ou exposição ao fogo)

Além disso, também é possível que reações do próprio concreto endurecido, como o inchaço da estrutura, resíduos na entrada de água ou mesmo partículas soltas durante o fissuramento do concreto resultem na cicatrização autógena. Todavia, essa capacidade é bastante limitada, pois, além de recuperar apenas pequenas fissuras, depende da disponibilidade de água e mostra-se difícil de controlar (TITTELBOOM; DE BIELE, 2013).

Aditivos Cristalizantes

Tittelboom e De Biele (2013) citam as tentativas realizadas para induzir a cicatrização autógena do concreto adicionando na mistura agentes que apresentem a capacidade de depositar cristais na fissura. Foram realizadas pesquisas substituindo uma porcentagem do cimento por materiais hidráulicos pozolânicos, como a cinza volante[3], ou materiais hidráulicos latentes, como escória de alto forno[4], em função de se conservarem desidratados mesmo em idades mais avançadas do concreto, possibilitando a hidratação contínua. O Quadro 02 mostra alguns dos resultados citados por eles.

Quadro 02 - Resultados encontrados com as adições

Adições	**Resultados encontrados**
Fibras de polietileno	Restringiram a largura da fissura e, assim, promoveram a cicatrização autógena.
Fibras de álcool polivinílico (PVA)	Induziram a maior eficiência de cicatrização. Isso foi atribuído ao fato de as fibras de PVA promoverem a deposição de produtos de cristalização.
Fibras de aço	Apresentaram menor eficiência de fechamento de fissuras, à medida que o aço começou a corroer no interior da fissura.
Fibras de polipropileno	Não houve relatos dos resultados.
Tendões de polímero retráteis	Amostras fissuradas foram aquecidas em um forno, resultando no encolhimento dos tendões de polietileno tereftalato (PET), seguido de fechamento de fissura.
Aditivos expansivos misturados com aluminato de sulfato de cálcio e aditivos cristalinos	Formação de cristais de entringita que preencheram a fenda. Observaram microtrincas devido à reação expansiva. Propuseram o encapsulamento dos agentes.

[3] Cinza volante: rersíduo da produção de carvão

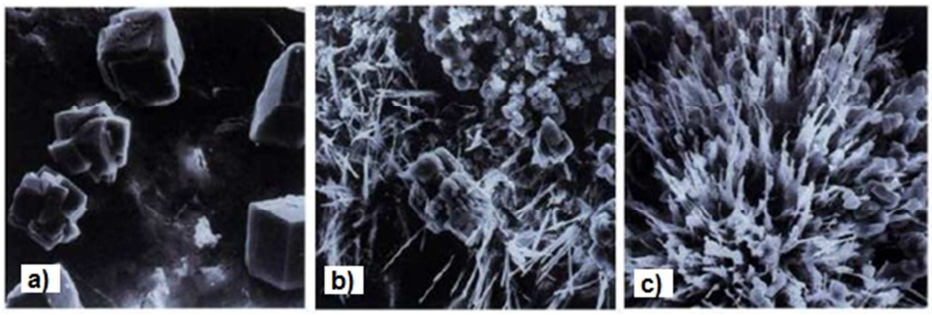
[4] Escória de alto forno: subproduta da indústria de aço e ferro

Materiais hidráulicos pozolânicos e latentes	Um percentual de cimento é substituído por cinzas volantes ou escória de alto forno. A cicatrização autógena ocorre por hidratação contínua.

Fonte: Adaptado de Tittelboom e De Biele (2013)

Tagaki (2013) cita o mecanismo de cicatrização química em que uma mistura de catalisador cristalino com agentes expansivos é adicionada à mistura ainda fresca do concreto. Quando em contato com água, os agentes reagem, expandindo e formando cristais que fecham os poros abertos pela fissura (Figura 01). Para melhor controlar essa reação, foi proposto que os agentes fossem encapsulados para evitar que a expansão se iniciasse durante o processo de hidratação do concreto. Contudo, a desvantagem citada pelo autor é a limitação do processo devido ao uso total do agente durante o processo de cristalização.

Figura 01 - Ciclo da reação do cristalizante: a) Cristais de hidróxido de cálcio aderidos às partículas cubicas. b) Início da formação de cristais após aplicação do tratamento químico. c) Cristais densos preenchendo os poros e capilaridades após 26 dias.



Fonte: Takagi, Júnior e Oliveira (2004)

De acordo com Ourives, Bilesky e Yokoyama (2009), os agentes cristalizantes podem ser adicionados tanto na superfície quanto na mistura do concreto. Eles reagem com água e com os componentes presentes no concreto, como o hidróxido de cálcio e alumínio, entre outros, formando e expandindo cristais nos poros e nas fissuras. Os autores sugerem que, após reagirem fechando a fissura e após a água presente ser totalmente consumida, os agentes voltam a ficar inativos até o próximo contato com água, quando o processo se reiniciará, fechando as novas fissuras que surgirem.

Microrganismos como agente de autocicatrização

Jonkers e Schlangem (2007) mencionam que o concreto recuperado por aditivos pode apresentar uma diminuição de resistência após a recuperação. Eles sugerem um mecanismo de autocicatrização baseado em agentes bacterianos incorporados ao concreto que não modificam suas características. Wiktor e Jonkers (2011) relatam que, embora a maioria dos agentes cicatrizantes citados sejam químicos, já existem estudos considerando a utilização de microrganismos precipitantes de calcita ($CaCO_3$) para a indução de autocicatrização autógena em estruturas de concreto. Citam ainda um sistema de autocicatrização desenvolvido onde dois componentes são utilizados: Esporos[5] bacterianos e compostos orgânicos, ambos incorporados à mistura do concreto.

Bashir et al. (2016) referem-se ao concreto que recebe adição de microrganismo como “bioconcreto” e explicam que o microrganismo, na presença de oxigênio (O_2), metaboliza os componentes orgânicos dissolvidos na H_2O, produzindo CO_2 que penetra no concreto através das fissuras, e ao reagir com o $Ca(OH)_2$ produz cristais de calcário ($CaCO_3$) que preenchem os poros e fecham as rachaduras. A multiplicação do microrganismo ocorre nos nutrientes que são adicionados à mistura e que fazem parte dos componentes orgânicos citados. O consumo de O_2 pelo microrganismo, além de auxiliar na produção de $Ca(CO_3)$, também reduz o teor de O_2 no concreto, criando um ambiente menos corrosivo.

2.2 Microrganismos

Tortora, Funke e Case (2012, p. 02) definem microrganismos como “formas de vida diminutas individualmente muito pequenas para serem vistas a olho nu” que podem ser classificadas como bactérias, fungos, protozoários e vírus e que têm um papel importante no equilíbrio da vida no planeta. Segundo Bertron (2014), os microrganismos estão presentes em todos os lugares onde há vida se desenvolvendo. O funcionamento do seu metabolismo é o que dá as características de cada tipo de microrganismo, ou seja, a forma como se

[5] Esporos são estruturas de resistência produzidas por alguns gêneros de bactérias.

desenvolvem, crescem, reproduzem-se e reagem tanto com o meio como com os nutrientes. São necessárias fontes de energia e de carbono para que a biomassa microbiana seja criada através de uma sequência de reações redox[6]. As características do meio onde se desenvolve também são responsáveis por determinar as características do microrganismo.

De acordo com Pelczar, Chan e Krieg (1997) é possível encontrar microrganismos por todo o planeta Terra e não há outro organismo com a capacidade de alterar a química da matéria. Tortora, Funke e Case (2012) ressaltam ainda que a importância dos microrganismos vai desde a composição da base da cadeia alimentar em ambientes aquáticos, passando pela degradação de detritos e incorporação de nitrogênio em compostos orgânicos no solo, além de participarem da *fotossíntese*, "processo gerador de oxigênio que é crucial para a vida na Terra". Mencionam que essas minúsculas formas de vida fazem a reciclagem química entre o solo, a terra, os seres vivos e o ar. Também são responsáveis pela digestão dos alimentos, auxiliam no metabolismo e na coagulação do sangue. As indústrias farmacêutica, química e alimentícia utilizam microrganismos na fabricação de diversos produtos. Segundo Neville (2016), a construção civil também pode se beneficiar do uso de bactérias adicionadas ao concreto para que estas selem as fissuras ao reagirem com uma fonte de carbono orgânico.

2.2.1 Crescimento e cultivo de microrganismos

O crescimento microbiano é composto de quatro fases (Figura 02): fase Lag, onde o microrganismo se adapta ao meio onde está inserido; fase exponencial, onde as células se multiplicam e, assim, a população de microrganismos cresce; a fase estacionária, onde a multiplicação celular acontece na mesma proporção em que algumas células começam a morrer; e a fase de declínio onde o número de células mortas ultrapassa o de células vivas.

[6] Redox é uma reação química onde um elemento perde elétrons e o outro os recebe, modificando o estado de oxidação.

Figura 02 – Fases da curva de crescimento

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), as colônias formadas pelos microrganismos tendem a crescer rapidamente. O crescimento mencionado não se refere a tamanho físico, mas sim a números de células, pois os microrganismos se multiplicam. As condições dependem de fatores físicos (temperatura, pH e pressão osmótica) e químicos (nutrientes), e o entendimento das condições necessárias para que esse crescimento ocorra é importante tanto para inibi-lo quanto para estimulá-lo, conforme necessário. Os autores explicam ainda os fatores físico-químicos:

● *Temperatura:* para cada espécie de microrganismo há uma temperatura de crescimento mínima, uma ótima e uma máxima, e existe uma classificação em relação a essas temperaturas: os psicrófilos (de 0 ºC até 30 ºC), os mesófilos (entre 25 ºC e 40 ºC) e os termófilos (entre 45 ºC e 60 ºC).

● *pH:* o pH[7] faz referência à acidez ou à alcalinidade de uma solução. De forma geral, o crescimento dos microrganismos ocorre de forma melhor na neutralidade (entre pH 6,5 e 7,5).

● *Água:* os microrganismos retiram a maior parte de seus nutrientes da água e, por isso, necessitam de água para crescer.

● *Pressão osmótica:* a pressão osmótica ajuda a controlar o fluxo de água que atravessa a membrana da célula microbiana.

● *Carbono:* além da água, o carbono é um dos fatores essenciais para o crescimento microbiano. Sua presença é essencial em toda célula viva.

● *Associações entre nitrogênio, enxofre e fósforo*: elementos necessários para o crescimento de microrganismos: o nitrogênio forma os aminoácidos das

[7] pH: potencial de Hidrogênio

proteínas; o enxofre sintetiza[8] os aminoácidos que contêm enxofre; e o fósforo essencial para a produção de proteínas dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) e dos fosfolipídeos da membrana celular.

● *Elementos de traço*: são elementos minerais que participam do crescimento do microrganismo em quantidades muito pequenas e são necessários para algumas funções de certas enzimas.

● *Atmosfera*: os microrganismos que utilizam de oxigênio para produzir energia são chamados de aeróbios e os que não conseguem sobreviver na presença de oxigênio são classificados como *anaeróbios.*

Madigan, Martinko e Parker (2004) definem os fatores químicos como os responsáveis pela nutrição química do microrganismo e os dividem em macronutrientes e micronutrientes, que devem estar disponíveis em um meio de cultura.

- *Macronutrientes:* consumidos em maior quantidade. Trabulsi (1998) menciona a importância do carbono e do nitrogênio, principais macronutrientes, afirmando serem elementos indispensáveis ao crescimento celular. Tortora, Funke e Case (2012) acrescentam ainda o oxigênio como um macronutriente importante, utilizado pelos microrganismos aeróbios para produzir energia.
- *Micronutrientes:* Madigan, Martinko e Parker (2004) mencionam os metais como os principais micronutrientes e ressaltam que são utilizados em pequenas quantidades, sendo que, muitas vezes, não há necessidade de adicioná-los aos meios de culturas laboratoriais.

Para crescimento dos microrganismos em laboratório, é necessário criar um meio onde os fatores acima mencionados estejam disponíveis para favorecer esse crescimento. Os meios que fornecem esses nutrientes aos microrganismos se chamam meios de cultura e devem ser compostos de acordo com as necessidades do microrganismo a crescer. A autora ressalta que, depois de muitas experiências realizadas ao longo dos anos, os microbiologistas conseguiram identificar quais nutrientes a maioria dos microrganismos precisa (BLACK, 2002). Segundo Tortora, Funke e Case (2012) o meio de cultura é importante para que o organismo consiga sintetizar os fatores orgânicos de crescimento, mencionados anteriormente.

[8] Sintetiza: se refere a produzir as proteínas

Os meios de cultura podem ser classificados pela sua composição, consistência e preparo, como mostrado no Quadro 03.

Quadro 03 - Classificação dos meios de cultura

Classificação	**Tipo de meio**	**Definição**
Composição	Meio quimicamente definido	Formulado com composição dos ingredientes conhecida.
	Meio complexo	Não é possível detalhar sua composição
Consistência	Meio líquido	Os nutrientes estão dissolvidos em meio aquoso
	Meio semi-sólido	Além dos nutrientes tem 0,3% de concentração ágar[9]
	Meio sólido	Nutrientes e 1,5% ágar como agente gelificante
Preparo	Meio pronto para uso	Meio comercializado já pronto para uso
	Meio desidratado	Formulação completa ou semi completa, sendo necessário um preparo em laboratório para utilização.
	Meio formulado	Totalmente formulado em laboratório a partir dos ingredientes individuais

Fonte: RIBEIRO e STELATO, 2011

2.2.2 Determinação do crescimento microbiano

Pelczar Jr, Chan e Krieg (1997) citam como métodos mais comuns para contagem de microrganismos a quantificação de células crescidas e a determinação do peso celular. O Quadro 04 mostra os métodos de contagem mais comuns.

[9]Ágar: substância que, ao contato com água, se transforma em um gel.

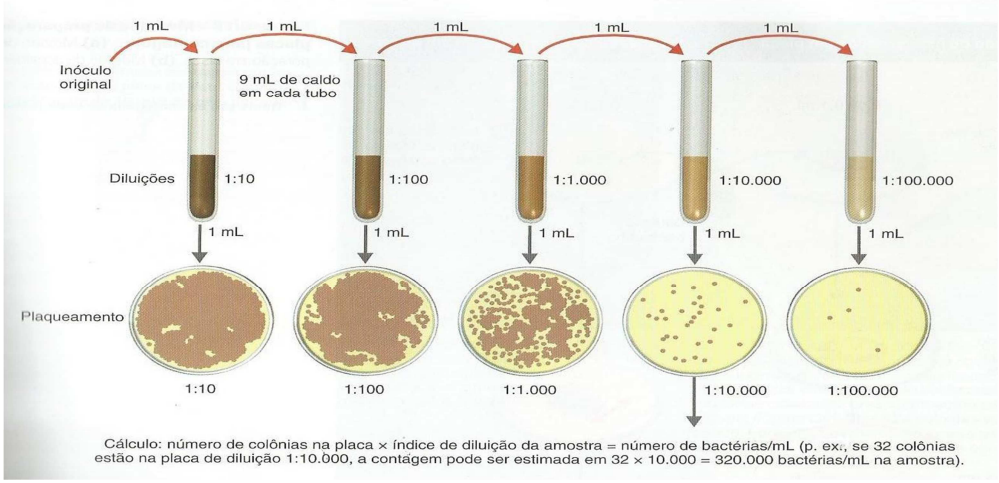
Quadro 04 – Resumo de alguns métodos de contagens mais comuns

Método	**Aplicações**	**Expressão do crescimento**
Contagem microscópica	Número de células em vacinas, leite e culturas	Número de células por mL
Contagem celular eletrônica	Número de células em vacinas, leite e culturas	Número de células por mL
Contagem em placa	Número de células em vacinas, culturas, solo, alimentos	Colônia – unidades formadoras por mL ou g
Membrana filtrante	Número de células em vacinas, culturas, solo, alimentos	Colônia – unidades formadoras por mL ou g
Turbidez	Ensaio microbiológico	Não informado pelos autores
Conteúdo de Nitrogênio	Medida indireta da massa celular	mg de nitrogênio por mL
Peso seco	Medida indireta da massa celular	mg de células por mL
Produtos metabólicos	Ensaios microbiológicos, medidas indiretas de crescimento	Quantidade de produto por mL

Fonte: Pelczar Jr, Chan e Krieg (1997)

Tortora, Funke e Case (2012) mencionam a contagem em placas como o método de contagem mais utilizado. Esse método leva em consideração apenas as células viáveis, e é indicado que se faça a contagem de um número limitado de colônias para evitar que algumas células sejam reprimidas e não se desenvolvam. Os autores apontam que a recomendação é que se faça a contagem de placas com 25 a 200 colônias. Para garantir um número reduzido de colônias nas placas, o inóculo inicial passa pelo processo chamado de diluição seriada (Figura 03).

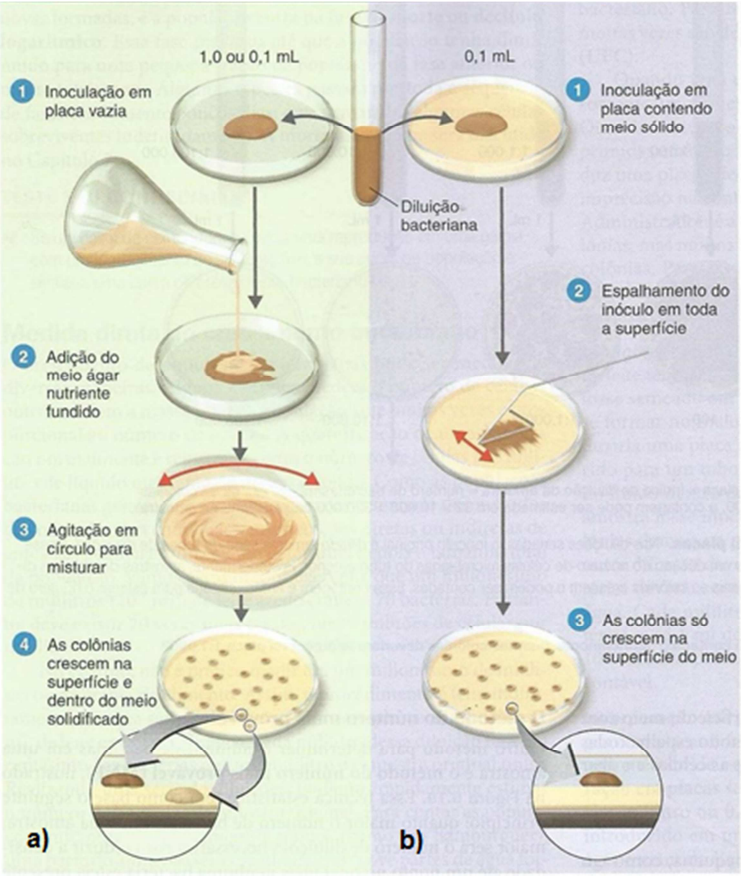
Figura 03 - Diluição seriada para a contagem microbiana em placas



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012)

Por fim, a contagem dos microrganismos é feita pelo método de profundidade em placas ou pelo método de espalhamento em placas, conforme mostra a Figura 04.

Figura 04 - Métodos de contagem: a) profundidade em placas; b) método de espalhamento em placas



Fonte: Fonte: Tortora, Funke e Case (2012).

2.2.3 Seleção de microrganismo para a biomineralização

A grande maioria dos organismos vivos tem a capacidade de depositar minerais. A deposição varia de acordo com o metabolismo de cada organismo e o meio em que ele está inserido. Por conta disso, existem numerosas e diversificadas estruturas biomineralizadas na natureza. A biomineralização acontece quando, em uma matriz orgânica, ocorre a precipitação de materiais orgânicos. Esse processo biológico acontece tanto em meio aquático quanto terrestre há milhares de anos e vem contribuindo para a formação geológica da terra. Durante milhões de anos, enquanto evoluíam, os organismos usaram seu

metabolismo e minerais existentes no meio para sobreviver (VIEIRA, 2017). Bashir et al. (2016, p. 02, tradução livre) definem ainda a biomineralização como “uma precipitação biológica na qual os organismos criam um microambiente local, fornecendo precipitação química de fases minerais extracelularmente”.

É possível encontrar microrganismos precipitantes de carbonato de cálcio no meio aquático e no solo, já que esse é um fenômeno bastante comum na natureza. Nas reações bioquímicas de biomineralização, o cátion preferencial é o cálcio em função de sua importância para o metabolismo celular dos seres vivos. O carbonato de cálcio é biologicamente induzido na natureza, onde pode ser encontrado na forma de cristais de calcita ou de aragonita (VIEIRA, 2017).

Existe uma enorme quantidade de espécies de bactérias que habitam o solo e que têm como função reciclar uma grande quantidade de minerais. Quando em condições adequadas, a grande maioria das bactérias é capaz de provocar a precipitação de carbonato de cálcio. Essas condições, segundo Vieira (2017, p. 26) são: “(i) a concentração de íons de cálcio; (ii) a concentração de carbono dissolvido; (iii) o pH do meio, que deverá ser alcalino; (iv) e a disponibilidades de vazios para nucleação que permitam o alojamento de microrganismos”. A autora explica ainda que:

> A habilidade das bactérias em influenciar o pH do meio, o tornando mais alcalino, é a principal característica deste processo. O aumento da alcalinidade do meio causa alterações no potencial eletronegativo da membrana da superfície celular, favorecendo mudanças no metabolismo bacteriano. A modificação do potencial-ζ (potencial Zeta), que é a carga da superfície da bactéria, poderia explicar a deposição de cristais de carbonato de cálcio (carga positiva) sobre a membrana que recobre o corpo das bactérias (carga negativa). A observação deste fenômeno sugere que a bactéria, como forma de defesa a adsorção de cálcio, induz a precipitação de carbonato de cálcio sobre a superfície da parede celular (VIEIRA, 2017, p.26).

Para a seleção de bactérias para a biomineralização, é importante que a escolha baseie-se na capacidade do microrganismo produzir carbonato. Também é necessário levar em consideração que, para que precipitem, as bactérias necessitam de nutrientes, os quais podem ser adicionados à mistura da argamassa ou concreto. Outra possibilidade é mergulhar a amostra

endurecida do concreto com a adição de microrganismo, após fissurada, em uma solução nutritiva (DE BELIE, 2016).

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem uma estrutura celular simples: parede celular, sem núcleo, composta de estruturas externas, envelope celular e estruturas internas que determinam a capacidade da bactéria de se desenvolver. São classificadas como bactérias Gram-positivas, medindo entre 1 e 10 mm, e possuem uma carga negativa que possibilita a atração dos cátions como o cálcio, favorecendo o mecanismo de cimentação microbiana de bactérias ureolíticas (WONG, 2015).

Alguns autores mencionam estudos onde o *Bacillus subtilis* é citado como um microrganismo que, quando em meios adequados, é capaz de precipitar $CaCO_3$. A precipitação ocorre pela capacidade de hidrolisar a ureia em carbonato (CO_3^{-2}) e pela presença de cálcio (Ca^{+2}), utilizado como elemento de ligação. Comentam ainda que o microrganismo pode aumentar a resistência do concreto quando incorporado à mistura (PRADEEPKUMAR et al., 2015; NUGROHO; SATYARNO; SUBYAKTO, 2015; WEI et al., 2015).

Sob condições de falta de nutrientes ou outras condições de estresse, o *B. subtilis* cria estratégias para sobreviver nesse meio como, por exemplo, o desenvolvimento de endósporos[10] que resistem ao estresse (JOSHI; KUMTHEKAR; GHODAKE, 2016). Black (2002) explica que as bactérias capazes de criar endósporos dentro das células mãe geralmente o fazem quando algum nutriente torna-se limitado e a função dos endósporos é proteger o microrganismo e prolongar sua sobrevivência, uma vez que os endósporos sobrevivem a longos períodos em condições consideradas inadequadas.

2.3 Encapsulamento

Menezes et al. (2013) definem a microencapsulação como o recobrimento de um material, formando cápsulas em miniatura que propiciam o controle na liberação do seu conteúdo. Os autores mencionam que, de modo

[10] Endósporos: são células dormentes formadas intracelularmente com a função de estocar o genoma bacteriano em períodos de stress, garantindo a sobrevivência do microrganismo nestes períodos.

geral, os propósitos buscados com a microencapsulação são: possibilidade de fazer um líquido comportar-se como sólido, separação de materiais reativos, redução de toxicidade do material ativo, controle da liberação do material, redução da volatilidade de líquidos, encobrimento do gosto de componentes amargos, aumento do *shelf life*[11] e proteção contra luz, água e calor.

O tamanho apresentado pelas microcápsulas pode variar de frações de mícron até vários milímetros. Seu formato varia de acordo com os materiais e métodos utilizados para o encapsulamento. O material externo é denominado agente encapsulante e geralmente é constituído por polímeros como alginato, quitosana ou gelatina, sendo que existem diversas técnicas de microencapsulação. O ingrediente interno é o material ativo que se busca preservar das condições adversas (MENEZES et al., 2013).

A encapsulação por extrusão, método a ser utilizado neste estudo, utiliza hidrocolóides[12] como material encapsulante, o qual é homogeneizado com o material a ser encapsulado. Depois de misturados, a solução é gotejada através de um bico em uma solução solidificante, como cloreto de cálcio. As cápsulas se formam, geralmente, com tamanhos entre 2 e 5 mm. É considerado um método simples e de baixo custo (CAVALHEIRO et al., 2015).

Materiais de parede ou agentes encapsulantes

Como mencionado anteriormente, a produção de microcápsulas vem sendo realizada de variadas formas. O material geralmente apresenta estrutura esférica recoberta por uma membrana sólida ou sólida/líquida que apresente resistência, permeabilidade parcial e variação de diâmetro entre alguns microns e 1 mm. O material escolhido para o revestimento pode ser projetado para liberar gradualmente o componente da cápsula (MENEZES et al., 2013).

Alginato

Dentre as opções de materiais utilizados como material de parede, Blandino, Macias e Cantero (1999) mencionam que a técnica de

[11] Shelf life: tempo de armazenamento de um produto/alimento
[12] Hidrocolóide; também chamados de goma, são polímeros de carboidrato

encapsulamento dos biocatalisadores[13] em cápsulas de gel de alginato de cálcio, tem ampla aplicação por apresentarem biocompatibilidade, simplicidade e baixo custo. Citam ainda, como principal vantagem desta técnica, o fato de o biocatalisador, por estar dentro da cápsula central, manter contato com o substrato da maneira adequada.

Em função de ter propriedades para a formação de nanocápsulas, o alginato tem sido amplamente estudado para produzir partículas entre 100 e 2 mm. Combinações com outros materiais como alginato de polietilenoglicol acrilato (alginato-PEGAc) e compósitos de colágeno também vem sendo investigadas especialmente nas áreas biotecnológicas e da biomedicina (FOOD INGREDIENTES, 2013). Pereira et al. (2008, p. 98) mencionam ainda características como “solubilidade à temperatura ambiente, habilidade de gel permeável com o cloreto de cálcio, boa propriedade gelificante, baixo custo, facilidade de uso e ausência de toxicidade” para justificar a ampla utilização do alginato como agente encapsulante.

Por fim, Menezes et al. (2013) mencionam que “o sistema cálcio-alginato encapsulando culturas celulares protege de maneira mais efetiva” visto que as bactérias encapsuladas tendem a sobreviver por mais tempo que as não encapsuladas.

Amido

Segundo Azeredo (2005), o amido é encontrado em grande quantidade na natureza e, por isso, seu custo se torna baixo. Quando *in natura,* na forma granular, o amido mostra-se insolúvel ao entrar em contato com água. Porém quando exposto ao calor, em uma temperatura suficiente, é possível transformá-lo em uma pasta com capacidade de produzir “filmes de boas propriedades mecânicas”. Em contrapartida, as soluções à base de amido tendem a apresentar uma elevada viscosidade para os processos de encapsulação e “não possui grupos hidrofóbicos, não exercendo, portanto, praticamente nenhum efeito estabilizante de emulsões, a não ser pelo aumento da viscosidade” (Azeredo, 2005, p. 92). Considerando a permeabilidade do

[13] Biocatalisadores: catalisador das reações bioquímicas dos seres vivos.

alginato, citada anteriormente, associá-lo ao amido, para formação do material de parede, pode trazer benefícios, visto que sua viscosidade reduzirá a permeabilidade da microcápsula.

2.4 Estudos sobre concreto autocicatrizável com adição de microrganismo

A autocicatrização do concreto traria enormes benefícios, uma vez que nem sempre as fissuras são visíveis ou de fácil acesso. Sem mencionarmos ainda os custos indiretos em função da produtividade e os transtornos que podem vir a surgir no entorno da obra devido à necessidade de utilização de máquinas ou caminhões para os reparos (TITTELBOOM; DE BIELE, 2013). Para que o concreto seja considerado auto-regenerador é necessário que as bactérias envolvidas no processo sejam capazes de transformar os nutrientes orgânicos adicionados à mistura em cristais de calcita inorgânicos e insolúveis e que estes fechem as fissuras (BASHIR et al., 2016).

Em estudos anteriores foram comparados corpos de prova de argamassa com adição de bactérias e sem adição de bactérias. Nos exemplares onde havia microrganismos foi possível retirar amostras de calcita precipitada nas superfícies das fissuras. Nos demais não foi possível retirar essas amostras, pois a precipitação foi mínima (WIKTOR; JONKERS, 2011).

Nos estudos publicados sobre o uso de microrganismos para a autocicatrização do concreto é possível observar que todos mencionam a precipitação de $CaCO_3$ como a principal vantagem do processo. Também há uma variedade de propostas, sendo que em cada uma delas um tipo de bactéria é utilizado com o propósito citado (THIVYA; CHANDRASEKAREN, 2016). O Quadro 05 relaciona os microrganismos, os meios de cultura e as condições de crescimento utilizados pelos autores. Em todos os estudos os resultados foram comparados à amostra controle (corpos de prova sem adição de microrganismos).

Quadro 05 - Estudos realizados com diferentes microrganismos

Microrganismo	**Composição do meio de cultura**	**Condições de crescimento**	**Autores**
Sporosarcina pasteurii DSM33; *Bacillus cohnii* DSM6307*;* *Bacillus halodurans* DSM497 *e* *Bacillus pseudofirmus* DSM8715	0,2 g/L de NH_4Cl, 0,02 g/L de KH_2PO_4, 0,225 g/L de $CaCl_2$, 0,2 g/L de KCl, 0,2 g/L de $MgCl_2$, $_6H_2O$, 1 mL/L de solução de oligoelementos SL12B, 0,1 g/L de extrato de levedura, 6,45 g/L sal trissódico ácido e 8,4 g/L de bicarbonato de sódio	O pH do meio foi de 9,2. Culturas foram incubadas em frascos Erlenmeyer de 2 L em uma mesa agitadora a 150 rpm. O crescimento foi monitorado por microscopia	JONKERS e SCHLANGEN (2007).
Bacillus subtilis IFO13719	5 g/L de peptona, 5 g/L de NaCl e 3 g/L de extrato de levedura.	As bactérias foram cultivadas em meio líquido, com ureia e acetato de cálcio, em tubo de reação estéril selado.	NUGROHO, SATYARNO e SUBYAKTO (2015).
Bacillus subtilis JC3	Peptona, NaCl, extrato de levedura.	A cultura foi mantida em *slants* de ágar nutriente e as inclinações foram incubadas a 37 ºC.	*PRADEEDKUMAR et al. (2015).*
Bacillus sphaericus LMG22557	20 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de ureia.	Cultura foi incubada a 28 ºC. Os esporos colhidos por centrifugação e ressuspensos em solução salina estéril (NaCl 8,5 g/L) que foi pasteurizada.	WANG et al. (2015).
Bacillus subtilis ATCC6633	Plate Agar Count – PCA[14]; 20 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de ureia P.A; 50 g/L cloreto de cálcio dihidratado	Placas de petry foram mantidas em estufa de cultura a temperatura de 28 ºC ± 2 ºC.	*VIEIRA (2017).*

Fonte: Autores citados

[14] Composição: 5,0 g/L de peptona de caseína; 2,5 g/L de extrato de levedura; 1,0 g/L de D(+) glucose; -14,0 g/L de Agar-agar.

Jonkers e Schlangen (2007) adicionaram os microrganismos no concreto de duas formas distintas: adicionando os mesmos na água da mistura do concreto e imobilizando os microrganismos em cimento-pedra. Realizaram testes de verificação de esporos nas células incorporadas ao cimento-pedra, testes de resistência à tração e compressão, além da verificação da capacidade de precipitação de $CaCO_3$. Os resultados mostraram que apenas o *S. pasteuri* não produziu esporos, enquanto os outros três microrganismos, *B. cohnii, B. halodurans e B. pseudofirmus*, produziram esporos abundantemente. Os resultados de resistência não mostraram diferenças significativas em comparação aos corpos de prova de controle. Por fim, verificaram a precipitação de cristais semelhantes à calcita na superfície das amostras quando estas foram colocadas em meio contendo extrato de peptona e levedura.

Nugroho, Satyarno e Subyakto (2015) utilizaram cinza volante pulverizada impregnada com os microrganismos preparados em meio líquido nutriente. Foram adicionadas diferentes concentrações de *B. subtilis* nos corpos de prova para observar as implicações no teste de compressão. Também foram realizados testes de flexão e permeabilidade, além da verificação da capacidade de fechar as fissuras induzidas de 0,2 mm. O corpo de prova foi submerso em uma solução líquida com ureia e acetato de cálcio por 60 dias. Nos resultados os autores concluem que a concentração de bactérias de 10^5 células/mL melhorou a resistência a compressão e diminuiu a permeabilidade do corpo de prova. Nos testes de flexão verificaram recuperação de rigidez após o fechamento das fissuras pelos microrganismos. Também verificaram que o fechamento de fissuras podia ser observado após 7 dias.

Pradeedkumar et al. (2015) imobilizaram o microrganismo livre em terra de diatomácea que foi adicionada à mistura do concreto. Em testes de resistência à compressão, os resultados foram de aumento de resistência. Mencionam ainda que, embora o microrganismo não tenha sido encapsulado, as fissuras fecharam. Porém, não fica claro no estudo se o fechamento ocorreu

pela ação do microrganismo ou pela capacidade que o concreto tem de autocicatrizar-se.

Wang et al. (2015) utilizaram alginato de sódio modificado como material de parede das cápsulas. Foram realizados testes para verificar germinação e a ativação da enzima urease pelos esporos, a precipitação de $CaCO_3$, a capacidade do alginato de segurar os esporos dentro da cápsula, capacidade de absorção do hidrogel, influência do amido modificado nas propriedades mecânicas da argamassa e atividade bacteriana na argamassa. Os resultados comprovaram a viabilidade dos esporos e o consumo de ureia por estes após o encapsulamento, além de análises termogravimétricas que atestaram a precipitação de $CaCO_3$. Também foi constatado que alguns esporos saíram da cápsula, mas não em quantidade significativa, e que o hidrogel a base de alginato consegue absorver a umidade do ambiente, o que é benéfico para a atividade bacteriana. Por fim, os resultados em relação às propriedades do concreto mostram uma ligeira redução de trabalhabilidade e da concentração de oxigênio.

Vieira (2017) mergulhou os corpos de prova de concreto em um recipiente com capacidade para 5 L onde havia solução nutriente. Logo após adicionou os microrganismos e, 48 h depois, as amostras foram retiradas e mantidas em temperatura ambiente para secagem. Os testes realizados foram para verificação de precipitação de $CaCO_3$. Como resultados a autora descreve a presença de cristais de calcita na superfície dos corpos de prova.

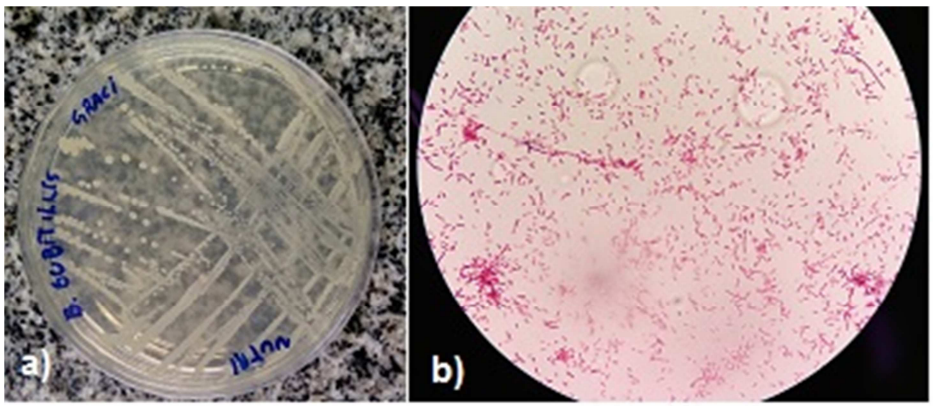
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os materiais constituintes do estudo foram: microrganismo, nutrientes para o meio de cultura, materiais de parede para a preparação das cápsulas e os componentes do concreto para os corpos de prova.

O microrganismo utilizado para o estudo foi o *Bacillus subtilis* ATCC6633 (Figura 05), cedido pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Taquari – Univates.

Figura 05 – *B. subtilis* ATCC6633: a) Colônias em placa de Petri; b) Imagem em microscópio (ampliação de 1000x)



Fonte: Autora, 2019.

Os nutrientes utilizados para preparação do meio de cultura líquido para crescimento microbiano estão apresentados na Tabela 01 e compõem o meio de cultura Luria-Bertani (LB). Foram utilizadas duas composições deste meio para comparar e determinar em qual delas o microrganismo cresceria melhor.

Para o meio de cultura sólido foi acrescentado ágar bacteriológico (15 g/L) aos componentes do meio líquido.

Tabela 01 – Composição dos meios de cultura testados para crescimento microbiano

Meio de Cultura 1 (MC1)		Meio de Cultura 2 (MC2)	
Extrato de Levedura	5 g/L	Extrato de Levedura	5 g/L
Cloreto de Sódio (NaCl)	10 g/L	Cloreto de Sódio (NaCl)	10 g/L
Peptona	10 g/L	Triptona	10 g/L

Fonte: adaptado de Nugroho, Satyarno e Subyakto (2015).

As composições dos materiais de parede para preparação e formação das cápsulas utilizadas para o encapsulamento do microrganismo estão na Tabela 02.

Tabela 02 – Materiais de parede para encapsulamento do microrganismo

Composição 1		Composição 2	
Alginato	1,5 % (m/v)	Alginato	1,5 % (m/v)
-	-	Amido	1,0 % (m/v)

Fonte: Martin et al. (2013).

O cimento escolhido para este estudo foi o Cimento Portland de Alta Resistência Inicial (CP V – ARI) que tem como característica principal o alcance de elevada resistência logo nos primeiros dias de aplicação. Isso ocorre por ser adicionada uma dosagem específica de calcário e argila na produção do clínquer e também pelo refinamento do cimento. O agregado utilizado foi areia natural e a água disponibilizada pela Corsan. O traço unitário utilizado foi 1: 2,4: 0,48 sendo, cimento, areia e água respectivamente. O traço em massa está indicado na Tabela 03.

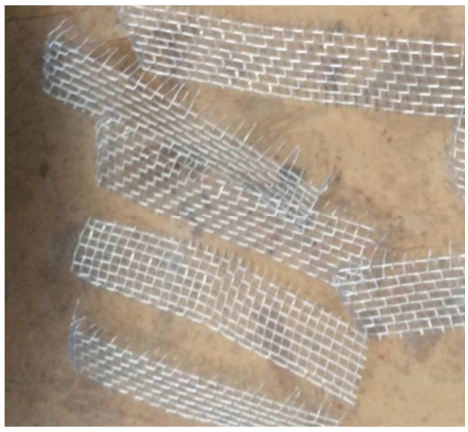
Tabela 03 – Composição dos corpos de prova de argamassa

Componente	**kg/m³**
Cimento	384
Areia	929
Água	188

Fonte: Adaptado de Wiktor e Jonkers (2011).

Para a indução das fissuras nos corpos de prova foi utilizada uma tela metálica de malha 0,5 x 0,5 cm (Figura 06) para evitar o rompimento dos mesmos no momento da aplicação de carga.

Figura 06 – Tela metálica utilizada no interior dos corpos de prova de argamassa



Fonte: A autora (2019).

3.2 Métodos

Os métodos utilizados para crescimento microbiano envolveram a determinação do meio de cultura mais adequado através de medida de densidade ótica (DO) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm e técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento pelo método de superfície.

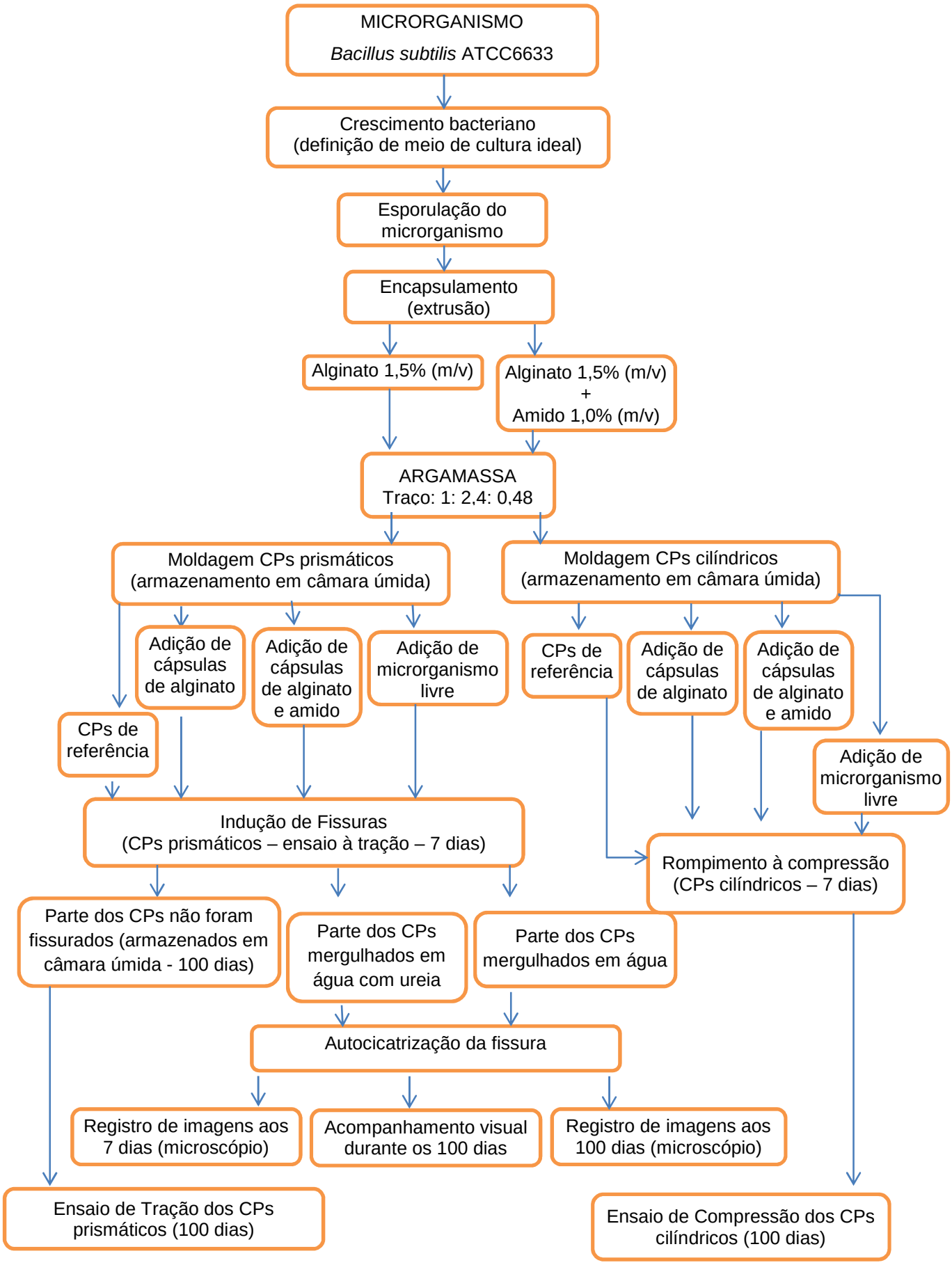
Para o encapsulamento do microrganismo foi utilizado o método de extrusão e foram utilizadas duas composições de materiais de parede, conforme descrito no item 3.1.

Os corpos de prova (CPs) de argamassa foram preparados seguindo a NBR 7215 (ABNT, 1996). As cápsulas foram adicionadas durante a moldagem para evitar que fossem danificadas durante a mistura da argamassa. As mesmas foram colocadas no centro dos corpos de prova prismáticos, pois é a região onde a fissura surge nos ensaios de resistência à tração.

A indução das fissuras ocorreu aos sete dias e logo após os CPs foram submersos em dois tratamentos: água e água com ureia, para posterior comparação. As fissuras foram acompanhadas visualmente e por imagens em microscópio Metalográfico Invertido, cedido pelo laboratório de Engenharia Mecânica da Univates, para observar a cicatrização das mesmas.

O fluxograma (Figura 07) ilustra de forma resumida o trabalho desenvolvido.

Figura 07 – Fluxograma resumido do desenvolvimento do trabalho



3.2.1 Determinação da composição do meio de cultura para crescimento do microrganismo

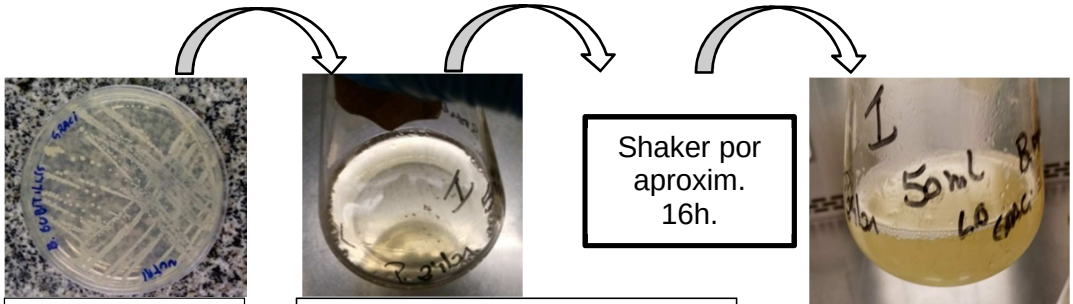
Para determinação do meio de cultura para crescimento do *B. subtilis* ATCC6633 foram avaliadas duas composições, conforme mostrado anteriormente na Tabela 01. Os métodos descritos a seguir foram realizados para as duas composições e em triplicata de experimentos.

Os meios foram preparados misturando-se os componentes com água deionizada. O meio líquido foi colocado em frascos de erlenmeyer e verificado o seu pH, em função do microrganismo escolhido apresentar crescimento em ambiente com pH≅7,0. Foram então esterilizados em autoclave a 121 ºC por 15 min. O mesmo procedimento foi realizado para o meio sólido onde foi acrescentado ágar bacteriológico.

Para preparação do pré-inóculo, num frasco erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura, foram adicionadas, com o auxílio de uma alça de inoculação previamente esterilizada, algumas colônias do microrganismo retiradas da placa de Petri. Após, este foi colocado em uma incubadora de agitação orbital (*shaker*) para ativação do microrganismo, onde permaneceu por aproximadamente 16 h agitando a 250 rpm, à temperatura de 37 ºC, como mostra o esquema na Figura 08. Ao final do período foi possível confirmar a ocorrência da multiplicação celular devido a turbidez do meio de cultura.

Um frasco contendo meio de cultura sem adição do microrganismo foi reservado para fins de medição da densidade ótica conforme descrito a seguir.

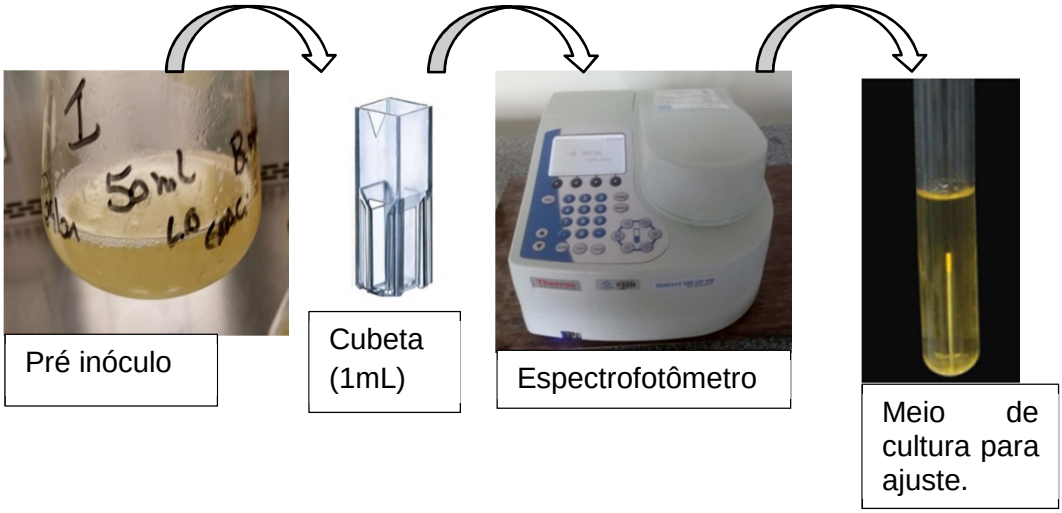
Figura 08 – Preparação do pré-inóculo



Fonte: A autora (2019).

Decorrido o tempo de ativação, uma alíquota de 1 mL foi retirada do pré inóculo, bem como do meio de cultura puro, para determinação de suas densidades óticas (DO). A medida foi realizada em um espectrofotômetro[15], no comprimento de onda de 600 nm, conforme esquema mostrado pela Figura 09. Para ajuste do valor da DO_{600} foram adicionados 2 mL de caldo puro a alíquota de pré inóculo para padronizar o mesmo com DO_{600} de 1,00 ± 0,1.

Figura 09 – Determinação da densidade ótica do pré inóculo

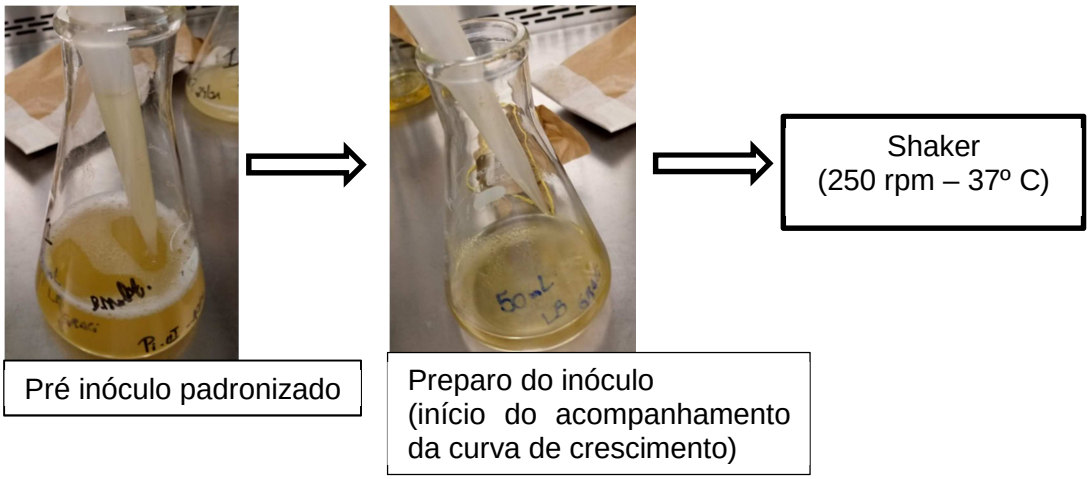


Fonte: A autora (2019).

Após a padronização da densidade ótica do pré-inóculo, adicionou-se, com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 5 mL do pré inóculo, padronizado em DO_{600} 1,00 ± 0,1, ao erlenmeyer que continha 50 mL de caldo puro. Este foi colocado no *shaker* de agitação orbital mantendo as rotações e a temperatura mencionadas anteriormente. O esquema mostrado na Figura 10 mostra este procedimento que foi realizado para MC1 e MC2.

[15] Espectrofotômetro: aparelho que mede, através de ondas luminosas, a quantidade de células presentes em um meio através da absorbância e turbidez do mesmo.

Figura 10 – Preparo do inóculo



Fonte: A autora (2019).

A partir de então iniciou-se o acompanhamento do crescimento/multiplicação dos microrganismos através da medição periódica da DO do cultivo microbiano, no comprimento de onda de 600 nm. A cada 2 h foi retirada uma alíquota de 1 mL do mesmo e comparando com a mesma alíquota do meio de cultura sem adição de microrganismo. As medições foram feitas por um período de 32 h e, para os valores encontrados que ficaram acima de 1,00 nm (+ 0,1), foi realizado ajuste da DO_{600} com água deionizada e utilizada a equação de diluição de soluções (Equação 01). Esse ajuste é indicado porque para resultados acima de 1,00 não há uma relação linear entre absorbância e concentração celular.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \qquad \text{(Equação 01)}$$

Onde:

C_1= concentração inicial (meio de cultura puro).

V_1= volume da solução inicial a ser retirada (inóculo).

C_2= concentração final (valor medido no espectrofotômetro).

V_2= volume total da solução a ser preparada (meio de cultura).

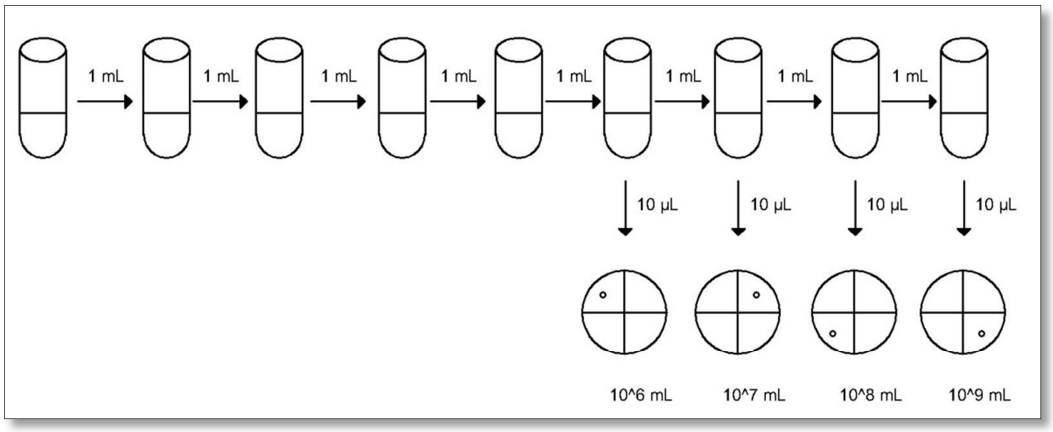
O acompanhamento do crescimento microbiano também foi feito através da técnica de diluição seriada. Essa técnica consiste na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placas de petri com meio sólido. Esse procedimento foi feito para MC1 e MC2, paralelamente ao método de medição da densidade ótica descrito anteriormente.

Para cada contagem de UFC uma alíquota de 1 mL foi retirada do cultivo do microrganismo e diluída em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada (1 g/L) previamente esterilizada em autoclave a 121 ºC por 15 min. A diluição foi realizada em 9 ou 10 tubos, sendo que dos 4 últimos tubos foi retirada uma alíquota de 10 µL com o auxílio de uma pipeta que foi colocada em uma placa de petri contendo MC1 ou MC2. O procedimento foi realizado em triplicata, conforme mencionado anteriormente, e a Figura 11 e o esquema da Figura 12 mostram imagens desses procedimentos.

Figura 11 – Materiais utilizados na diluição seriada

Fonte: A autora (2019).

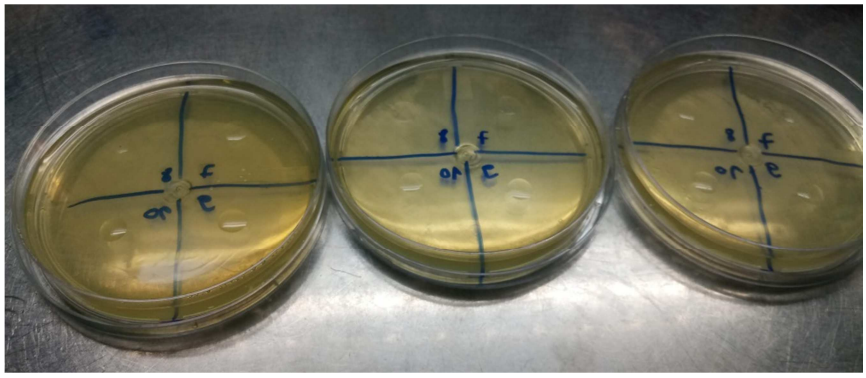
Figura 12 – Esquema de diluição seriada



Fonte: A autora (2019).

Após o procedimento de diluição a placa de petri contendo a alíquota diluída (Figura 13) foi transferida para a estufa a 37 ºC por aproximadamente 20 h.

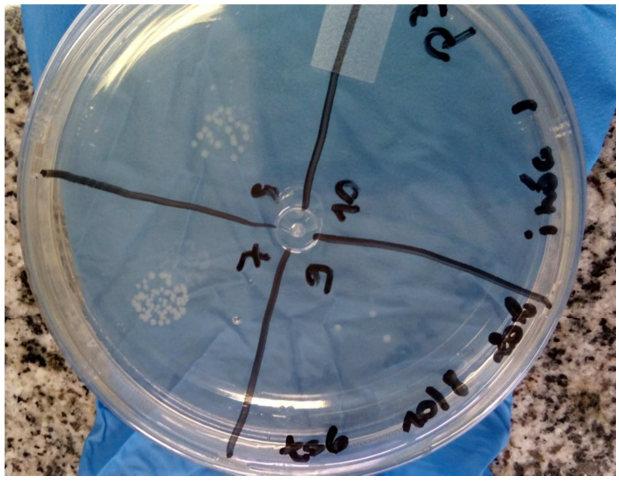
Figura 13 – Placas de petri com alíquota de diluição seriada



Fonte: A autora (2019).

Após o período em estufa realizou-se a contagem do nº de colônias presentes em cada placa, em cada um dos meios de cultura (Figura 14). O número de colônias foi multiplicado pela diluição e multiplicado por cem para obter o número de UFC/mL.

Figura 14 – Placa de Petri feita por diluição seriada após 20 h em estufa.



Fonte: A autora (2019).

A partir dos resultados do crescimento por DO e UFC as curvas de crescimento foram traçadas e o tempo ótimo de crescimento foi determinado para cada meio de cultura (MC1 e MC2). Então repetiu-se o procedimento anterior empregando-se o MC1 e retirou-se 3 alíquotas de 10 mL do cultivo no período ótimo. Essas alíquotas foram armazenadas em geladeira a 8 ºC por 72 h para que o microrganismo esporulasse. Destas alíquotas, uma foi utilizada para o encapsulamento com alginato, uma para o encapsulamento com

alginato e amido e uma para adicionar o microrganismo de forma livre na mistura de argamassa.

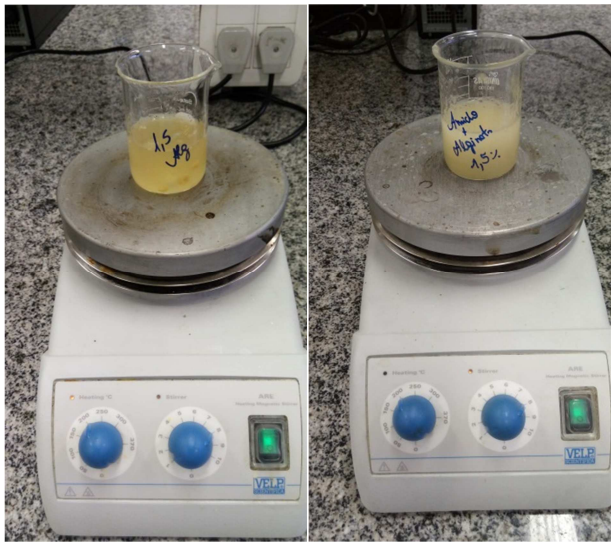
Os procedimentos descritos foram realizados em três datas diferentes e identificados como moldagem 1, moldagem 2 e moldagem 3.

3.2.2 Determinação do material de parede das cápsulas e encapsulamento do microrganismo

Para determinação do material de parede das cápsulas foram escolhidas duas composições: alginato 1,5 % (m/v) e alginato 1,5% (m/v) combinado com amido 1,0 % (m/v).

A preparação das cápsulas foi feita misturando-se os materiais mencionados acima em água deionizada. As misturas foram aquecidas e agitadas em um agitador magnético (Figura 15) até dissolverem totalmente. Após, foram autoclavadas a 121 ºC por 15 min.

Figura 15 – Preparação do material de parede das cápsulas



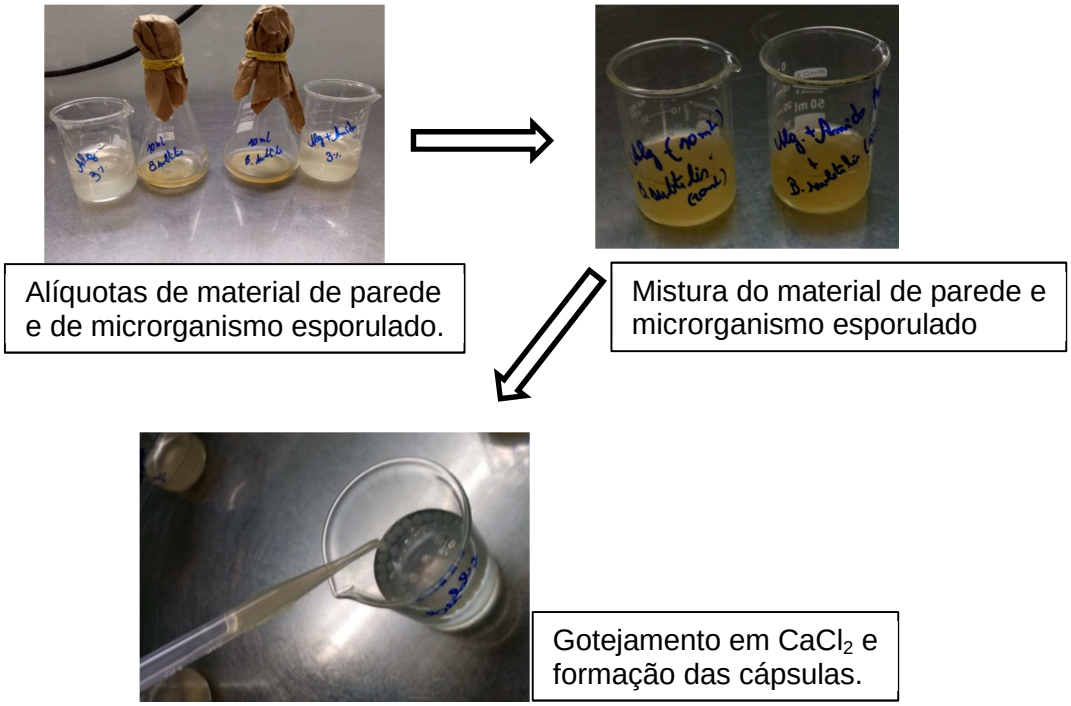
Fonte: A autora (2019).

Após o resfriamento, alíquotas de 10 mL do material de parede foram misturadas às alíquotas de 10 mL contendo os microrganismos esporulados. Com o auxílio de uma pipeta *pasteur* essa mistura foi gotejada em uma solução

de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) (0,5 M) formando as cápsulas com o microrganismo e o meio de cultura.

O esquema da Figura 16 mostra como o procedimento foi realizado.

Figura 16 – Encapsulamento do microrganismo



Após o gotejamento as cápsulas foram mantidas sob agitação magnética por 20 min. Então foram colocadas sobre papel absorvente para secarem antes da aplicação na mistura da argamassa. O procedimento descrito foi realizado em três datas diferentes e identificado como moldagem 1, moldagem 2 e moldagem 3.

3.2.3 Adição do microrganismo em corpos de prova de argamassa

A etapa descrita a seguir foi realizada em triplicata, sendo as moldagens realizadas em três datas diferentes.

A preparação da mistura da argamassa foi realizada, conforme a NBR 7215 (ABNT, 1996), adicionando os componentes em aparelho misturador (Figura 17).

Figura 17 – Materiais para preparação dos corpos de prova: a) misturador de argamassa; b) materiais componentes da argamassa.

Fonte: A autora (2019).

Após a mistura, os corpos de prova foram moldados em fôrmas específicas (Figura 18). Para o ensaio de resistência à compressão foram seis corpos de prova (CPs) cilíndricos. Para o ensaio à tração, e indução das fissuras, foram doze CPs prismáticos em cada data de moldagem. Os procedimentos descritos foram realizados em três datas diferentes e identificados como moldagem 1, moldagem 2 e moldagem 3.

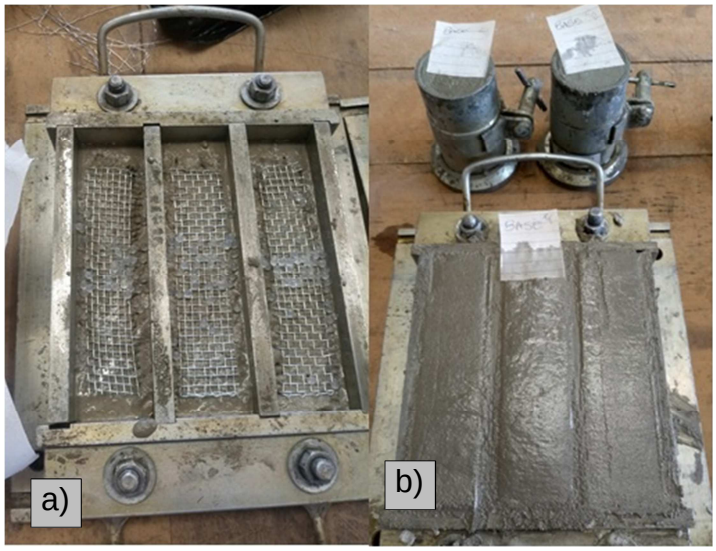
Figura 18 – Fôrmas de moldagem para argamassa. a) Fôrma prismática medindo 4 x 4 x 16 cm. B) Fôrma cilíndrica medindo 5 x 10 cm.

Fonte: A autora (2019).

A moldagem dos CPs prismáticos foi realizada em duas camadas, conforme a NBR 12142 (ABNT, 2010). Entre estas camadas foi colocada uma tela de trama 5 cm x 5 cm para induzir as fissuras quando aplicada a carga no ensaio mencionado. Durante a moldagem foram adicionadas em torno de 40

cápsulas por CP em cima das telas, também entre as duas camadas de argamassa. O microrganismo livre foi adicionado em 10 mL de meio líquido que substituiu 10 mL de água na mistura. A Figura 19 mostra a posição da tela com as cápsulas e alguns moldes.

Figura 19 – Corpos de prova moldados: a) primeira camada de argamassa já adensada, com a tela e as cápsulas; b) corpos de prova de referência recém moldados (dois cilíndricos e três prismáticos).



Fonte: A autora (2019).

Após a moldagem os CPs foram para câmara úmida a uma temperatura de 23 ºC ± 2 e umidade acima de 95%. Foram desmoldados aos dois dias, identificados com giz de cera e voltaram para a câmara úmida por mais 5 dias para que ocorresse a cura[16] úmida da argamassa sem danificar as cápsulas, conforme mostra a Figura 20.

Figura 20 – CPs desmoldados na câmara úmida

Fonte: A autora (2019).

[16] Cura da argamassa: período de hidratação dos componentes da argamassa

3.2.4 Indução de fissuras em corpos de prova de argamassa

Para indução das fissuras os CPs prismáticos foram colocados em prensa hidráulica (Figura 21) para aplicação de carga em ensaio de resistência à tração. A prensa utilizada foi a Emic SSH300, que aplica a carga em Newton de maneira contínua e com velocidade constantes (50 N/s), conforme determinado pela NBR 12142 (ABNT, 2010). O sistema da prensa faz a relação entre força aplicada e área de contato, fornecendo a resistência em MPa.

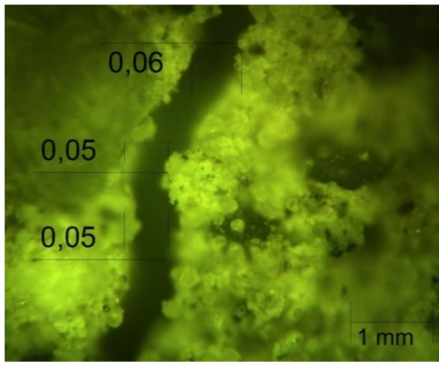
Optou-se por aplicar carga aos sete dias visando ampliar a possibilidade de obtenção de resultados, uma vez que em trabalhos de referência os autores mencionaram até cem dias para visualizar a cicatrização das fissuras.

Figura 21 – Prensa hidráulica com corpo de prova prismático.

Fonte: A autora (2019).

Após aplicação de carga as fissuras foram medidas no Microscópio Metalográfico cedido pelo Laboratório de Mecânica. A Figura 22 mostra imagem ampliada 20X.

Figura 22 – Imagem de fissura induzida



Fonte: A autora (2019).

Para cada tratamento (cápsulas de alginato, cápsulas de alginato e amido, microrganismo livre e referência) foram moldados 3 CPs prismáticos e 2 CPs cilíndricos em cada data de moldagem, conforme mostra o Quadro 06.

Quadro 06 – Quantidade de CPs moldados para cada tratamento

Tratamento	**Moldagem 1**	**Moldagem 2**	**Moldagem 3**
CPs com cápsula de alginato	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos
CPs com cápsula de alginato e amido	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos
CPs com microrganismo livre	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos
CPs de referêcnia[17]	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos	3 prismáticos 2 cilindricos

Fonte: A autora (2019).

Os CPs cilíndricos foram moldados para verificar a influência das cápsulas e do microrganismo livre na resistência à compressão, comparados com os CPs de referência. Os mesmos foram moldados em duas camadas adensadas manualmente, de acordo com a NBR 7215 (ABNT, 1996). Nos CPs onde o microrganismo foi adicionado encapsulado, as cápsulas foram colocadas na moldagem, entre as duas camadas de argamassa. Um dos CPs de cada tratamento, bem como um CP de referência, foi rompido aos 7 dias e o outro aos 100 dias. O rompimento foi realizado na mesma prensa hidráulica mencionada anteriormente, mantendo as mesmas condições.

Os CPs prismáticos foram moldados para a indução das fissuras, acompanhamento da cicatrização das mesmas e comparação de resistência no ensaio á tração. Para isso foram rompidos dois CPs de cada tratamento aos 7 dias, sendo que um deles foi mergulhado em água e o outro em água com ureia (20 g/L) logo após o rompimento (Figura 24). Os recipientes onde os CPs foram mergulhados ficaram à temperatura ambiente no Latec. Um CP de cada tratamento foi armazenado em câmara úmida para rompimento aos 100 dias. O esquema da Figura 23 mostra como foi realizado essa etapa.

[17] Os CPs de referência não tem microrganismos nem cápsulas.

Figura 23 – Quantidade de CPs moldados e os tratamentos realizados em cada CP. a) CPs cilíndricos; b) CPs prismáticos com microrganismo; c) CPs prismáticos de referência.

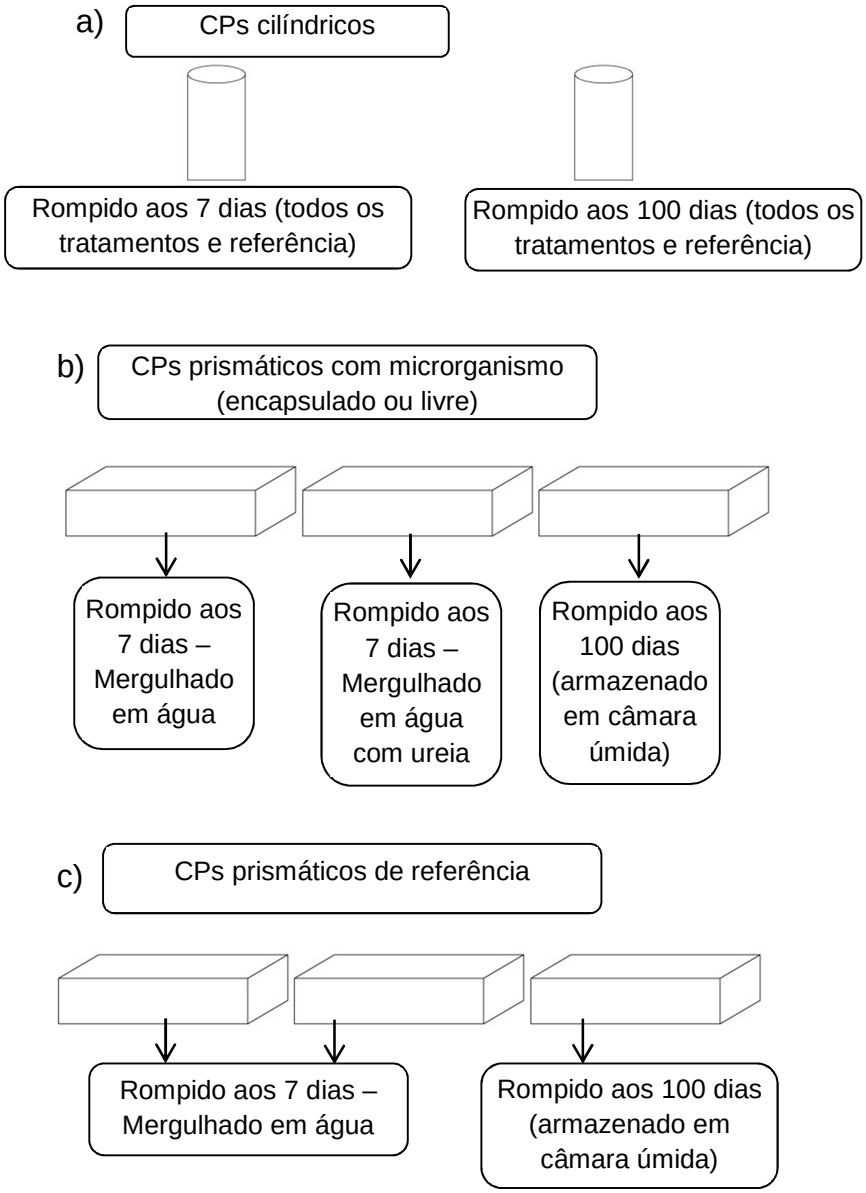
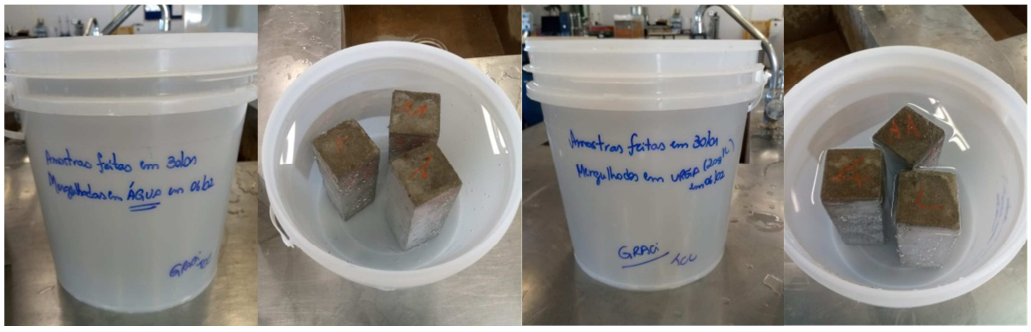


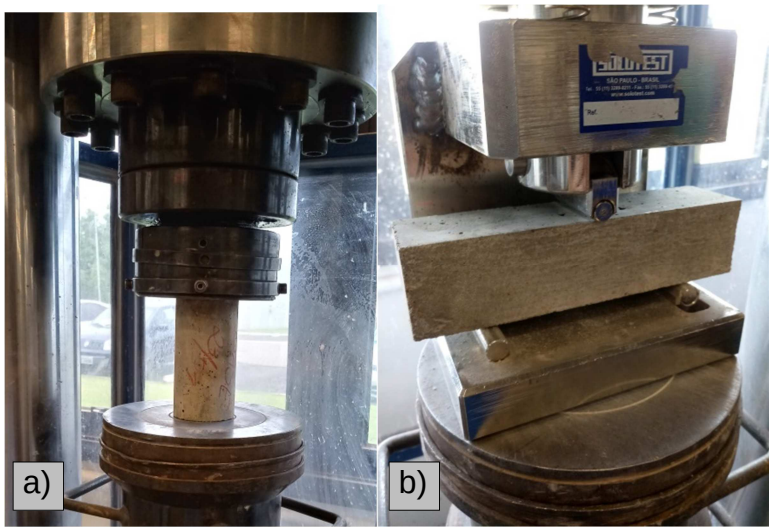
Figura 24 – CPs mergulhados em água e água com ureia



Fonte: A autora (2019).

Após cem dias da data de moldagem foram realizados os ensaios à tração, nos CPs prismáticos armazenados em câmara úmida neste período, e à compressão, nos CPs cilíndricos armazenados nas mesmas condições. A Figura 25 mostra os CPs cilíndricos e prismáticos na prensa hidráulica para os ensaios de resistência à compressão e à tração, mencionados anteriormente.

Figura 25 – CP em prensa hidráulica. a) CP cilíndrico em ensaio de resistência à compressão; b) CP prismático em ensaio de resistência à tração.



Fonte: A autora (2019).

Estes ensaios foram realizados para verificar a influência das cápsulas e do microrganismo livre na resistência característica do concreto. Por ser um material muito utilizado justamente por apresentar alta resistência, principalmente à compressão, é importante identificar a influência que a proposta do trabalho pode causar nesta característica do material.

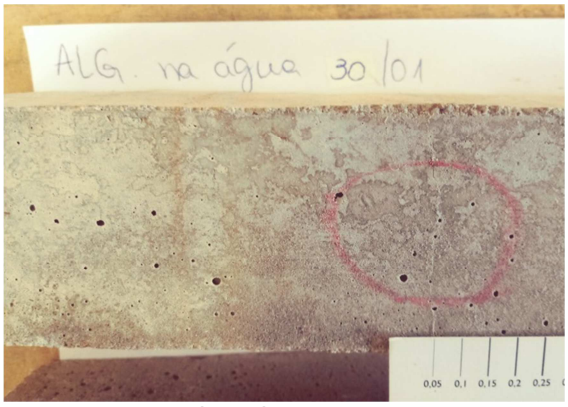
3.2.5 Acompanhamento da cicatrização das fissuras

Após indução das fissuras, como descrito anteriormente, as mesmas foram medidas em Microscópio Metalográfico no mesmo dia em que foram induzidas e marcadas com giz de cera vermelho. Após a medição os CPs foram armazenados em recipiente com água, ou água com ureia, como mencionado anteriormente, pelo período de cem dias.

O acompanhamento foi realizado de forma visual a cada quinze dias. Para isso, os CPs eram retirados da água, ou água com ureia, deixados ao ar

livre para secagem por aproximadamente 3 h, e então a observação era realizada e a medição feita com o auxílio de um cartão fissurômetro como mostra a Figura 26.

Figura 26 – Registro do acompanhamento visual realizado no decorrer dos 100 dias.



Fonte: A autora (2019).

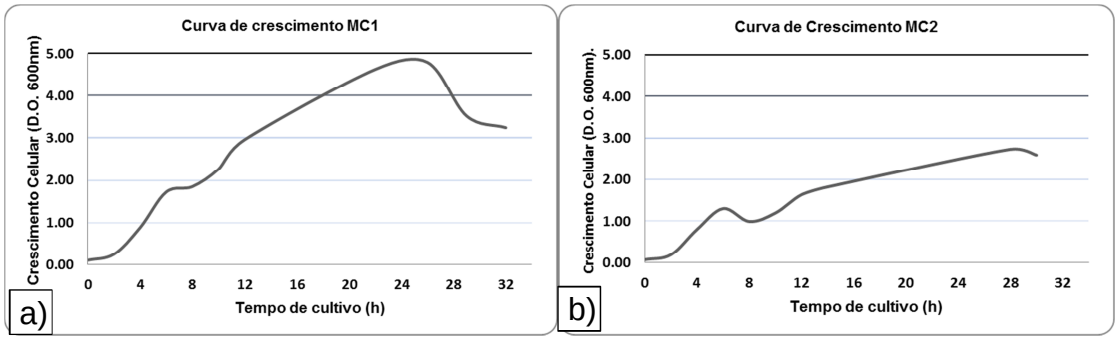
Aos cem dias foram realizadas imagens em Microscópio Metalográfico das mesmas fissuras registradas aos sete dias para verificar se houve formação de cristais e redução das fissuras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Meio de cultura e curva de crescimento microbiano

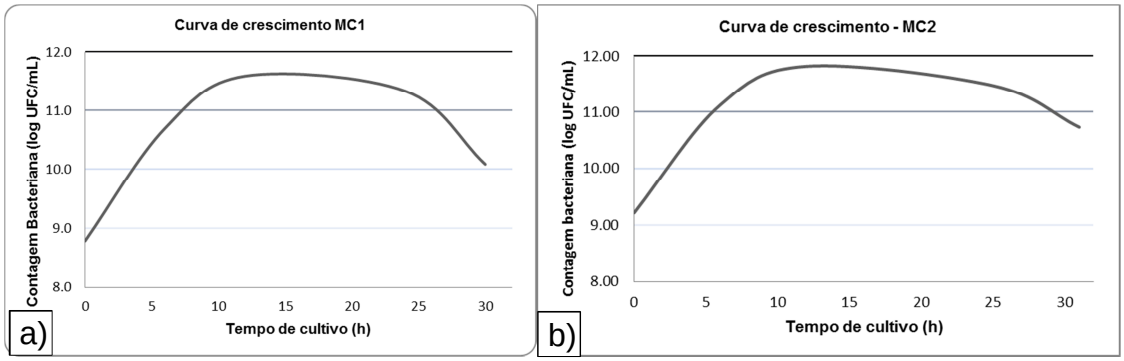
Para determinação do meio de cultura utilizado para o crescimento bacteriano as curvas de crescimento dos dois meios testados foram comparadas como mostram os Gráficos 01 e 02.

Gráfico 01 - Curvas de crescimento do microrganismo. a) Curva de crescimento em Meio de cultura 1; b) Curva de crescimento em Meio de cultura 2.



Fonte: A autora (2019).

Gráfico 02 – Curvas de crescimento por log UFC/ mL. a) Curva de crescimento em Meio de cultura 1; b) Curva de crescimento em Meio de cultura 2.



Fonte: A autora (2019).

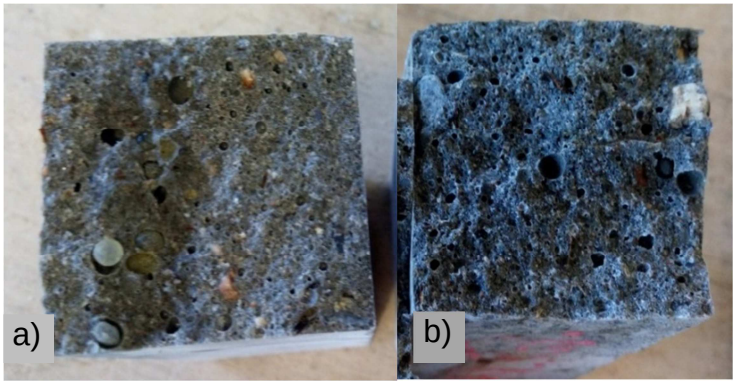
Após comparação dos resultados e das curvas de crescimento microbiano, não foi encontrada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os dois meios de cultura. O MC1 foi escolhido em função de a peptona ser um material com custo mais baixo que a triptona. Entre os estudos de referência em que essa composição de meio também foi utilizada, embora a curva de crescimento não tenha sido apresentada e outros microrganismos tenham sido utilizados, os autores relatam a ocorrência do crescimento microbiano de forma positiva (PRADEEPKUMAR, 2015; NUGROHO, SATYARNO e SUBYAKTO,2015). Vieria (2017) utilizou o *B. subtilis* ATCC6633 e, embora a autora tenha utilizado um meio de cultura com outros componentes além dos utilizados neste trabalho, os resultados encontrados para o tempo ótimo de crescimento foram os mesmos (24 h).

4.2 Material de parede das cápsulas

Para determinação do material de parede das cápsulas foram realizados testes prévios onde as cápsulas de alginato (1,5% m/v) e de alginato combinado com amido (1,0% m/v) foram colocadas, sem microrganismos, em corpos de prova de argamassa para avaliar a durabilidade e resistência das mesmas dentro neste ambiente. O teste foi realizado apenas em CPs prismáticos onde dois CPs foram armazenados em câmara úmida e dois CPs ficaram ao ar livre.

Após sete dias foi aplicada carga e os CPs foram partidos ao meio para verificação visual. Como mostra a Figura 27, as cápsulas se mantiveram intactas apenas nos CPs que foram armazenados em câmara úmida, indicando que a umidade das cápsulas foi consumida pela argamassa nos CPs que ficaram ao ar livre. Na Figura 27a) é possível observar cápsulas inteiras, bem como os vazios que ela formaram no CP. Na Figura 27b) é possível visualizar apenas os vazios, sem as cápsulas.

Figura 27 – Teste de durabilidade das cápsulas dentro dos CPs de argamassa. a) CP armazenado em câmara úmida com cápsula sobrevivente aos sete dias; b) CP armazenado ao ar livre sem cápsulas sobreviventes aos sete dias



Fonte: A autora(2019).

Com os resultados obtidos optou-se por armazenar os CPs moldados para o trabalho em câmara úmida até seu rompimento. Para fins de comparação apenas um estudo (WANG et al., 2015) utilizou alginato como material de parede e utilizou o mesmo modificado e sob outra técnica de encapsulamento. Os autores fizeram a síntese do alginato, adicionando à mistura anidrido metacrílico e hidróxido de sódio, obtendo assim uma folha de alginato modificado. A esse procedimento adicionaram esporos de microrganismo. Ainda assim, a viabilidade do alginato como agente encapsulante já havia sido mencionada pelos autores e foi comprovada neste estudo.

4.3 Cicatrização das fissuras

A indução das fissuras foi realizada aos sete dias, quando foram realizadas imagens por microscópio, como mencionado anteriormente.

Por análise visual, após 42 dias foi possível observar os primeiros sinais de cicatrização nos CPs mergulhados na ureia e com o microrganismo encapsulado (Figura 28). Ao final do período observou-se a cicatrização tanto das fissuras mergulhadas em agua com ureia como daquelas mergulhadas apenas em água. Os CPs de referência, bem como os CPs com microrganismo livre, não apresentaram cicatrização visível a olho nu neste período, apenas foi

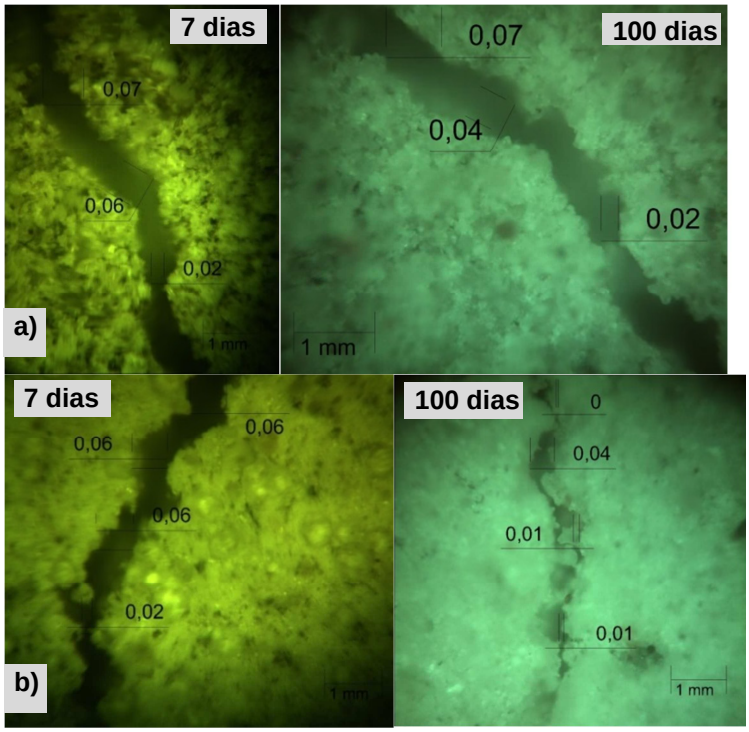
possível detectar a redução das fissuras nestes por meio de observação em microscópio metalográfico.

Figura 28 – Cicatrização de fissura aos 42 dias

Fonte: A autora (2019).

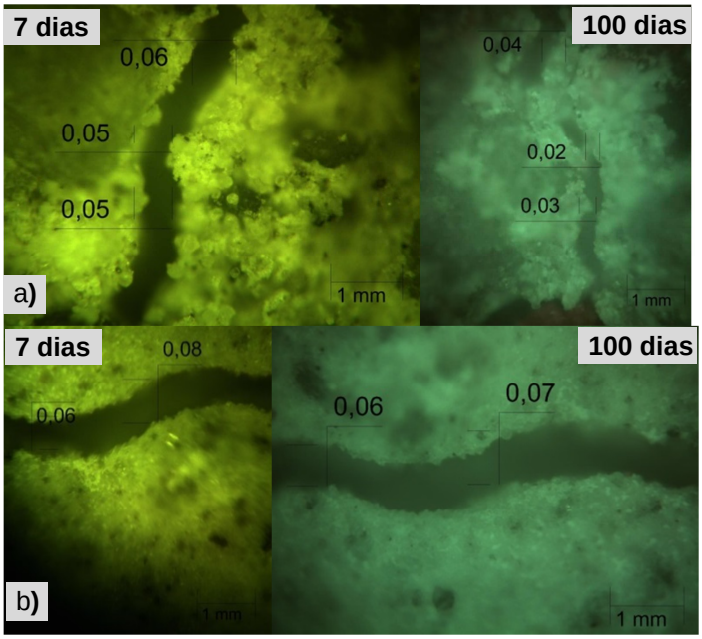
Após cem dias as imagens foram realizadas novamente em microscópio para verificar se houve formação de cristais. As Figuras 29 a 32 mostram a medição da fissura dos CPs aos sete e aos 100 dias com ampliação de 20 x, e compara os resultados dos CPs mergulhados na ureia e na água durante o período.

Figura 29 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP com cápsula de alginato. a) CP mergulhado na ureia; b) CP mergulhado na água.



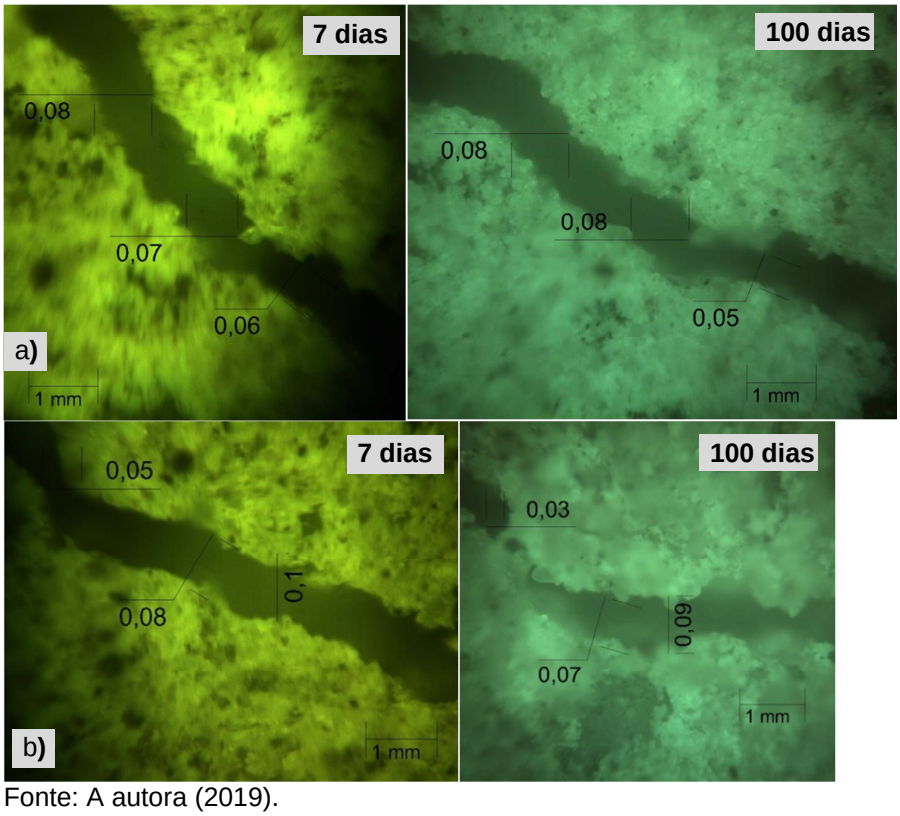
Fonte: A autora (2019).

Figura 30 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP com cápsula de alginato combinado com amido. a) CP mergulhado na ureia; b) CP mergulhado na água.



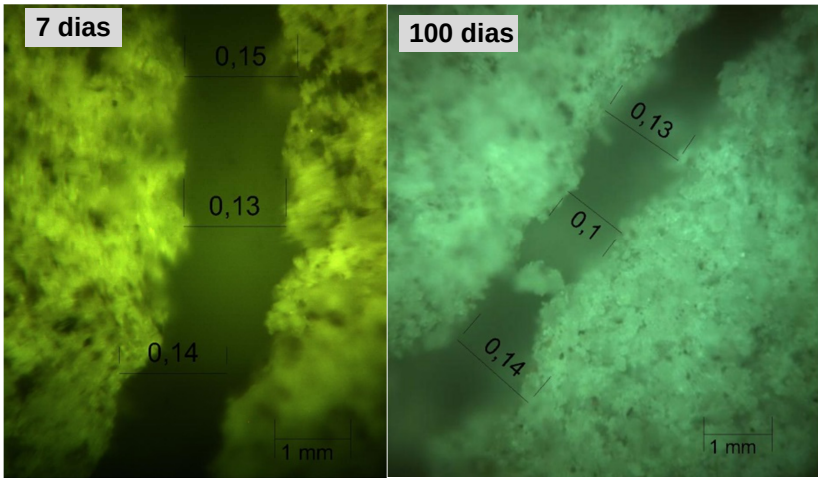
Fonte: A autora (2019).

Figura 31 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP com microrganismo livre. a) CP mergulhado na ureia; b) CP mergulhado na água.



Fonte: A autora (2019).

Figura 32 – Medição de fissuras aos sete e aos cem dias no CP de referência mergulhado na água.



Fonte: A autora (2019).

Através das imagens é possível verificar que as fissuras dos CPs que continham o microrganismo encapsulado tiverem uma maior precipitação de cristais em comparação com aqueles que continham o microrganismo livre ou os CPs de referência. O resultado obtido vai de encontro ao que Wiktor e Jonkers (2011) mencionaram em seu trabalho, onde observaram que ao adicionar esporos de microrganismo diretamente na mistura este teve sua atividade reduzida. Vieira (2017) utilizou o mesmo microrganismo e um meio de cultura similar, porém utilizou aplicação externa, onde borrifou o cultivo microbiano na superfície dos CPs. Nos resultados a autora menciona a ocorrência da formação de cristais de calcita, comprovados por imagens em microscópio eletrônico de varredura.

Não foi observada diferença relevante entre os CPs mergulhados em água ou mergulhados em água com ureia no final do período. Porém, as fissuras mergulhadas em água com ureia apresentaram uma cicatrização mais rápida, como constatado por avaliação visual no decorrer do período. Vieira (2017) menciona a ureia como um facilitador e os resultados mencionados comprovam.

4.4 Ensaios de resistência mecânica à tração e compressão

A resistência à compressão foi medida nos CPs cilíndricos (5 x 10 cm) aos sete e aos cem dias, como mencionado anteriormente, sendo que estes não foram mergulhados em água, ou água com ureia, apenas foram armazenados em câmara durante o período. Os resultados são apresentados na Tabela 04.

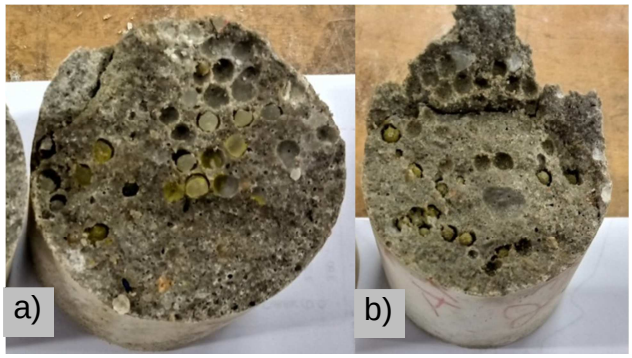
Tabela 04 – Resultados das resistências à compressão em CPs cilíndricos aos sete e aos cem dias.

Tratamento	Período (dias)	Moldagem 01 (MPa)	Moldagem 02 (MPa)	Moldagem 03 (MPa)	Média (MPa)	Desvio Padrão
Cápsula alginato	7	19,20	20,28	37,54	25,67	8,40
	100	38,54	34,01	39,96	37,50	2,54
Cápsula alginato e amido	7	23,56	23,13	26,84	24,51	1,66
	100	27,02	35,95	41,47	34,81	5,95
Microrganismo livre	7	23,56	30,21	30,34	28,04	3,17
	100	34,96	48,25	40,48	41,23	5,45
Amostras de referência	7	26,02	22,70	35,00	27,91	5,20
	100	37,85	44,36	52,00	44,74	5,78

Fonte: A autora (2019).

A análise dos resultados da Tabela 04 mostrou que há uma variação entre os mesmos que dificulta uma conclusão mais precisa sobre a influência das cápsulas na resistência à compressão. Isso ocorreu em função do número de amostras para compressão ser pequeno. Mas é possível observar que nas amostras que receberam o microrganismo livre a resistência foi maior, inclusive ultrapassando a resistência apresentada pela amostra de referência. Em estudos de referência já havia sido observado um aumento de resistência à compressão quando o microrganismo foi adicionado livre na mistura de argamassa (PRADEEPKUMAR, 2015). Também foi observado que aos cem dias ainda haviam cápsulas no interior dos CPs, como mostra a Figura 33.

Figura 33 – Cápsulas inteiras aos cem dias dentro de CP cilíndrico. a) cápsulas de alginato; b) cápsulas de alginato combinado com amido.



Fonte: A autora (2019).

A resistência à tração (Tabela 05) também foi medida aos sete e aos cem dias. A resistência registrada aos sete dias foi referente a carga aplicada para a indução das fissuras nos CPs prismáticos (4 x 4 x 16 cm). Em função disso, os resultados aos sete dias são a média de resistência de dois CPs, pois um foi fissurado para ser mergulhado em água e outro para ser mergulhado em água com ureia. Aos cem dias foram ensaiados apenas os corpos de prova prismáticos que ficaram armazenados em câmara úmida, pois os CPs que ficaram mergulhados em água, ou água com ureia, foram apenas para acompanhamento da cicatrização das fissuras. Os resultados aos cem dias correspondem a apenas um CP por moldagem.

Tabela 05 – Resultados das resistências à tração em CPs prismáticos aos sete e aos cem dias.

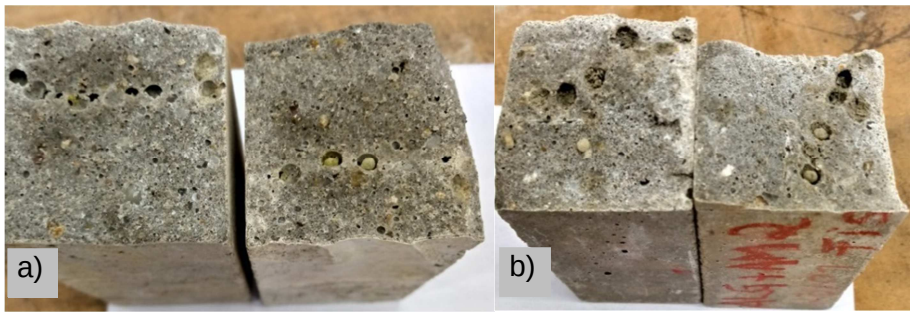
Tratamento	Período (dias)	Moldagem 01 (MPa)	Moldagem 02 (MPa)	Moldagem 03 (MPa)	Média (MPa)	Desvio Padrão
Cápsula alginato	7	5,66	6,85	6,65	6,39	0,52
	100	6,95	4,77	5,76	5,83	0,89
Cápsula alginato e amido	7	5,76	7,05	5,96	6,26	0,57
	100	6,55	5,96	5,96	6,16	0,28
Microrganismo livre	7	6,06	7,94	6,45	6,82	0,81
	100	7,35	5,36	5,56	6,09	0,89
Amostras de referência	7	5,76	8,15	6,85	6,92	0,98
	100	13.11	12.91	8,74	11,59	2,01

Fonte: A autora (2019).

A análise dos resultados da Tabela 05 mostra que houve redução na resistência aos cem dias da maioria das amostras. Isso se deve ao fato das cápsulas aumentarem o número de vazios na argamassa depois de endurecida, devido ao tamanho das mesmas (0,4 ± 0,1 cm). Alguns autores mencionam o uso de argila expandida impregnada com esporos microbianos na mistura de argamassa. Embora não apresentem os resultados de resistência das amostras, com este método seria possível manter a porosidade do concreto e, assim, resistências mais altas poderiam ser encontradas.

A Figura 34 mostra CPs rompidos aos cem dias e quebrados ao meio para verificar seu interior. É possível visualizar os vazios deixados pelas cápsulas, bem como algumas cápsulas ainda inteiras.

Figura 34 – CP rompido aos cem dias para avaliação visual. a) cápsulas de alginato; b) cápsulas de alginato combinado com amido.



Fonte: A autora (2019).

5. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos elencados é possível concluir que:

- A composição do meio de cultura contendo extrato de levedura, cloreto de sódio e peptona mostrou-se adequada para o crescimento do *B. subtilis* ATCC6633.
- As composições escolhidas como material de parede para as cápsulas que envolveram o microrganismo demonstraram boa resistência e durabilidade quando adicionadas aos CPs de argamassa e mantidas em condições adequadas de umidade.
- Ao comparar a cicatrização das fissuras nos CPs que continham o microrganismo encapsulado com os CPs onde o mesmo foi adicionado de forma livre, é possível perceber que no primeiro a cicatrização ocorreu de forma mais expressiva, enquanto no outro houve pouca formação de cristais nas fissuras. Entre os CPs onde o microrganismo foi adicionado encapsulado foi possível concluir que a ureia acelera o processo de precipitação da calcita pelo microrganismo.
- As cápsulas interferem expressivamente na redução da resistência à compressão e à tração. Porém, quando adicionado de forma livre o microrganismo demonstrou interferir positivamente, aumentando a resistência à compressão.

Ao término do trabalho é possível concluir que o objetivo principal foi alcançado, uma vez que os corpos de prova contendo microrganismo encapsulado tiveram uma maior cicatrização das fissuras se comparados com

aqueles onde o microrganismo foi adicionado livre e com os corpos de prova de referência.

Embora as cápsulas tenham se mantido viáveis durante o período de cem dias, isso ocorreu em função de estarem em câmara úmida ou mergulhadas na água durante este período. Em condições de ausência de umidade isso não teria ocorrido, como mostrou o teste prévio de sete dias. Em função disso é indicado a realização de testes com outros materiais encapsulantes ou outros métodos de encapsulamento que mantenham o microrganismo protegido e vivo durante o período.

O acompanhamento visual da cicatrização das fissuras mostrou resultados relevantes, que foram comprovados por análise em microscópio. Para trabalhos futuros recomeda-se a utilização de outro mecanismo para obtenção das imagens, onde seja possível registrar a fissura por completo e não apenas uma parte dela. Pois em algumas amostras a cicatrização total ocorreu em partes da fissura que não haviam sido registradas aos sete dias.

REFERÊNCIAS

ALGINATOS e suas múltiplas aplicações. **Food Ingredientes Brasil**, São Paulo, n.26, p. 34-38, 2013. Disponível em: <http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/20160608474150014649616 83.pdf> Acesso em: 13 mai. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **6118:** Projeto de estruturas de concreto - Procedimento. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

_____. **NBR 7211:** Agregados para concreto - Especificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

_____. **NBR 7215:** Cimento Portland – Determinação da resistência à compressão. Rio de janeiro: ABNT, 1996.

_____. **NBR 12142:** Concreto – Determinação da resistência à tração na flexão em corpos de prova prismáticos. Rio de Janeiro: ABNT, 2010.

AZEREDO, Henriette M. C de, Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005. Disponível: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/106/119> Acesso em 13 mai. 2018.

BASHIR et al. Bio Concrete - The Self-Healing Concrete. **Indian Journal of Science and Technology**, Punjab, Índia, v. 9, n. 47, p 1-5 , December 2016. Disponível em: <

http://www.indjst.org/index.php/indjst/article/view/105252/76393> Acesso em 20 mai 2018.

BERTRON, A. Understanding interactions between cementitious materials and microorganisms: a key to sustainable and safe concrete structures in various contexts. **Materials and Structures.** Netherlands, v. 47, n 11; p. 1787-1806, Nov 2014. Disponível em: < https://link.springer.com/article/10.1617%2Fs11527-014-0433-1> Acesso em: 20 mai 2018.

BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia** – Fundamentos e Perspectivas. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2002.

BLANDINO, Ana, MACIAS, Manuel, CANTERO, Domingo. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaC12 Concentration on Gelation Kinetics. **Journal of Bioscience And Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 686-689, 1999. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez316.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1389172300871030?via%3Dihub> Acesso em mai. 2018.

CAVALHEIRO et al. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura,** Santa Maria, RS, v.37 Ed. Especial. p. 65 – 74, dez 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/301564406_Encapsulacao_alternativa_para_a_aplicacao_de_microrganismos_probioticos_em_alimentos_termicamente_processados> Acesso em: 20 mai 2018.

DE BELIE, Nele. Application of bacteria in concrete: a critical review. **RILEM Technical Letters.** v. 1, p. 56–61, 2016. Disponível em: < https://letters.rilem.net/index.php/rilem/article/download/14/16/> Acesso em: 20 de mai 2018.

FERREIRA, Murillo B. **Estudo da carbonatação Natural de Concretos com diferentes adições minerais após 10 anos de exposição**. Dissertação (Pós-

Graduação em Geotecnia, Estruturas e Construção Civil) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

HELENE, Paulo. ANDRADE, Tibério. Concreto de Comento Portland. In ISAIA, Geraldo C. (Org) **Materiais de Construção Civil e Princípios de Ciência e Engenharia de Materiais**. São Paulo: IBRACON, 2010. Cap. 29, p. 905-944. Disponivel em: <http://www.phd.eng.br/wp-content/uploads/2014/07/lc48.pdf> Acesso em: 13 mai. 2018.

JONKERS, Henk M, SCHLANGEN, E. **Self-healing of cracked concrete: A bacterial approach.** Fracture mechanics of concrete and concrete structures, Catania, Italy, v. 17, n. 22; p: 1821–1826, June 2007. Disponível em: <http://framcos.org/FraMCoS-6/164.pdf> Acesso em 13 mai 2018.

JOSHI, Koustubh A, KUMTHEKAR, Madhav B, GHODAKE, Vishal P. Study of Self Healing Mechanism and its Impact on Bacillus Bacteria Impregnated Concrete. **International Research Journal of Engineering and Technology** (IRJET), Índia, v. 03, p. 2046-2053, junho 2016. Disponível em: <https://www.irjet.net/archives/V3/i6/IRJET-V3I6375.pdf> Acesso em: 13 mai. 2018.

MADIGAN, Michael T., MARTINKO, John M. e PARKER, Jack. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo, SP: Prentice Hall, 2004.

MARTIN, M.J, et al. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated Lactobacillus fermentum CECT5716. **LWT - Food Science and Technology**. v. 53. P. 480-48617, March, 2013.

MAURY, Maria B.; BLUMENSCHEIN, Raquel N. Produção de cimento: Impactos à saúde e ao meio ambiente. **Sustentabilidade em Debate** - Brasília, v. 3, n. 1, p. 75-96, jan/jun 2012. Disponível em: < http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12110/1/ARTIGO_ProducaoCimentoImpacto.pdf> Acesso em: 14 mai. 2018.

MAZER, Wellington. **Patologia, Recuperação e Reforço De Estruturas De Concreto**, 2008. Notas de aula. Curso De Engenharia Civil. Universidade Tecnológica Federal Do Paraná Curitiba – PR. Disponível em:

<http://paginapessoal.utfpr.edu.br/wmazer/patologia-das-construcoes/Notas_de_Aula_Ensaios.pdf/at_download/file> Acesso em: 20 de mai 2018.

MEHTA, P. K. ; MONTEIRO, P. J. M. **Concreto: Microestrutura, Propriedades e Materiais**. 2 ed. São Paulo. IBRACON, 2014

MENEZES et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n. 7, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a18613cr2012-0763.pdf> Acesso em 13 mai. 2018.

NEVILLE, A.M. **Propriedades do Concreto**. 5 ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2016

NUGROHO, Ananto; SATYARNO, Iman; SUBYAKTO, Subyakto. Bacteria as Self-Healing Agent in Mortar Cracks. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, v. 47, n. 3, p. 279-295, jul. 2015. Disponível em: <http://journals.itb.ac.id/index.php/jets/article/view/353>. Acesso em: 25 Mar. 2018.

OURIVES, Cláudio N., BILESKY, Pedro C., YOKOYAMA, Celina M. Avaliação do Desempenho dos Sistemas de Impermeabilização por Cristalização Capilar do Concreto. **Revista Concreto** – São Paulo, n.55, p. 24-32, jul/ago/set 2009.

PEDROSO, Fabio L. Concreto: as origens e a evolução do material construtivo mais usado pelo homem. **Revista Concreto & Construções**, São Paulo, nº 53, p. 14 – 19. Jan/fev/mar, 2009.

PELCZAR JR, Michael J, CHAN, E. C. S, KRIEG, Noel R. **Microbiologia** – Conceitos e Aplicações. v 1, 2 ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PEREIRA et al. Composição da matriz de encapsulamento na formação e conversão de sementes sintéticas de pimenta-longa. **Horticultura Brasileira** 26: 093-096, jan/mar 2008.. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hb/v26n1/a18v26n1.pdf>.

PRADEEDKUMAR, A et al. An Experimental Work on Concrete by Adding *Bacillus Subtilis*. **International Journal of Emerging Technologies and Engineering**, Índia, v. 2, n. 4, April 2015. Disponível em: < http://www.ijete.org/wp-content/uploads/2015/04/140251.pdf> Acesso em: 14 mai. 2018.

RIBEIRO, Mariangela C., STELATO, Maria M. **Microbiologia Prática.** Aplicações de Aprendizagem de Microbiologia Básica – Bactérias, Fungos e Vírus. 2 ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2011.

TAGAKI, Emilio M, JÚNIOR, Waldomiro A, OLIVEIRA, Fernando S. Tratamento Químico Cristalizante para a Impermeabilização e Proteção de Estruturas de Concreto Armado. **IBRACON – Projeto de Estruturas de Concreto,** São Paulo, v. 6, p. 1323-1333, 2004. Disponível em: <http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/20160608474150014649616 83.pdf> Acesso em: 20 de mai 2018.

TAGAKI, Emilio M. **Concretos Autocicatrizantes com Cimentos Brasileiros de Escória de Alto-forno Ativados por Catalisador Cristalino**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Infraestrutura Aeroportuária) - Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, SP.

TASCA, Maisson. **Estudo da carbonatação natural de concretos com Pozolanas: monitoramento em longo prazo e análise da microestrutura.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental), Universidade federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 2012.

THIVYA J., CHANDRASEKAREN M. Experimental Study On The Behavior Of Self Healing Concrete By Using *Bacillus Subtilis*. **International Journal of Advanced Engineering Research and Technology**, Índia, v. 4, n. 4, p. 138-142, April 2016. Disponível em: <http://www.ijaert.org/wp-content/uploads/2016/04/150108.pdf> Acesso em: 14 mai. 2018.

TITTELBOOM, Kim V, DE BIELE, N. Self-Healing in Cementitious Materials — A Review. **Materials,** Bélgica, v. 6, p. 2182-2217, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1996-1944/6/6/2182> Acesso em 13 mai. 2018

TORTORA, Gerard J, FUNKE, Berdell R, CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2012.

TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 1998

VALVERDE, F. M. Agregados para construção civil. Balanço mineral Brasileiro, 2001. Disponível em: <http://www.anm.gov.br/dnpm/paginas/balanco-mineral/arquivos/balanco-mineral-brasileiro-2001-agregados-para-construcao-civil/view.> Acesso em: 24 abril 2018

VIEIRA, Juliana Aparecida. **Biodeposição De $CaCO_3$ em Materiais Cimentícios:** Cotribuição ao estudo da biomineralização induzida por *Bacillus subtilis*. Dissertação de mestrado. UFRGS, Porto Alegre, 2017. Disponível em: < http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/170983/001051690.pdf?sequence=1> Acesso em: 13 mai. 2018.

WANG et al. Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: a promising strategy for crack self-healing. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 1-14, Oct. 2015. Disponível em: < https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01088/full> Acesso em: 20 mai 2018

WEI, Shiping et al. Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo , v. 46, n. 2, p. 455-464, June 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822015000200455&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 05 mai. 2018.

WIKTOR, Virginie; JONKERS, Henk M. Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. **Cement and Concrete Composites**, Delft, Holanda, v.33, Issue 7, p. 763-770, August 2011. Disponível em: <https://sci-hub.tw/10.1016/j.cemconcomp.2011.03.012> Acesso em: 13 mai. 2018.

WONG, Leong S. Microbial cementation of ureolytic bacteria from the genus Bacillus: a review of the bacterial application on cement-based materials for cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, v. 93. P. 5-17, April 2015. Disponível em: < https://sci-hub.tw/10.1016/j.jclepro.2015.01.019> Acesso em 13 mai. 2018.