

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL
NÍVEL MESTRADO**

VINICIUS MULLER DE MELLO

**POTENCIAL DE AUTOCICATRIZAÇÃO DOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS
PROMOVIDA PELA BIOMINERALIZAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO POR
DIFERENTES LINHAGENS BACTERIANAS EM UMA MATRIZ COM AR
INCORPORADO**

São Leopoldo

2022

VINICIUS MULLER DE MELLO

**POTENCIAL DE AUTOCICATRIZAÇÃO DOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS
PROMOVIDA PELA BIOMINERALIZAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO POR
DIFERENTES LINHAGENS BACTERIANAS EM UMA MATRIZ COM AR
INCORPORADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS).

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Fonseca Tutikian

Coorientadora: Prof.^a Dra. Fernanda Pacheco

São Leopoldo

2022

M527p

Mello, Vinicius Muller de.

Potencial de autocicatrização dos materiais cimentícios promovida pela biomineralização de carbonato de cálcio por diferentes linhagens bacterianas em uma matriz com ar incorporado / Vinicius Muller de Mello – 2022.

130 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, São Leopoldo, 2022.

“Orientador: Prof. Dr. Bernardo Fonseca Tutikian ;
Coorientadora: Prof^a Dra Fernanda Pacheco.”

1. Fissura. 2. Autocicatrização. 3. Bactérias. 4. Ar incorporado. 5. Concreto. I. Título.

CDU 624

VINICIUS MULLER DE MELLO

**POTENCIAL DE AUTOCICATRIZAÇÃO DOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS
PROMOVIDA PELA BIOMINERALIZAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO POR
DIFERENTES LINHAGENS BACTERIANAS EM UMA MATRIZ COM AR
INCORPORADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS).

Aprovado em 10 de outubro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Luciana Paulo Gomes – UNISINOS

Prof.^a Dra. Regina Célia Espinosa Modolo – UNISINOS

Prof.^a Dra. Geilma Lima Vieira – UFES

RESUMO

Dados históricos e projeções futuras indicam uma crescente no uso do concreto no mundo, enquanto sua produção e a de demais compósitos cimentícios está ligada a um grande consumo de insumos e de energia. A fissuração é uma manifestação patológica constante nestes materiais, contribuindo para a deterioração das edificações e causando diversos danos. Neste cenário, estudos buscam prover aos materiais cimentícios a capacidade de autocicatrização de suas fissuras, havendo uma vertente voltada ao uso de bactérias para este fim. É comum o encapsulamento das bactérias para sua proteção frente à agressividade da matriz cimentícia, e publicações recentes sugerem incorporar poros de ar à matriz para que sirvam como proteção às bactérias. Dessa forma, este estudo busca avaliar distintas linhagens bacterianas, coletadas na região metropolitana de Porto Alegre – RS, isoladas e identificadas molecularmente, quanto ao seu potencial de formação de produtos de cicatrização em uma argamassa com ar incorporado. Foi realizada microscopia óptica para verificar a ocorrência de autocicatrização, além de microscopia eletrônica de varredura (MEV) associada à espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) para caracterização morfológica e elemental dos cristais, e difração de raios X (DRX) para sua caracterização mineralógica. Foi verificada a influência das diferentes linhagens na resistência à compressão da argamassa. As etapas de isolamento realizadas resultaram na obtenção de 6 isolados distintos, caracterizados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cronobacter* e *Citrobacter*. Todos os isolados proporcionaram um aumento na resistência à compressão comparado à argamassa com ar incorporado e sem bactérias acrescentadas, com aumentos entre 10 e 108% aos 28 dias. Com relação à análise por microscopia óptica, 1 dos isolados não apresentou formação de produtos de cicatrização, enquanto os demais apresentaram cicatrização entre os 7 e 14 dias de análise, mas apenas nas regiões inferiores dos corpos de prova, além de ter sido observada perda de parte dos cristais formados. As análises de DRX e EDS indicam que os cristais se tratam de calcita, sendo visualizado pela MEV calcita, mas também aragonita. Os resultados indicam que todos os isolados foram capazes de promover a autocicatrização e que seu encapsulamento em bolhas de ar incorporado foi efetivo.

Palavras-chave: fissura; autocicatrização; MICP; bactéria; ar incorporado.

ABSTRACT

Historical data and future projections indicate a growing use of concrete worldwide, while its production and that of other cementitious composites is linked to a large consumption of inputs and energy. Cracking is a constant pathological manifestation in these materials, contributing to the deterioration of buildings and causing various damages. In this scenario, studies seek to provide cementitious materials the ability to self-heal their cracks, with some of them focused on the use of bacteria for this purpose. It is common to encapsulate bacteria for protection against the aggressiveness of the cementitious matrix, and recent publications suggest incorporating air pores into the matrix to serve as protection for bacteria. Thus, this study seeks to evaluate different bacterial strains, collected in the metropolitan region of Porto Alegre - RS, isolated and molecularly identified, regarding their potential for the formation of healing products in a mortar with incorporated air. Optical microscopy was performed to verify the occurrence of self-healing, in addition to scanning electron microscopy (SEM) associated with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) for morphological and elemental characterization of the crystals, and X-ray diffraction (XRD) for its mineralogical characterization. The influence of different strains on the compressive strength of the mortar was verified. The isolation steps performed resulted in the obtaining of 6 distinct isolates, characterized as belonging to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cronobacter* and *Citrobacter*. All isolates provided an increase in compressive strength compared to air-entrained and bacteria-free mortar, with increases between 10 and 108% at 28 days. Regarding the analysis by optical microscopy, 1 of the isolates showed no formation of healing products, while the others showed healing between 7 and 14 days of analysis, but only in the lower regions of the specimens, in addition to an observed loss of part of the crystals formed. XRD and EDS analyzes indicate that the crystals are calcite, being visualized by SEM calcite, but also aragonite. The results indicate that all isolates were able to promote self-healing and that their encapsulation in incorporated air bubbles was effective.

Key-words: crack; self-healing; MICP; bacterium; air entrainment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Quantidade de material científico produzido mundialmente referente à autocicatrização do concreto.....	18
Figura 2 – Mecanismos físicos e químicos de deterioração do concreto	22
Figura 3 – Modelo holístico de deterioração do concreto.....	23
Figura 4 – Causas da autocicatrização autógena	26
Figura 5 – Desenvolvimento da resistência à compressão nos concretos com incorporação de extrato de levedura, peptona, lactato de cálcio ou acetato de cálcio	33
Figura 6 – Encapsulamento de <i>Bacillus cohnii</i> com diferentes aditivos incorporadores de ar: (a) controle (sem aditivo), (b) C201, (c) B119 e (d) B130.....	40
Figura 7 – Microscopia ótica para acompanhamento da autocicatrização	43
Figura 8 – Microscopia ótica com binarização para mensuração da área da fissura	43
Figura 9 – Microscopia ótica com reconstituição de uma fissura ao longo de toda a sua extensão.....	44
Figura 10 – (a, b) MEV apresentando cristais ao longo do interior da fissura e (c) EDS indicando sua composição química elementar	45
Figura 11 – Micrografias de MEV e análises de EDS em diferentes amostras, com enfoque (a, b e c) nos produtos de cicatrização e (d) na matriz cimentícia.....	46
Figura 12 – Análise de DRX em produtos de cicatrização	46
Figura 13 – Etapas principais do programa experimental	49
Figura 14 – Distribuição granulométrica da areia	51
Figura 15 – Distribuição granulométrica do cimento	51
Figura 16 – Pontos de coleta dos solos (a) A e (b) B	53
Figura 17 – Exemplo do processo adotado para seleção e nomenclatura dos isolados.....	55
Figura 18 – Fissuração manual das amostras em morsa.....	58
Figura 19 – Esquema explicativo dos corpos de prova moldados para execução das análises	59
Figura 20 – Reconstrução digital das fissuras para acompanhamento visual.....	62
Figura 21 – Resistência potencial à compressão desenvolvida pela argamassas para cada um dos isolados.....	68

Figura 22 – (a) Prisma fissurado com sucesso e (b) prisma rompido durante o processo de fissuração em ensaio de tração na flexão.....	70
Figura 23 – Aproveitamento dos prismas de argamassa para acompanhamento visual de fissuras.....	71
Figura 24 – Fissura no prisma A-II 3 (1).....	71
Figura 25 – Fissura no prisma A-V 1.1 (1).....	72
Figura 26 – Fissura no prisma A-V 1.1 (2).....	73
Figura 27 – Fissura no prisma A-V 1.1 (3).....	74
Figura 28 – Fissura no prisma A-V 3 (1).....	75
Figura 29 – Fissura no prisma A-V 3 (2).....	76
Figura 30 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma A-V 3 (2) – Registros aos 14 e 28 dias.....	77
Figura 31 – Formação de cristais na superfície exposta fraturada do prisma A-V 3 (3) – Registros aos 7, 14 e 28 dias.....	78
Figura 32 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma A-V 1.1 (1) – Registros aos 7, 14 e 28 dias.....	78
Figura 33 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma A-V 1.1 (1) – Registro aos 28 dias.....	79
Figura 34 – Fissura no prisma B-I 1 (1).....	81
Figura 35 – Fissura no prisma B-I 1 (2).....	82
Figura 36 – Fissura no prisma B-II 3 (1).....	83
Figura 37 – Fissura no prisma B-II 3 (2).....	84
Figura 38 – Fissura no prisma B-II 3 (3).....	85
Figura 39 – Fissura no prisma B-IV 4 (1) aos 0 e 7 dias.....	86
Figura 40 – Fissura no prisma B-IV 4 (1) aos 14 e 28 dias.....	87
Figura 41 – Produtos de cicatrização em uma fissura na face lateral e na face inferior do prisma B-I 1 (1) – Registros aos 14 e 28 dias.....	88
Figura 42 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral e na superfície exposta fraturada do prisma B-I 1 (2) – Registros aos 14 e 28 dias.....	89
Figura 43 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face inferior do prisma B-II 3 (1) – Registros aos 14 e 28 dias.....	90
Figura 44 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma B-II 3 (2) – Registros aos 14 e 28 dias.....	91

Figura 45 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face inferior do prisma B-II 3 (3) – Registros aos 14 e 28 dias	92
Figura 46 – Formação de cristais na superfície exposta fraturada do prisma B-IV 4 (1) – Registros aos 14 e 28 dias.....	92
Figura 47 – Superfícies expostas das fissuras para análise por MEV das argamassas (a) A-II 3, (b) A-V 1.1, (c) A-V 3, (d) B-I 1, (e) B-II 3 e (f) B-IV 4.....	94
Figura 48 – Micrografias das argamassas (a, b) A-II 3, (c, d) A-V 1.1 e (e, f) A-V 3 .	95
Figura 49 – Micrografias das argamassas (a, b) B-I 1, (c, d) B-II 3 e (e) B-IV 4.....	96
Figura 50 – Composição elementar de estrutura cristalina na amostra A-II 3.....	99
Figura 51 – Composição elementar de estrutura cristalina na amostra A-V 1.1.....	99
Figura 52 - Composição elementar de estrutura cristalina na amostra A-V 3	99
Figura 53 – Composição elementar de estrutura cristalina na amostra B-I 1.....	100
Figura 54 – Composição elementar de estrutura cristalina na amostra B-II 3.....	100
Figura 55 - Composição elementar de estrutura cristalina na amostra B-IV 4	100
Figura 56 – Difratoograma da amostra A-V 1.1.....	101
Figura 57 – Difratoograma da amostra A-V 3.....	102
Figura 58 – Difratoograma da amostra B-I 1	102
Figura 59 – Difratoograma da amostra B-II 3	103
Figura 60 – Difratoograma da amostra B-IV 4.....	103
Figura A.1 – Colônias dos isolados (a) A-II 3, (b) A-V 1.1, (c) A-V 3, (d) B-I 1, (e) B-II 3 e (f) B-IV 4.....	128
Figura B.1 – Micrografias da amostra A-II 3.....	129
Figura B.2 – Micrografias da amostra A-V 1.1.....	129
Figura B.3 – Micrografias da amostra A-V 3	130
Figura B.4 – Micrografias da amostra B-I 1	131
Figura B.5 – Micrografias da amostra B-II 3.....	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Termos da área de estudo adotados no trabalho	25
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabolismos viáveis para precipitação de calcita induzida microbiologicamente	30
Tabela 2 – Variáveis deste estudo	48
Tabela 3 – Composição e características do traço empregado.....	50
Tabela 4 – Propriedades físicas da areia e do cimento.....	52
Tabela 5 – Identificação molecular dos isolados	65
Tabela 6 – Síntese dos resultados	105
Tabela A.1 – Resultados das provas bioquímicas (visual)	124
Tabela A.2 – Resultados das provas bioquímicas e exclusão dos isolados duplicatas	127

LISTA DE SIGLAS

BET	Isotermas Brunauer, Emmett e Taller
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citocina
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CAGR	Taxa de crescimento anual composta
C-S-H	Silicato de cálcio hidratado
DRX	Difração de raios X
ECC	<i>Engineered cementitious composite</i>
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X
EUA	Estados Unidos da América
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MICP	<i>Microbiologically induced calcite precipitation</i>
NBR	Normas Brasileiras de Regulação
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGEC	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil
RILEM	<i>International Union of Laboratories and Experts in Construction Materials, Systems and Structures</i>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
UNISINOS	Universidade do Vale do Rio dos Sinos
UR	Umidade relativa do ar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo Geral	19
1.2.2 Objetivos Específicos	19
1.3 DELIMITAÇÕES DO ESTUDO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 DETERIORAÇÃO DO CONCRETO	21
2.2 AUTOCICATRIZAÇÃO DOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS	24
2.2.1 Mecanismos autógenos	26
2.2.2 Mecanismos autônomos	28
2.3 CONCEITOS FUNDAMENTAIS RELACIONADOS À AUTOCICATRIZAÇÃO BACTERIANA	29
2.4 AVANÇOS RECENTES NO ESTUDO DE BACTÉRIAS COMO AGENTES DE AUTOCICATRIZAÇÃO	34
2.4.1 Adição direta de bactérias na água de amassamento	34
2.4.2 Adição de bactérias encapsuladas	36
2.4.3 Bioprospecção de bactérias	41
2.4.3 Técnicas de análise dos produtos de cicatrização	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	49
3.2 BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS	52
3.3 PREPARAÇÃO DAS ARGAMASSAS	57
3.4 INDUÇÃO DE FISSURAS	59
3.5 REPOUSO PARA AUTOCICATRIZAÇÃO	60
3.6 ANÁLISE DO PRODUTO DE CICATRIZAÇÃO	60
3.6.1 Acompanhamento visual	60
3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva e difração de raios X	62
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	64
4.1 BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS	64
4.2 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO	68

4.3 ANÁLISE DO PRODUTO DE CICATRIZAÇÃO	70
4.3.1 Acompanhamento visual	70
4.3.2 Morfologia, composição elementar e mineralógica dos produtos de cicatrização.....	93
4.3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura	93
4.3.2.2 Espectroscopia de energia dispersiva	98
4.3.2.3 Difração de raios X.....	101
4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS	104
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICE A – PROVAS BIOQUÍMICAS DOS 10 ISOLADOS ANALISADOS E COLÔNIAS DOS 6 ISOLADOS SELECIONADOS PARA USO.....	124
APÊNDICE B – MICROGRAFIAS ADICIONAIS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	129

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 1980 o concreto é amplamente conhecido como um material de construção de suma importância, mantendo-se até hoje como o mais utilizado em todo o mundo, o que já era previsto por regras básicas de mercado como oferta e demanda (MEHTA; MONTEIRO, 2014). Como um parâmetro para a produção de concreto e de demais materiais cimentícios, com base em dados anuais históricos fornecidos pela U.S. GEOLOGICAL SURVEY (1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020), pode-se calcular que a produção a nível mundial de cimento *Portland* cresceu 34% nos últimos 10 anos e 156% nos últimos 20 anos.

Na década passada, Carmona Filho e Carmona (2013) projetaram que o concreto seguramente permanecerá sendo um material amplamente utilizado pela construção civil durante muitos anos. Contribui para isto, por exemplo, o movimento de imigração aos grandes centros urbanos que tem ocorrido no último século e que segue previsto para as próximas décadas, fazendo crescer a demanda por uma infraestrutura que atenda à estas populações (DE WENDEN, 2021; MEHTA; MONTEIRO, 2014).

Em um cenário atual, o mercado global de produtos de cimento e concreto sofreu um expressivo crescimento entre 2020 e 2021 dada a recuperação econômica mundial após o auge da pandemia de COVID-19. Especificamente, este mercado é estimado em US\$365,58 bilhões no ano de 2021, sendo prevista uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 7,1% até 2050, resultando, neste ano, em um valor de mercado de US\$481,2 bilhões (THE BUSINESS RESEARCH COMPANY, 2021). Com base nos dados apresentados, pode-se notar que a utilização dos materiais cimentícios no setor da construção civil mostra-se resiliente ao longo dos anos.

Heeren e Hellweg (2019) corroboram com isto ao estimarem, através de uma análise espacial e temporal de edificações suíças, que em 2055 o uso de materiais de construção seguirá os padrões atuais, tanto para fins de novas construções, quanto para atividades de reforma. Os autores também notam que os impactos ambientais gerados pela produção e disposição dos materiais de construção devem se manter estáveis ao longo dos anos. Dessa forma, devido ao grande consumo do concreto e

sua tendência de uso futuro, há de se preocupar com os impactos gerados em sua fabricação e em seu uso (CARMONA FILHO; CARMONA, 2013).

No que se refere ao uso de matérias primas, Mehta e Monteiro (2014) tomam o ano de 2010 como exemplo ao demonstrar que, além do consumo do cimento *Portland* – de acordo com os autores, 3,7 bilhões de toneladas –, a fabricação do concreto também demandou 27 bilhões de toneladas de agregados, 2,7 bilhões de toneladas de água e uma menor quantidade de aditivos químicos. Deve-se atentar, também, que a extração, o processamento e o transporte de todos esses materiais demandam uma grande quantidade de energia, e afetam a ecologia dos ecossistemas. Ainda segundo os autores, na data de sua publicação, a produção de cimento *Portland* era responsável por 7% das emissões anuais de gás carbônico, um dos principais responsáveis pelo efeito estufa. Dessa forma, são necessários avanços tecnológicos que permitam uma desaceleração da produção mundial do cimento *Portland*, visto que, conforme apresentado no início do texto, o mercado caminha atualmente na direção contrária.

Soma-se ao cenário do seu grande consumo e impactos ambientais negativos o fato de o concreto, conforme Carmona Filho e Carmona (2013), ser suscetível a apresentação de um desempenho inadequado, sendo a fissuração o dano mais comum apresentado pelo material, a qual pode ter diversas origens. Os autores ainda acrescentam que, embora a ciência e a tecnologia dos materiais tenham evoluído historicamente, também houve avanços nos métodos de cálculo estrutural e nas exigências por obras mais arrojadas – vãos maiores e elementos mais esbeltos –, de forma que a fissuração excessiva vem sendo, ao longo dos anos, uma constante nas estruturas de concreto.

De acordo com Granger (2006), as fissuras afetam as propriedades resistentes, vedantes e de transferência de esforços do concreto, sendo a raiz de numerosos problemas que ameaçam a integridade das estruturas. Sangadji (2015) comenta que a fissuração expõe as armaduras no interior do concreto às substâncias agressivas presentes no ambiente. De fato, Mehta e Monteiro (2014) indicam que evitar a fissuração do concreto possibilita, também, evitar sua deterioração a partir dos efeitos ambientais. Conforme os autores, a fissuração retroalimenta sua própria ocorrência, de forma que, mitigando-a, pode-se garantir uma maior durabilidade do material.

A ocorrência de fissuração nas edificações leva à sua deterioração muito antes do final da vida útil prescrita em projeto, principalmente em países de terceiro mundo,

exigindo reparos ou mesmo suas substituições prematuras (CHEMROUK, 2015). Já na realidade de países desenvolvidos como a Alemanha, a Coreia do Sul e os Estados Unidos da América (EUA), é apontado que os gastos dispendidos na recuperação e na reabilitação da infraestrutura dos países superam os gastos que se têm com novas construções (LI; HERBERT, 2012). Na Holanda, Sangadji (2015) afirma que os gastos para reparo e aprimoramento das obras civis é responsável por um terço do montante total referente ao gasto total com obras. O autor também apresenta que no Reino Unido 45% das atividades do setor de construção são relativas à reparos e às manutenções.

Além dos custos financeiros claramente relacionados aos processos de reparo das estruturas, Keoleian, Kendall e Dettling (2005) apontam que custos sociais também surgem desse processo. Os autores, ao elaborarem um modelo para avaliação dos indicadores de sustentabilidade ao longo do ciclo de vida de uma estrutura, integraram também os danos causados pela poluição gerada nas atividades de reparo, os congestionamentos oriundos do transporte de materiais, bem como os atrasos dos usuários, as colisões e os custos operacionais dos veículos.

Indo ainda mais além, pode-se perceber que as estruturas de concreto simbolizam, para o futuro, os conhecimentos técnicos e científicos da época em que foram construídas, atuando como testemunhas do seu tempo e possuindo, portanto, um valor cultural intrínseco à si mesmas (LICORDARI, 2015). Dessa forma, pode-se notar que urge, atualmente, a necessidade de uma maior conservação das estruturas, de forma a minimizar os custos e os danos gerados pela sua deterioração, seja ela precoce ou não, e pelo seu reparo. De fato, é apontado pela bibliografia que um aumento na durabilidade das estruturas é imprescindível para um desenvolvimento sustentável da indústria do concreto (MEHTA; MONTEIRO, 2014).

Buscando evoluir na solução desse problema, pesquisadores de todo o mundo têm desenvolvido um grande volume de estudos sobre processos de autocicatrização do concreto, conforme será apresentado adiante na fundamentação teórica deste trabalho. Em resumo, a autocicatrização consiste na recuperação de fissuras, tal qual a pele humana se recupera ao sofrer um corte (DE ROOIJ; SCHLANGEN; JOSEPH, 2013). Um dos mecanismos para promoção da capacidade de autocicatrização aos materiais cimentícios é o emprego de bactérias, que atuam metabolizando nutrientes orgânicos, geralmente a base de cálcio, adicionados à matriz, em um processo que

oportuniza a precipitação de carbonato de cálcio (CaCO_3) nas fissuras (REINHARDT et al., 2013).

1.1 JUSTIFICATIVA

Com base nos apontamentos já apresentados (CELADYN, 2014; CHEMROUK, 2015; KEOLEIAN; KENDALL; DETTLING, 2005; LI; HERBERT, 2012; LICORDARI, 2015), percebe-se que a deterioração das estruturas de concreto, bem como seu constante reparo e/ou sua recuperação, trazem consigo custos financeiros, ambientais, sociais e culturais. Dessa forma, pode-se perceber a necessidade de estudos que busquem o prolongamento da vida útil das estruturas, na busca pela minimização dos problemas apresentados pelo cenário atual.

Buscando soluções para este problema, há uma vertente de estudo da autocicatrização das matrizes cimentícias através do uso de microrganismos, especificamente bactérias, como agentes promotores de cicatrização. Diversos dos estudos que têm sido publicados fazem o uso de microrganismos já catalogados em bases de dados (BASARAN BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015; FAHIMIZADEH et al., 2020; JUSTO-REINOSO et al., 2022; KHUSHNOOD et al., 2019, 2020, 2022; QIAN et al., 2021a; QU et al., 2021; RAUF et al., 2020; WANG et al., 2018, 2014b, 2015; WU et al., 2020; XU et al., 2020; XU; WANG; WANG, 2018; ZAMANI et al., 2020) e até mesmo de microrganismos adquiridos de uma empresa que comercializa insumos para produção de concretos autocicatrizantes (ROSSI et al., 2022). Uma quantidade menor de publicações possui como premissa o isolamento de microrganismos indígenas¹ como agente de cicatrização (ACHAL; MUKERJEE; SUDHAKARA REDDY, 2013; ALGAIFI et al., 2021; CHAERUN; SYARIF; WATTIMENA, 2020; JOSHI; GOYAL; SUDHAKARA REDDY, 2021). Tais publicações aumentam o leque de bactérias viáveis para o estudo da autocicatrização, além de abrir possibilidades para a prospecção de bactérias locais, podendo facilitar economicamente seu uso.

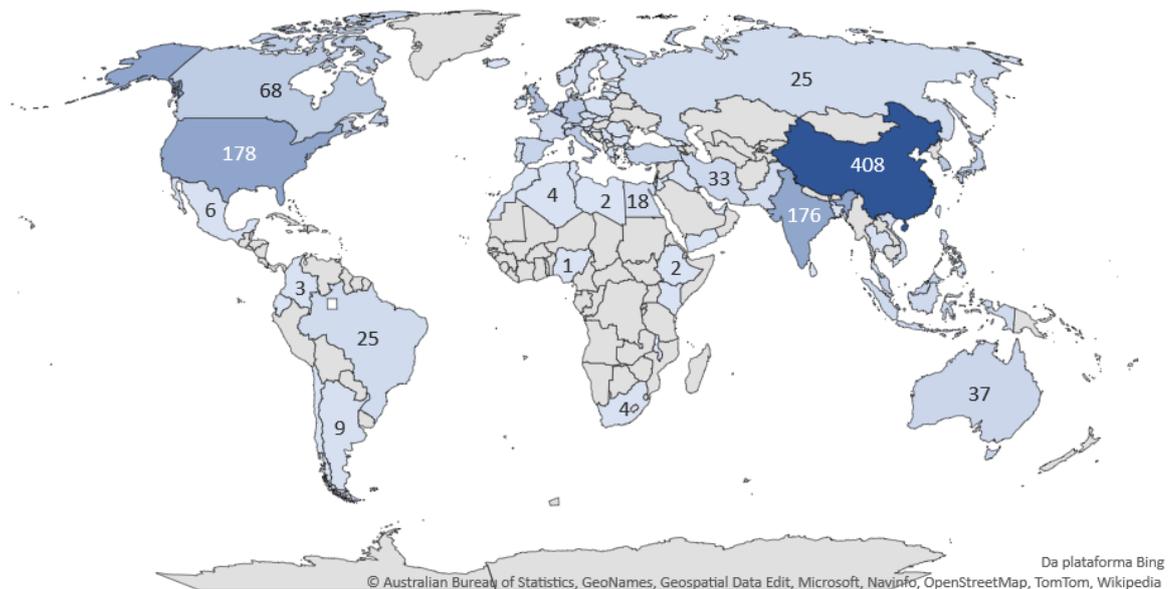
Paralelamente, conforme será apresentado em detalhes na revisão bibliográfica, a autocicatrização promovida pela adição de bactérias às matrizes cimentícias frequentemente conta com o encapsulamento desses microrganismos em

¹ Microrganismos nativos dos locais em que os estudos são realizados, coletados do ambiente e geralmente isolados e/ou identificados em laboratório

algum material, sendo comum o uso de agregados leves, por exemplo. Esse processo demonstrou ser eficiente, porém utiliza diversas técnicas e equipamentos avançados como mostram estudos já realizados (CHEN; QIAN; HUANG, 2016; XU et al., 2020; ZHANG et al., 2017a, 2019), o que pode inviabilizá-lo para aplicação da técnica em grande escala (XU et al., 2019).

Dessa forma, esse estudo motiva-se, também, visando desenvolver uma técnica mais acessível para a promoção da autocicatrização dos compósitos cimentícios, bem como pela pretensão na validação de um método para prospecção de bactérias indígenas da região onde o trabalho é desenvolvido. Além destes fatores, pode-se notar que há a necessidade de um maior desenvolvimento desses estudos em cenário nacional devido à baixa quantidade de documentos científicos (artigos, *papers*, revisões, etc.) produzido no Brasil, em relação ao cenário mundial, conforme aponta a Figura 1. Os dados apresentados se referem aos documentos indexados na base de dados Scopus. A coleta foi realizada no dia 20 de julho de 2022, utilizando a expressão booleana “concrete AND self-healing”.

Figura 1 – Quantidade de material científico produzido mundialmente referente à autocicatrização do concreto



Dado este cenário, visando contribuir neste tema de pesquisa e abordar o uso de bactérias indígenas da região do estudo, justifica-se o desenvolvimento do presente trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de formação de produtos de cicatrização por diferentes bactérias indígenas adicionadas à uma matriz cimentícia conjuntamente à aditivo químico incorporador de ar como forma de encapsulamento dos microrganismos.

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são os seguintes:

- a) Validar um método para bioprospecção de bactérias indígenas locais adequadas ao uso em matrizes cimentícias autocicatrizantes;
- b) Verificar a influência das bactérias na resistência mecânica à compressão da matriz cimentícia;
- c) Analisar a eficácia do uso de ar incorporado como via de sobrevivência das bactérias na matriz cimentícia; e
- d) Investigar a morfologia e as composições elementar e mineralógica dos produtos de cicatrização formados;

1.3 DELIMITAÇÕES DO ESTUDO

Esta pesquisa é feita dentro do grupo de pesquisa em Gestão e Sustentabilidade na Construção GSC do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil (PPGEC) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). O trabalho encaixa-se no grupo devido ao seu caráter de otimização de um processo na perspectiva da redução da geração de resíduos.

As delimitações às quais o trabalho está sujeito são:

- a) Análise da autocicatrização promovida em corpos de prova de argamassa mantidos em um ambiente controlado;

- b) Acompanhamento da autocicatrização até a idade de 28 dias após fissuração;
- c) Análise qualitativa dos produtos da autocicatrização por análise de superfície, e não da efetividade do processo de autocicatrização (aderência ou resistência).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

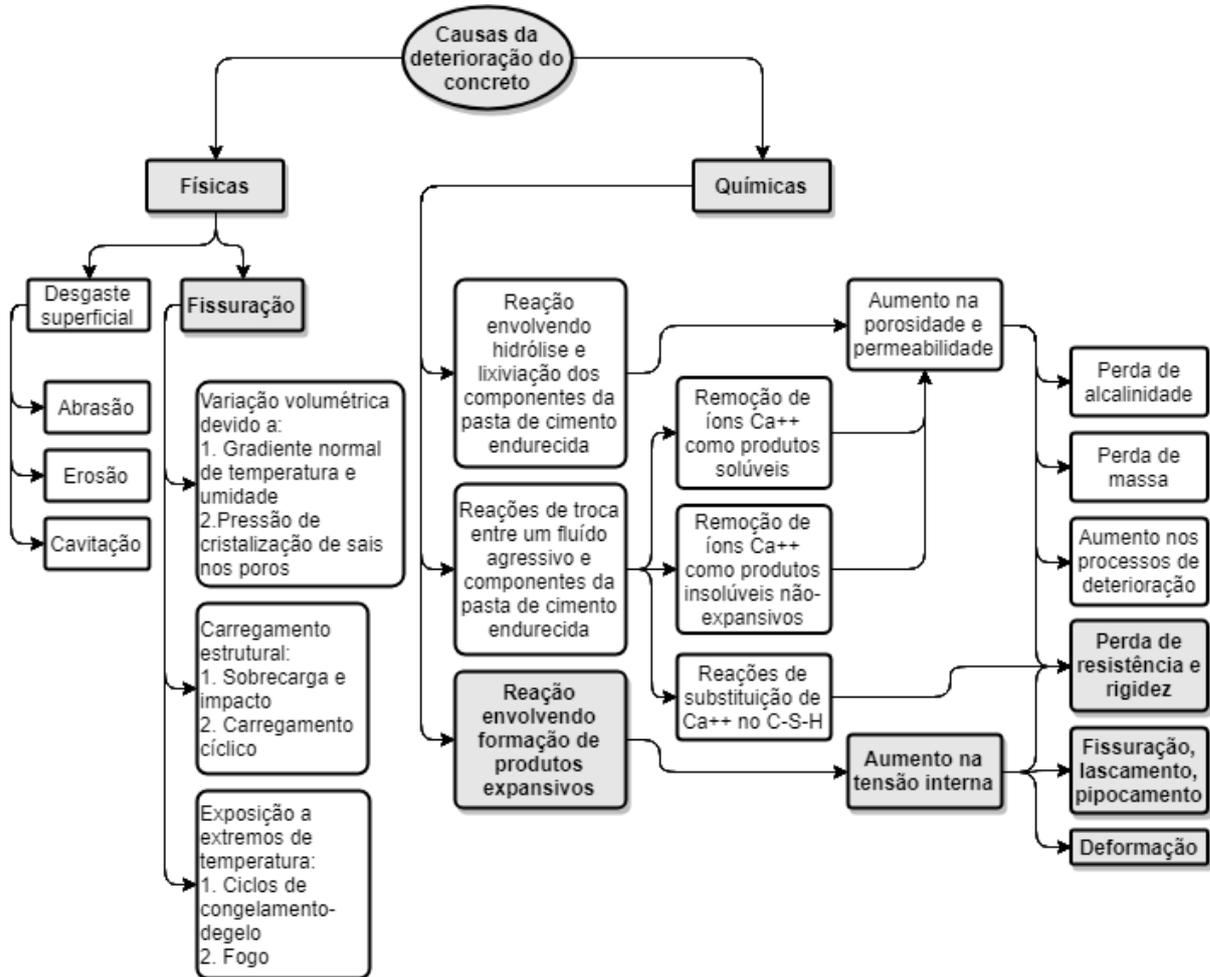
A fim de melhor organizar a estrutura da fundamentação teórica, os assuntos foram divididos nos seguintes subtítulos:

- a) Deterioração do concreto: panorama geral da deterioração do concreto pela fissuração e danos subsequentes;
- b) Autocicatrização dos materiais cimentícios: breve histórico do tema, termos específicos, mecanismos de autocicatização;
- c) Conceitos fundamentais relacionados à autocicatrização bacteriana: conhecimentos necessários para a compreensão da autocicatrização pela precipitação de CaCO_3 induzida por bactérias;
- d) Avanços recentes no estudo de bactérias como agentes de autocicatrização: principais estudos desenvolvidos na área durante os últimos 10 anos e identificação das lacunas de pesquisa.

2.1 DETERIORAÇÃO DO CONCRETO

A introdução deste trabalho demonstra que o concreto é amplamente utilizado, assim como possui limitada durabilidade, e é inevitavelmente afetado pelo surgimento de fissuras. Mehta e Monteiro (2014) demonstram uma série de mecanismos que levam à deterioração do concreto, os quais foram resumidos na Figura 2. Pode-se observar que uma gama de processos físicos e químicos causam a degradação do material, sendo a fissuração um evento presente em ambos os caminhos.

Figura 2 – Mecanismos físicos e químicos de deterioração do concreto

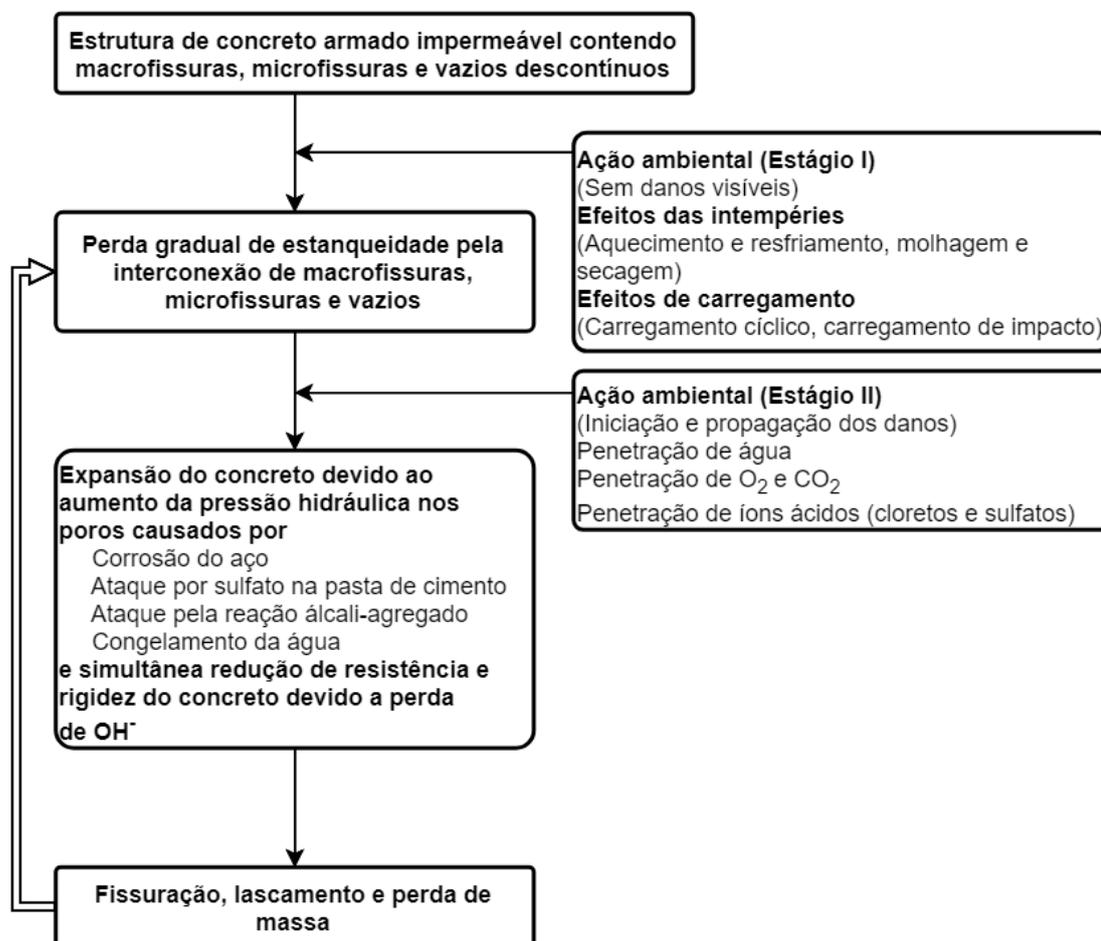


Fonte: Mehta e Monteiro (2014), adaptado por Muller (2019).

É relevante notar que a fissuração se relaciona intimamente com outras formas de deterioração, sendo uma delas a perda de rigidez e de resistência do material, reduzindo, portanto, sua capacidade portante. Recena (2014) afirma que um concreto sem vazios internos é inviável de ser fabricado, havendo uma porosidade e uma microfissuração intrínsecas ao material. Esses poros, naturais ao concreto, tornam-se um problema quando se interconectam por fissuras que se desenvolvem na matriz, tornando-se caminhos que possibilitam a entrada de agentes agressivos no material (MEHTA; MONTEIRO, 2014). A literatura apresenta que a abertura de uma fissura, isto é, sua espessura, é diretamente proporcional ao seu coeficiente de permeabilidade (REINHARDT; JOOSS, 2003), o qual, por sua vez, correlaciona-se com a durabilidade do concreto (RECENA, 2014).

Mehta e Monteiro (2014) desenvolvem ainda um “modelo holístico da deterioração do concreto a partir dos efeitos ambientais mais frequentes”. A Figura 3 apresenta este modelo.

Figura 3 – Modelo holístico de deterioração do concreto



Fonte: Mehta e Monteiro (2014, p. 195), adaptado por Muller (2019).

Os autores propõem que a deterioração do concreto se dá em dois estágios distintos. No Estágio I ocorre uma perda gradual da estanqueidade do material, resultado das intempéries e do próprio carregamento imposto às estruturas. Neste estágio, poucos ou nenhum dano são observados. No Estágio II, danos mais severos surgem e se propagam, resultado da penetração de água e de agentes agressivos. Nesta etapa o material sofre fissuração, perda de massa e perda de resistência e de rigidez (em correlação ao apresentado na Figura 2).

Analisando este modelo, Mehta e Monteiro (2014) percebem que a manutenção da impermeabilidade do material e a prevenção à fissuração podem condicionar o concreto ao Estágio I de deterioração. Fica claro de se entender que tal cenário

aumentaria a durabilidade do concreto, dado que, uma vez no Estágio II, a fissuração ocorrida retroalimenta a sua deterioração.

A Norma Brasileira (NBR) 6118 (ABNT, 2014), que dispõe dos requisitos exigíveis para o projeto de estruturas de concreto simples, armado ou protendido, discrimina aberturas máximas de fissuras de acordo com o tipo de concreto (simples, armado ou protendido) e de acordo com a classe de agressividade ambiental ao qual o material estará exposto. Os níveis de protensão, quando aplicáveis, também influem nas exigências quanto à fissuração. Para as estruturas em concreto armado, a abertura máxima de fissuras permitida pela norma é de 0,4 mm.

Ainda, a NBR 12655 (ABNT, 2015a) especifica requisitos para realização da dosagem dos concretos de acordo com as mesmas classes de agressividade ambiental apresentadas na NBR 6118 (ABNT, 2014). Dado isso, entende-se que os concretos dosados conforme os requisitos aplicados tendem a atender as exigências quanto à fissuração dispostas pela NBR 6118 (ABNT, 2014). Apesar disso, a fissuração é complexa e depende de diversos fatores, sendo que Mehta e Monteiro (2014), por exemplo, elencam um total de 17 causas que levam ao surgimento de fissuras, sendo este surgimento passível de ocorrência desde os 10 minutos após o lançamento do concreto, até anos após a concretagem.

Ainda em relação aos documentos citados, percebe-se que o impacto do meio ambiente sobre as estruturas depende de sua localização e dos mecanismos de deterioração, sendo ainda os danos causados majorados pela presença da fissuração. Caso ocorram fissuras em locais com maior classe de agressividade ambiental, há maior possibilidade de progressão dos danos agravados pela corrosão das armaduras.

2.2 AUTOCICATRIZAÇÃO DOS MATERIAIS CIMENTÍCIOS

As pesquisas sobre a autocicatrização dos materiais cimentícios tiveram início em 1994, havendo um *boom* na quantidade de artigos publicados a partir de 2001. Nesta conjuntura, em 2005 a *International Union of Laboratories and Experts in Construction Materials, Systems and Structures* (RILEM) criou o comitê técnico SHC 221 para estudo da autocicatrização do concreto, o qual foi encerrado em 2013, culminando na publicação do volume *Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials* (DE ROOIJ et al., 2013), que reúne os conhecimentos adquiridos até então.

Após isso, foi criado um novo comitê, o SHE, objetivando reunir os conhecimentos mais recentemente adquiridos (CAPPELLESSO, 2018), o qual foi finalizado em 2020, mas sem nenhuma publicação realizada até o momento.

Há de se notar que ocorre uma variação linguística dentro da terminologia adotada pelos pesquisadores na área da autocicatrização. Internacionalmente, termos como *self-healing*, *self-repairing* e *self-closing* são vistos, porém nem sempre com coerência entre seu significado, o que é evidenciado ao ler as definições dadas em diferentes publicações¹. Embora ainda não exista alguma publicação nacional que defina os termos característicos da área, o grupo de pesquisa no qual o autor deste trabalho atua espelha-se nas definições internacionais mais comuns e tem se habituado na utilização de termos para distinção entre diferentes mecanismos e ações, os quais são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Termos da área de estudo adotados no trabalho

<i>Ação</i> <i>Mecanismo</i>	<i>Autocicatrização</i>	<i>Autorregeneração</i>
<i>Autógeno</i>	Não há a recuperação da resistência inicial do material A autocicatrização é promovida por materiais/agentes intrínsecos ao concreto	Há a recuperação e/ou superação da resistência inicial do material A autorregeneração é promovida por materiais/agentes intrínsecos ao concreto
<i>Autônomo</i>	Não há a recuperação da resistência inicial do material A autocicatrização é promovida por materiais/agentes incomuns ao concreto	Há a recuperação e/ou superação da resistência inicial do material A autorregeneração é promovida por materiais/agentes incomuns ao concreto

Fonte: Elaborado pelo autor com base em estudos científicos da nota 1.

Conforme o Quadro 1, uma das ações que ocorre nos materiais é a autocicatrização. Nela, ocorre apenas o fechamento das fissuras, devolvendo ao material sua estanqueidade. Por outro lado, a autorregeneração é entendida como a ação na qual o concreto recupera não somente sua estanqueidade, mas também suas propriedades mecânicas. Quanto aos dois mecanismos que levam à

¹ Tal fato torna-se mais facilmente perceptível através dos termos utilizados nos trabalhos de De Rooij, Schlangen e Joseph (2013), Igarashi, Kunieda e Nishiwaki (2009) e Mihashi e Nishiwaki (2012)

autocicatrização ou à autorregeneração, dois subitens apresentados adiante (2.2.1 e 2.2.2) os esclarecerão em maiores detalhes. Ao longo deste trabalho, estas definições são respeitadas, uniformizando os dados.

Preocupando-se com a efetiva aplicabilidade dos concretos autocicatrizantes, Alyousif (2016) elenca propriedades desejáveis ao material. De acordo com o pesquisador, a autocicatrização deve ser:

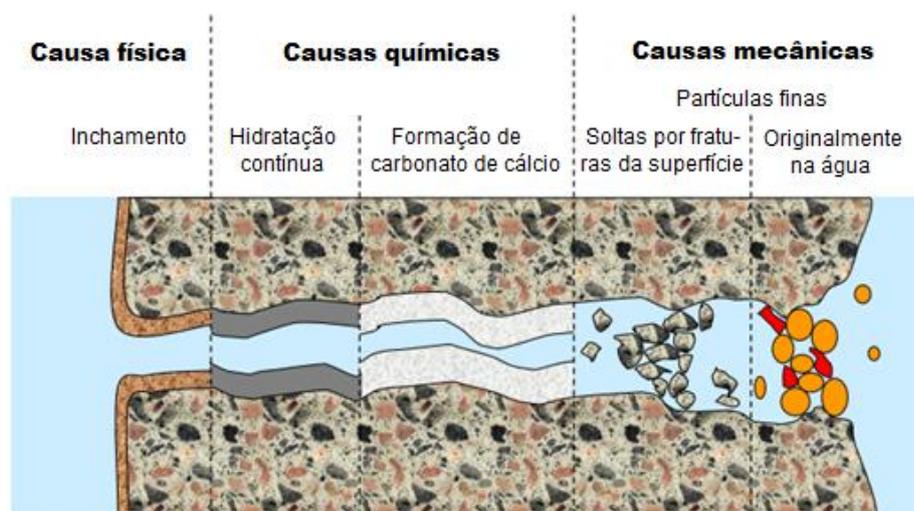
- a) Robusta: previsível e confiável em ambientes de exposição comuns;
- b) Pervasiva: disponível onde e quando for necessária;
- c) Estável: permanecer ativa ao longo da vida útil da estrutura;
- d) Repetível: atuar em múltiplos eventos de fissuração;
- e) Econômica: viável para a indústria da construção civil.

De acordo com as delimitações à que este trabalho se propõe, dentre estas propriedades, algumas serão avaliados ao longo do programa experimental deste estudo, conforme será discutido no item 3.

2.2.1 Mecanismos autógenos

De acordo com as definições dadas anteriormente, a autocicatrização autógena é promovida por materiais que são corriqueiramente utilizados nos concretos. Conforme Reinhardt *et al.* (2013), são distinguidas causas físicas, químicas e mecânicas que causam a autocicatrização autógena, sendo todas elas indicadas na Figura 4.

Figura 4 – Causas da autocicatrização autógena



Fonte: Reinhardt *et al.* (2013, p. 65), traduzido pelo autor.

Como causa física, o inchamento da pasta de cimento hidratada nas faces de uma fissura causa uma redução na sua espessura. Como causas químicas, são apontadas a hidratação contínua das partículas anidras de cimento presentes na matriz e a formação de CaCO_3 na superfície das fissuras. A hidratação do cimento anidro atua gerando novos produtos de hidratação, os quais são aproximadamente duas vezes maiores que as partícula anidras, preenchendo parte das fissuras. Por outra via, íons de cálcio presentes na solução dos poros reagem com carbonatos dissolvidos em água e presentes na fissura, precipitando cristais de CaCO_3 na sua superfície (processo comumente conhecido por carbonatação). Por fim, partículas soltas por eventuais fraturas da matriz ou presentes na própria água que percola pelas fissuras podem atuar colmatando-as (REINHARDT et al., 2013).

Cappellesso (2018) aponta que há relevância para os estudos envolvendo a autocicatrização autógena, visto que com mudanças na matriz é possível intensificar este fenômeno que já ocorre nos concretos. Além disso, há a vantagem da dispensa na adição de materiais “estranhos” ao concreto, contribuindo, inclusive, para a possibilidade de reciclagem futura do material (VAN BREUGEL, 2007).

Ainda assim, é possível observar que diversos estudos que se referem à autocicatrização autógena, focam na hidratação contínua do cimento (ALDEA et al., 2000; EDVARSEN, 1999; PACHECO, 2020; REINHARDT; JOOSS, 2003; SCHLANGEN; HEIDE; BREUGEL, 2007; YANG; YANG; LI, 2011). Sabe-se, também, que a autocicatrização autógena pela hidratação contínua do cimento tende a limitar-se a fissuras que surgem em idades iniciais do concreto (JOSEPH et al., 2010).

No entanto, cabe apontar que, para que exista uma maior oferta de cimento anidro na matriz, uma das possibilidades está em se recorrer a um aumento do consumo de cimento dos concretos. Conforme já evidenciado no item 1 deste trabalho, a produção de cimento *Portland* é responsável por grande quantidade dos impactos ambientais negativos da fabricação do concreto. Desta forma, alternativas à autocicatrização autógena mostram-se necessárias, sendo, então, os mecanismos autônomos apresentados no item seguinte.

2.2.2 Mecanismos autônomos

O primeiro mecanismo autônomo a se considerar é a adição de materiais pozolânicos ao concreto². Estudos foram desenvolvidos avaliando o uso de cinza volante, escória de alto forno e sílica ativa como agentes de autocicatrização (ALYOUSIF, 2016; ŞAHMARAN; LI, 2009). As pozolanas atuam na autocicatrização pela sua hidratação secundária, isto é, sua reação com o hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) presente no concreto, levando à formação de silicato de cálcio hidratado (C-S-H) (MEHTA; MONTEIRO, 2014), o que leva ao preenchimento das fissuras.

Çopuroğlu *et al.* (2013) e Li *et al.* (2013) compilaram uma série de estudos que estudaram produtos de caráter mais avançado como potenciais agentes promotores da autocicatrização dos materiais cimentícios, tais como: nitrito de cálcio, cianoacrilato, resina epóxi, metil metacrilato, poliuretano, óleo de tungue, hidróxido de sódio e silicato de sódio. Os autores ainda demonstram que o uso destes agentes está, geralmente, associado ao seu encapsulamento, evitando sua atuação prematura no concreto ainda íntegro. Como forma de encapsulamento é visto o uso de: polímeros superabsorventes, fibras porosas de polipropileno, tubos de vidro e de acrílico, microcápsulas esféricas a base de gelatina, poliuretano e cápsulas de gel de sílica.

Estudos não contemplados nas revisões feitas por Çopuroğlu *et al.* (2013) e Li *et al.* (2013) (ALGHAMRI; KANELLOPOULOS; AL-TABBAA, 2016a; SISOMPHON; COPUROGLU; FRAAIJ, 2011) utilizaram monofluorofosfato de sódio e silicato de sódio em argila expandida e outro agregado leve sem identificação. Além destes, pesquisas realizadas pelo grupo de estudos em concretos autocicatrizantes da UNISINOS, dentro do qual esta dissertação está inclusa, utilizaram, também, silicato de sódio e aditivo cristalizante encapsulado em argila expandida e em perlita expandida (EHRENBRING, 2020; PACHECO, 2020).

Finalmente, a autocicatrização autônoma do concreto pode ocorrer pela adição de bactérias ao material. Por haver um caráter de grande interdisciplinaridade entre engenharia e biologia neste tema, o item 2.3 a seguir discorre de conceitos básicos a

² É discutível o caráter autônomo ou autógeno da adição de pozolanas no concreto, dado que o uso de pozolanas se tornou comum no Brasil, culminando em uma normativa com especificação de diversos cimentos com adições pozolânicas (ABNT, 2018). Decidiu-se pela consideração como mecanismo autônomo, dado que esta foi a classificação feita por De Rooij, Schlangen e Joseph (2013) e atentando-se, também, que a oferta de materiais pozolânicos é limitada e cara em determinados países (AFIFUDIN *et al.*, 2011).

fim de melhor compreender os mecanismos de atuação das bactérias que levam à precipitação de calcita induzida microbiologicamente (MICP, de *microbiologically induced calcite precipitation*, traduzido pelo autor). Após, no item 2.4 são apresentados avanços recentes no estudo da autocicatrização pela MICP.

2.3 CONCEITOS FUNDAMENTAIS RELACIONADOS À AUTOCICATRIZAÇÃO BACTERIANA

Antes de prosseguir com o estudo dos concretos autocicatrizantes pela MICP e a fim de melhor compreender a atuação das bactérias neste processo, este item apresenta conceitos e conhecimentos em microbiologia necessário a isso. De início, é necessário compreender que uma bactéria é um ser vivo, e como tal é formada por células, mais especificamente por uma única célula. Tal qual todas as células existentes, as bactérias possuem metabolismo, isto é, absorvem nutrientes do ambiente em que estão e os transformam em um subproduto, o qual é excretado de volta ao ambiente. É desta transformação, que se dá através de reações bioquímicas, que as células liberam energia, permitindo a manutenção da vida e sua multiplicação (MADIGAN et al., 2016).

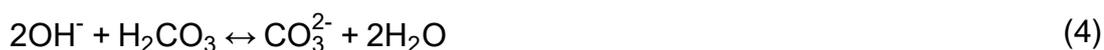
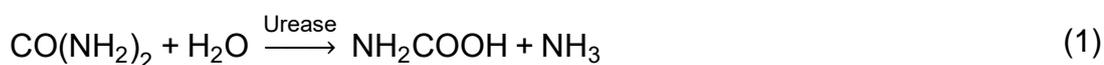
De Belie e Wang (2015) demonstram uma grande variedade de metabolismos que levam à MICP, sendo eles apresentados na Tabela 1. Com relação a esta variedade apresentada, os autores afirmam não haver estudos que explorem bactérias autotróficas, além de que as heterotróficas possuem maior capacidade de realizar a MICP. Também, Wang *et al.* (2017) corroboram dizendo que os estudos existentes se concentram na utilização de bactérias decompositoras de ureia e oxidadoras de componentes orgânicos.

Tabela 1 – Metabolismos viáveis para precipitação de calcita induzida microbiologicamente

Bactérias autotróficas	Bactérias heterotróficas	
	Metabolismo assimilativo	Metabolismo dissimilativo
Metanogênese não-metilotrófica ³	Decomposição de ureia	Oxidação de carbono orgânico por via aeróbia ou anaeróbia
Fotossíntese anoxigênica		
Fotossíntese oxigênica	Amonificação de aminoácidos	

Fonte: De Belie e Wang (2015, p. 2), adaptado e traduzido pelo autor.

O metabolismo assimilativo por hidrólise (decomposição) de ureia ocorre devido à necessidade bacteriana de nitrogênio, dado que suas células são compostas por aproximadamente 13% deste elemento (MADIGAN et al., 2016). Os microrganismos capazes de precipitar CaCO_3 a partir da presença de ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), o fazem com auxílio da enzima urease, sendo ela responsável por reduzir a energia necessária à reação, catalisando a hidrólise de ureia em ácido carbâmico (NH_2COOH) e em amônia (NH_3), como apresenta a equação 1. Seguindo o processo, as equações 2 e 3 mostram a hidrólise espontânea do ácido carbâmico em ácido carbônico (H_2CO_3) e em amônia, a qual, por sua vez, equilibra-se com água para formar amônios (NH_4^+) e hidróxidos (OH^-). Finalmente, os íons hidróxido reagem na presença do ácido carbônico, gerando carbonatos (CO_3^{2-}) (Equação 4), que, então, na presença de um íon de cálcio (Ca^{2+}), forma o CaCO_3 (Equação 5) (DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010).

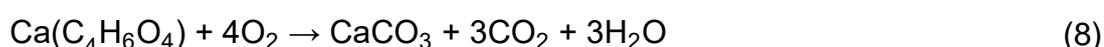
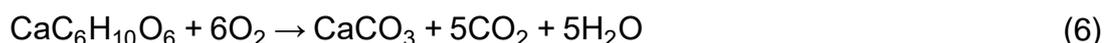


³ O autor não apresenta referência clara quanto à esta informação, enquanto outros estudos indicam a metanogênese como um metabolismo associado a arqueias, e não a bactérias (ABREU, 2007; ALVES, 2018).

Estudos na autocicatrização pela MICP por hidrólise de ureia fazem uso das espécies *Bacillus* sp., *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Sporosarcina pasteurii*⁴, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus flexus* (MÜLLER; PACHECO; TUTIKIAN, 2019). Dentre os gêneros utilizados, percebe-se uma predominância das bactérias do gênero *Bacillus* dada sua resistência frente ao ambiente alcalino do concreto (JONKERS et al., 2010).

De Muynck, De Belie e Verstraete (2010) denominam a MICP por hidrólise de ureia como a mais simples e rápida dentre os metabolismos estudados. Apesar disso, quando analisadas as equações (1) a (5), observa-se que a produção de 1 mol de CaCO₃ está atrelada a produção de 2 mols de amônio. De acordo com De Muynck, De Belie e Verstraete (2010), Jonkers *et al.* (2010) e Seifan, Samani e Berenjian (2016), esta produção de amônio representa um grande potencial de liberação de óxido de nitrogênio na atmosfera.

Em contraponto ao metabolismo assimilativo de hidrólise de ureia, o metabolismo dissimilativo de oxidação de carbono orgânico é a forma de obtenção de energia de um grupo de bactérias denominadas quimiorganotróficas (MADIGAN et al., 2016). Tomando duas fontes de carbono orgânico como exemplo, a oxidação de lactato de cálcio e de acetato de cálcio é apresentada nas equações 6, 7 e 8, 9, respectivamente. As equações 6 e 8 mostram que o lactato de cálcio (CaC₆H₁₀O₆) e o acetato de cálcio (Ca(C₄H₆O₄)) são oxidados em CaCO₃, gerando dióxido de carbono (CO₂) e água como subprodutos. Além disto, o dióxido de carbono reage com o hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) presente na matriz cimentícia produzindo ainda mais CaCO₃ (Equações 7 e 9) (ALAZHARI et al., 2018b; JONKERS et al., 2010). Jonkers *et al.* (2010) fazem notar que esta reação secundária do dióxido de carbono com o hidróxido de cálcio é a mesma reação de carbonatação natural do concreto, porém acelerada pelo metabolismo bacteriano.



⁴ Denominado em certos estudos como *Bacillus pasteurii*, porém houve reclassificação taxonômica após estas publicações (WANG et al., 2017).



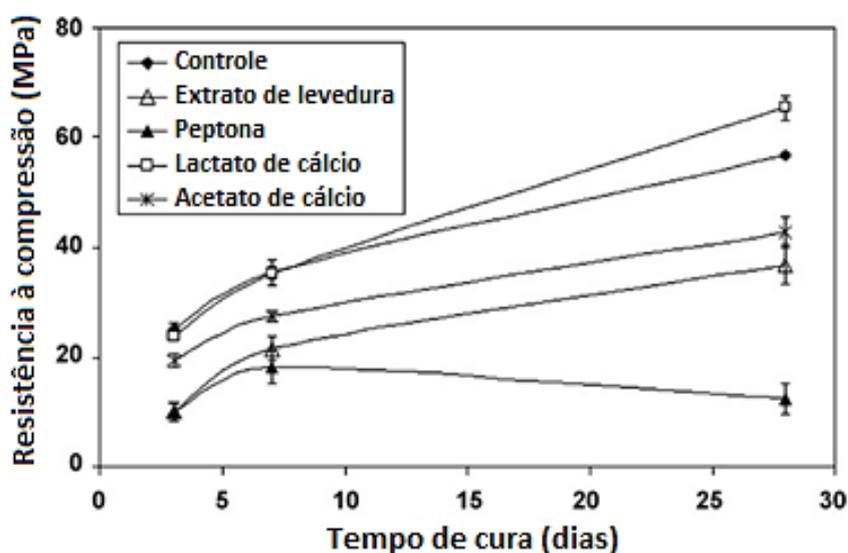
Com relação às espécies utilizadas para MICP por oxidação de componentes orgânicos, é visto o uso de *Bacillus* sp., *Bacillus pseudofirmus*, *Bacillus cohnii* e *Bacillus alkalinitrilicus* (MÜLLER; PACHECO; TUTIKIAN, 2019). Novamente, observa-se o uso majoritário de bactérias do gênero *Bacillus*.

À luz do conhecimento das reações que levam à MICP, percebe-se necessário o fornecimento de nutrientes⁵ cálcicos às bactérias. (MÜLLER; PACHECO; TUTIKIAN, 2019), ao analisarem uma série de estudos sobre a autocicatrização pela MICP, verificaram a utilização de nitrato de cálcio, cloreto de cálcio, acetato de cálcio e lactato de cálcio. Com relação a estes compostos, é apontado que o cloreto de cálcio pode levar à corrosão das armaduras do concreto, havendo uma maior utilização do nitrato de cálcio e, principalmente, do lactato de cálcio (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). Ainda, Müller, Pacheco e Tutikian (2019) apontam a utilização de nutrientes complexos como extrato de levedura, extrato de carne e peptona.

Considerando potenciais influências dos nutrientes nas propriedades resistentes do concreto, Jonkers *et al.* (2010) adicionaram diferentes nutrientes diretamente na mistura fresca de concreto. A quantidade adicionada foi de 1% em relação à massa de cimento, e foi analisada a resistência à compressão do concreto para cada nutriente adicionado. Os resultados, expostos na Figura 5, demonstram que o extrato de levedura e o acetato de cálcio levam a um decréscimo da resistência à compressão a cerca da metade do valor da amostra controle. Já a adição de peptona mostra-se bastante prejudicial neste aspecto, levando à uma drástica perda de resistência. Por fim, a adição de lactato de cálcio mostrou pouca influência até 7 dias de análise, e uma leve melhora na resistência aos 28 dias. Luo e Qian (2016) e Sierra-Beltran, Jonkers e Schlangen (2014) também verificaram acréscimo na resistência à compressão do concreto com adição de lactato de cálcio.

⁵ Nos estudos originais, quase sempre chamados “*organic precursors*” ou “*chemical precursors*” (Respectivamente, “precursores orgânicos” e “precursores químicos”. Traduzido pelo autor)

Figura 5 – Desenvolvimento da resistência à compressão nos concretos com incorporação de extrato de levedura, peptona, lactato de cálcio ou acetato de cálcio



Fonte: Jonkers *et al.* (2010, p. 233), traduzido pelo autor.

Além destas questões, Khaliq e Ehsan (2016) explicam que materiais são adicionados ao concreto junto às bactérias, para que atuem imobilizando-as e protegendo-as do ambiente agressivo do concreto, além de evitar o esmagamento das células durante a formação dos compostos hidratados do cimento (JONKERS; THIJSSSEN, 2010). Diversos os estudos publicados utilizam agregados leves para esta finalidade (ALAZHARI *et al.*, 2018a; JIANG *et al.*, 2020; LUCAS *et al.*, 2018; MULLER *et al.*, 2022; SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014; WIKTOR; JONKERS, 2011; ZHANG *et al.*, 2017b).

Buscando alternativas mais avançadas e/ou mais sustentáveis e/ou que tragam melhoria em outras propriedades dos concretos e das argamassas, outros materiais têm sido estudados para encapsulamento das bactérias. Ao realizarem uma revisão bibliográfica, Khaliq e Ehsan (2016) verificaram a utilização desde materiais formados por sol-gel, até técnicas de microencapsulamento e uso de poliuretano. Os próprios autores utilizaram em seu programa experimental agregados leves e nanoplaquetas de carbono para imobilização de *Bacillus subtilis*. Finalmente, demais estudos fazem uso de hidrogéis (WANG *et al.*, 2015, 2018, 2014b), lodo granular (SONG *et al.*, 2021), areia de fundição (CHEN; QIAN; HUANG, 2016; XU *et al.*, 2020; XU; WANG; WANG, 2018), zeólito (YUAN *et al.*, 2022), partículas pirolisadas de carvão vegetal (KUA *et al.*, 2019), nano/microplaquetas de grafite (KHUSHNOOD *et al.*, 2022),

nano/micro/milipartículas de óxido de ferro, de calcário e de areia silicosa (KHUSHNOOD et al., 2019), agregado reciclado de concreto (KHUSHNOOD et al., 2020) e fibras naturais (RAUF et al., 2020), por exemplo.

2.4 AVANÇOS RECENTES NO ESTUDO DE BACTÉRIAS COMO AGENTES DE AUTOCICATRIZAÇÃO

Com o objetivo de trazer informações atualizadas a respeito do estado da arte no estudo da autocicatrização, os estudos relacionados neste capítulo foram publicados entre os anos de 2013 e 2022. O ano de 2013 foi definido como limite para análise dado ser o ano de publicação do *Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials* (DE ROOIJ et al., 2013) pelo SHC 221. Além da delimitação de data, buscando trazer os estudos de maior relevância e impacto científico, foram considerados apenas aqueles publicados em periódicos de estrato A1 ou A2 nas áreas de avaliação “Engenharias I”, “Materiais” e “Biotecnologia” pelo Qualis Periódicos, da Plataforma Sucupira, no quadriênio 2013-2016.

2.4.1 Adição direta de bactérias na água de amassamento

Conforme indicado anteriormente, diversos estudos realizam o encapsulamento das bactérias antes de as inserir na matriz cimentícia. Ainda assim, há uma grande quantidade de publicações que analisam o uso direto das bactérias no momento de mistura dos compósitos cimentícios⁶. Andalib *et al.* (2016), Qian *et al.* (2016) e Siddique *et al.* (2016a, 2016b) realizam a inserção de bactérias do gênero *Bacillus*, linhagem AKKR5, e verificaram que houve a ocorrência de MICP na forma de preenchimento de fissuras e de poros e vazios internos do compósito, aumentando a resistência à compressão e reduzindo a absorção de água, a permeabilidade e a porosidade do material.

Luo e Qian (2016) realizaram a secagem das bactérias, adicionando-as na forma de pó na água de amassamento, avaliando a sua influência, bem como de diferentes fontes de cálcio, na reologia do material. A adição de lactato de cálcio

⁶ Ao longo do item 2.4 são referenciados estudos em concreto, em *engineered cementitious composite* (ECC, em tradução do autor, compósito cimentício avançado), em argamassa, ou mesmo em pasta. Assim, por conveniência, adotou-se geralmente o uso do termo “compósito cimentício” para se referir aos materiais estudados, evitando demasiada desorientação na leitura do texto.

atrasou a hidratação do cimento, estendendo o tempo de pega, o que também levou a uma menor resistência à compressão em idades iniciais, mas não aos 28 dias, onde a resistência foi superior aos demais traços analisados. Já a adição de formato de cálcio e de nitrato de cálcio levaram a uma redução do tempo de pega, e, no caso do nitrato de cálcio, a uma perda indesejada na resistência à compressão. Conforme os autores apontam, as diferenças nas resistências obtidas podem ser resultado de diferentes tamanhos de poros desenvolvidos, o que também foi observado nas análises realizadas. Observa-se que a maior resistência à compressão obtida neste estudo pela adição de lactato de cálcio já havia sido observada por Jonkers *et al.* (2010).

Corroborando com os resultados obtidos em estudos anteriores, Siddique *et al.* (2017) verificaram um acréscimo de 10-12% na resistência à compressão aos 28 dias pela adição da linhagem AKKR5 diretamente na água de amassamento. Além disso, foi vista redução da absorção de água, da porosidade, da absorção capilar e da permeabilidade aos cloretos de 42-48%, 52-56%, 54-78% e 10%, respectivamente, além de não haver influência das bactérias no abatimento do concreto em estado fresco. Reduções nestas mesmas propriedades dos materiais foram também observadas por Hosseini Balam, Mostofinejad e Eftekhar (2017a), Kalhori, Bagherpour (2017) Rizwan *et al.* (2017), e por Ling e Qian (2017), estes últimos utilizando bactérias secas em pó, assim como Luo e Qian (2016).

Diversos estudos deram prosseguimento ao estudo de diferentes espécies (*B. megaterium* MTCC 10086, *S. pasteurii* MTCC 1761, *B. cohnii* MTCC 10221, *Bacillus halodurans* DSM 497, *B. subtilis*, *S. pasteurii* ATCC 11859) adicionadas diretamente ao compósito cimentício, sendo sempre observado a melhora das propriedades mecânicas e a redução da penetração à água e à agentes agressivos (CHAURASIA *et al.*, 2019; NAIN *et al.*, 2019; SU *et al.*, 2019; TAYEBANI; MOSTOFINEJAD, 2019; ZHANG; DING; QIAN, 2019).

Karimi e Mostofinejad (2020) adicionaram *B. subtilis* PTCC 1254 liofilizadas tanto na água de amassamento, quanto como tratamento superficial em concreto reforçado com fibras. Em consenso com diversos estudos anteriores, os autores observaram reduções na entrada de agentes agressivos, sendo as reduções mais expressivas nas amostras já moldadas com bactérias. Um estudo (JANG *et al.*, 2020) destaca-se por ter observado uma queda na resistência à compressão e um aumento na porosidade do material pela adição de *Lysinibacillus sphaericus* YS11 e *Bacillus*

alkaliphilus AK13, secas por atomização, em conjunto à extrato de levedura e à lactato de cálcio, todos adicionados diretamente na água de amassamento. Os autores observaram que a redução se deu em função dos nutrientes adicionados à matriz, havendo uma perda de 28% na resistência à compressão aos 28 dias em relação à referência.

Avançando na avaliação da autocicatrização em matrizes avançadas, Jadhav *et al.* (2018) buscaram respostas sobre o comportamento de *S. pasteurii* em matrizes compostas unicamente por cimentos geopoliméricos. Os autores concluíram que não há necessidade para encapsulamento das bactérias neste tipo de matriz, além de comprovarem a precipitação de CaCO_3 nas fissuras do material. Outras alterações em propriedades das compósitos observadas pela adição de bactérias na água de amassamento são: aumento na hidrofobia da superfície do compósito (QU *et al.*, 2021), aumento na velocidade de propagação de ondas ultrassônicas, sendo diretamente relacionado à uma densificação da matriz (QIAN *et al.*, 2021a), redução de até 40% na carga passante pela matriz em teste rápido de permeabilidade à cloretos (KARIMI; MOSTOFINEJAD, 2020), atraso na pega do cimento quando feita adição de nutrientes diretamente na matriz, devido à presença de carboidratos (BASARAN BUNDUR; KIRISITS; FERRON, 2015). Foi também documentado que, pelo uso de *Bacillus mucilaginous* L3 há a captura de CO_2 do ar para realizar a MICP, através da enzima anidrase carbônica, produzindo uma matriz não somente autocicatrizante, mas que também captura o CO_2 atmosférico (QIAN *et al.*, 2016).

2.4.2 Adição de bactérias encapsuladas

A adição de bactérias diretamente na matriz tem apresentado resultados satisfatórios, conforme apresentado anteriormente. Porém, de acordo com Jonkers *et al.* (2010) e Lee e Park (2018), devido à fatores como elevada compacidade, pH alcalino e baixo teor de oxigênio, por exemplo, o ambiente da matriz cimentícia não é o mais favorável à sobrevivência dos microrganismos. Dessa forma, buscando uma melhoria nos resultados obtidos, uma linha paralela de pesquisa realiza o encapsulamento das bactérias antes de sua inserção na matriz cimentícia.

Qian *et al.* (2021a) compararam a adição de *B. mucilaginous* L3 na forma de pó, diretamente na matriz cimentícia, ou encapsulados (material das cápsulas não informado pelos autores). Com relação à resistência à compressão, é observada uma

redução em todas as idades quando realizada a adição das cápsulas. Aos 28 dias, a resistência atingida pelo compósito com adição direta é de aproximadamente 51 MPa, enquanto com a adição das cápsulas houve uma redução para cerca de 43 MPa. Em termos de cicatrização, as amostras com adição direta cicatrizaram até cerca de 89% da área da fissura, frente cerca de 99% de cicatrização para as bactérias encapsuladas. Uma melhora também foi observada na permeabilidade das amostras: as bactérias adicionadas diretamente levaram a uma redução deste parâmetro em aproximadamente 89%, ao passo que a adição das cápsulas resultou em uma redução de cerca de 99%. Além das propriedades do compósito cimentício em si, os autores propuseram um método para fabricação de ambos os concretos autocicatrizantes (bactérias encapsuladas ou não) em uma planta industrial, apontando que a fabricação do compósito com cápsulas é mais trabalhosa e onerosa.

Um estudo comparando a adição de *B. subtilis* diretamente na água de amassamento ou encapsulando-as em agregados leves e em nanoplaquetas de grafeno foi desenvolvido por Khaliq e Ehsan (2016). Foi verificado que, aos 3 e 7 dias, a cicatrização foi melhor nas amostras com nanoplaquetas de grafeno, ao passo que, aos 14 e 28 dias, as amostras com agregados leve apresentaram melhores resultados. Os autores apontam que as nanoplaquetas não resistem as pressões multiaxiais geradas na matriz durante a hidratação do cimento em idades avançadas. Além disso, os autores puderam mostrar que não ocorreu a desintegração do lactato de cálcio na matriz (para adição de ~5% da massa de cimento) em magnitude suficiente para que não houvesse nutrientes suficientes para MICP.

Chen, Qian e Huang (2016) e Tziviloglou *et al.* (2016) encapsularam *Bacillus* sp. em areia de fundição e em argila expandida, respectivamente. Ambos os estudos levaram à resultados positivos, sendo interessante ressaltar que Tziviloglou *et al.* (2016) observaram o consumo de oxigênio no interior das fissuras devido à atuação bacteriana, o que, por consequência, leva à redução na corrosão das armaduras. Ainda, os autores avaliaram a cura das amostras em ciclos de molhagem e secagem ou submersas em água. Foi vista uma maior redução na permeabilidade das amostras curadas em ciclos de molhagem e secagem, o que os autores atribuem à maior MICP devido à maior oferta de oxigênio.

Xu e Wang (2018) e Xu, Wang e Wang (2018) encapsularam *S. pasteurii* em cápsulas desenvolvidas com cimento de sulfoaluminato de cálcio e em cápsulas de areia de fundição, respectivamente. Os resultados dos traços com areia de fundição

indicam a cicatrização de fissuras de até 0,273 mm aos 28 dias, com acréscimos de 24% na resistência à compressão e redução de 27% na absorção de água. Nas amostras com cápsulas de cimento de sulfoaluminato, a cicatrização foi de até 0,417 mm aos 28 dias, com 130% de recuperação na resistência à compressão e 50% de recuperação na impermeabilidade das amostras previamente fissuradas.

Foi testado o uso de perlita expandida e argila expandida (ZHANG *et al.*, 2017b), com cicatrização aos 28 dias de fissuras de até 0,79 mm e 0,45 mm, respectivamente. A viabilidade no uso de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro também foi validada por Seifan *et al.* (2018a, 2018b, 2018c, 2018d), com o encapsulamento se dando pela atração eletrostática da parede celular com as nanopartículas. Os resultados indicam a ocorrência de autocicatrização por análise visual, uma redução na penetração de água e um aumento na resistência à compressão causado pelas nanopartículas. O uso de perlita expandida também foi avaliado por Zhang *et al.* (2019b) ao encapsularem *B. cohnii* e 2 consórcios de lodo ativado revestindo a cápsula com geopolímero para aumento de sua resistência. Novamente, foram observados resultados positivos para o uso da perlita, com cicatrização de fissuras de até 1,22mm aos 28 dias, sendo observada também uma redução na permeabilidade à água.

Chen *et al.* (2019) e Shaheen *et al.* (2019) utilizaram, respectivamente, xisto expandido e micro/nanopartículas de óxido de ferro e de bentonita como cápsulas. Foi verificada a cicatrização com o uso de ambas as cápsulas. Quanto ao uso das micro/nanopartículas de óxido de ferro, houve também uma recuperação de 85% da resistência à compressão do concreto. Buscando alternativas para reuso de resíduos, Xu *et al.* (2019) mostraram viabilidade no uso de borracha de sucata de pneu como cápsulas para *S. pasteurii* ATCC 11859. Os autores apontam que uma menor granulometria de cápsulas leva a uma maior autocicatrização, o que está de acordo com Khaliq e Ehsan (2016), que afirmam que cápsulas menores dispersam-se por mais pontos da matriz. Xu *et al.* (2019) ainda mostram que a resistência à compressão é afetada negativamente em idades iniciais, porém supera a resistência do concreto referência aos 28 dias. Em termos de espessura cicatrizada, os autores chegam a um valor de 0,86 mm.

Um estudo precursor foi desenvolvido por Alazhari *et al.* (2018) utilizando perlita expandida como cápsulas para *B. pseudofirmus* DSM 8715 e para acetato de cálcio e extrato de levedura, separando, porém, os nutrientes e as bactérias em cápsulas

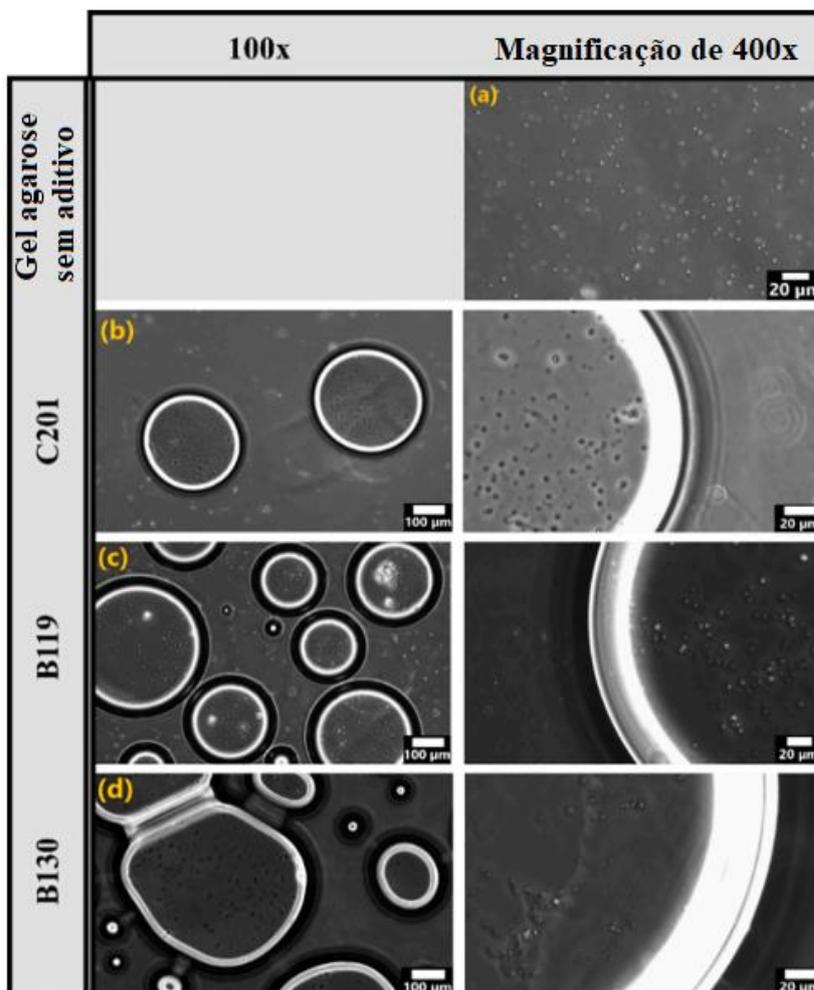
distintas. Os autores alteraram as proporções das cápsulas no material, verificando quais proporções retornariam melhores propriedades ao concreto. Através de análise visual da superfície da fissura e da absorção de água apenas na região fissurada, foi observado que 60 a 70% das cápsulas contendo nutrientes e 40 a 30% contendo bactérias levaram aos melhores resultados, com 100% de cicatrização superficial e taxa de absorção de cerca de 0,24 ml/m²/s aos 10 minutos e 0,10 ml/m²/s aos 120 minutos. Outras publicações analisam variados materiais para encapsulamento, sendo eles alginato de cálcio (FAHIMIZADEH et al., 2020), poliureia (ZAMANI et al., 2020), grãos de concreto aerado (TAN et al., 2020), além daqueles já apresentados ao final do item 2.3 deste trabalho. No geral, todos os estudos apresentaram resultados positivos, cada qual com suas particularidades. Destacam-se: o desenvolvimento de cápsulas em que se pode definir a sua fragilidade, de forma a refinar o nível de tensão em que se deseja que as cápsulas rompam e liberem o agente cicatrizante (ZAMANI et al., 2020) e a verificação que o Ca(OH)₂ da matriz atua como fonte de cálcio para MICP, assim como os demais nutrientes geralmente empregados (TAN et al., 2020).

Outra alternativa desenvolvida para encapsulamento é o uso de bolhas de ar incorporado na matriz cimentícia. Parastegari, Mostofinejad e Poursina (2019) incorporaram 5% e 8% de ar no concreto como proteção para *S. pasteurii* ATCC 11859. Os autores, entretanto, não fissuraram nenhuma amostra, restringindo sua análise às propriedades do compósito cimentício íntegro. Foi observado que a adição das bactérias levou à um aumento médio de 34% da resistividade elétrica do compósito cimentício, o que os autores atribuíram à precipitação de CaCO₃ como uma fina camada na superfície da amostra, aumentando a resistência à entrada de agentes agressivos como cloretos. Também foi constatado uma penetração de íons cloreto até 28% menor para as amostras com bactérias. Por fim, imagens de MEV indicam uma maior quantidade de poros nas amostras sem *S. pasteurii*, sendo justificado que na presença de bactérias os poros são preenchidos pelo CaCO₃ precipitado por elas.

Justo-Reinoso et al. (2022) também avaliaram bactérias, neste caso *B. cohnii* DSM 6307, adicionadas juntamente com aditivo incorporador de ar para seu encapsulamento em ar incorporado durante a mistura do compósito cimentício. Foram analisados diferentes aditivos incorporadores de ar, sendo que houve sucesso no encapsulamento *in vitro* das bactérias dentro das bolhas de ar em gel agarose, como indicado na Figura 6. É possível observar que os autores utilizaram diferentes aditivos

incorporadores de ar (C201, B119 e B130; identificações derivadas de seus nomes comerciais) e em todos os casos as bactérias foram devidamente encapsuladas dentro das bolhas, enquanto a quantidade de bactérias no gel é muito baixa. Apenas são encontradas bactérias no gel na ausência de ar incorporado (Figura 6a).

Figura 6 – Encapsulamento de *Bacillus cohnii* com diferentes aditivos incorporadores de ar: (a) controle (sem aditivo), (b) C201, (c) B119 e (d) B130



Fonte: Justo-Reinoso *et al.* (2022, p. 6), traduzido pelo autor.

Ainda na publicação de Justo-Reinoso *et al.* (2022), é observada uma redução das resistências à compressão e à flexão pela adição de nutrientes, o que está de acordo com o estudo de Luo e Qian (2016), mas também pela adição de ar incorporado na matriz cimentícia. Como resultados positivos, é documentada uma redução de até 18% na permeabilidade à água pela adição de bactérias com aditivo incorporador de ar, além de eficácia na autocicatrização de fissuras induzidas após 9 meses de cura e de um baixo custo para produção de uma matriz autocicatrizante

com encapsulamento de bactérias em ar incorporado. Finalmente, os autores apontam que as estruturas cristalinas formadas possuem clivagem romboédrica ou deformada⁷, sendo ambas estruturas formadas por CaCO₃.

2.4.3 Bioprospecção de bactérias

Diferentes estudos realizam um processo de bioprospecção de novas bactérias para uso como agente de autocicatrização. Tal método é aplicado, por exemplo, por Achal, Mukerjee e Reddy (2013), Algaifi *et al.* (2021), Amer Algaifi *et al.* (2020), Chaerun, Syarif e Wattimena (2020) e Joshi, Goyal e Sudhakara Reddy (2021). Os ambientes do qual as bactérias foram isoladas são: oleodutos de petróleo (CHAERUN; SYARIF; WATTIMENA, 2020), cimento (ACHAL; MUKERJEE; REDDY, 2013; JOSHI; GOYAL; SUDHAKARA REDDY, 2021) e solo (ALGAIFI *et al.*, 2021; AMER ALGAIFI *et al.*, 2020). Dentre os autores, Algaifi *et al.* (2021) e Amer Algaifi *et al.* (2020) se destacam por fornecerem uma descrição detalhada do processo completo de isolamento e caracterização dos microrganismos.

Para obtenção das bactérias, Amer Algaifi *et al.* (2020) realizaram a coleta de 1g de solo e suspenderam em um meio de cultura (solução com nutrientes para o metabolismo bacteriano) por 24 horas para o crescimento dos microrganismos ali presentes. Em seguida foi feito um plaqueamento por estrias⁸ para obtenção dos microrganismos isolados⁹, sendo esta técnica repetida até a obtenção de placas de Petri contendo um único isolado em cada uma delas. Após isto, as colônias dos isolados foram examinadas morfológicamente à olho nu¹⁰.

Após obtenção dos isolados, Algaifi *et al.* (2021) e Amer Algaifi *et al.* (2020) fizeram sua identificação molecular através de uma série de procedimentos.

⁷ Conforme texto original “*deformed actinomorphie*”, termo não encontrado em nenhuma outra publicação que compõe a bibliografia deste trabalho, ou mesmo em pesquisa bibliográfica relacionada à cristalografia. Pesquisa por “*actinomorphie*” em bases de dados científicas indicam publicações no ramo da botânica, que parece ser o ramo de origem do termo, dado que também são encontrados estudos na área de semicondutores utilizando o termo em alusão ao formato floral de estruturas cristalinas formadas por alguns óxidos, ao exemplo do estudo de Zhang *et al.* (2018). Ainda assim, cabe observar que tais estruturas “florais” apresentadas não possuem semelhança com as “deformadas” observadas por Justo-Reinoso *et al.* (2022).

⁸ Para evitar um texto demasiadamente longo, nem todas as técnicas de microbiologia são detalhadas profundamente. Para compreensão completa, caso desejado, sugere-se a consulta de Madigan *et al.* (2016).

⁹ Daqui para frente, tratados apenas como “isolados”.

¹⁰ As colônias formadas por cada espécie de bactéria divergem em características visíveis a olho nu, tais como formato, tamanho e cor (ALGAIFI *et al.*, 2021).

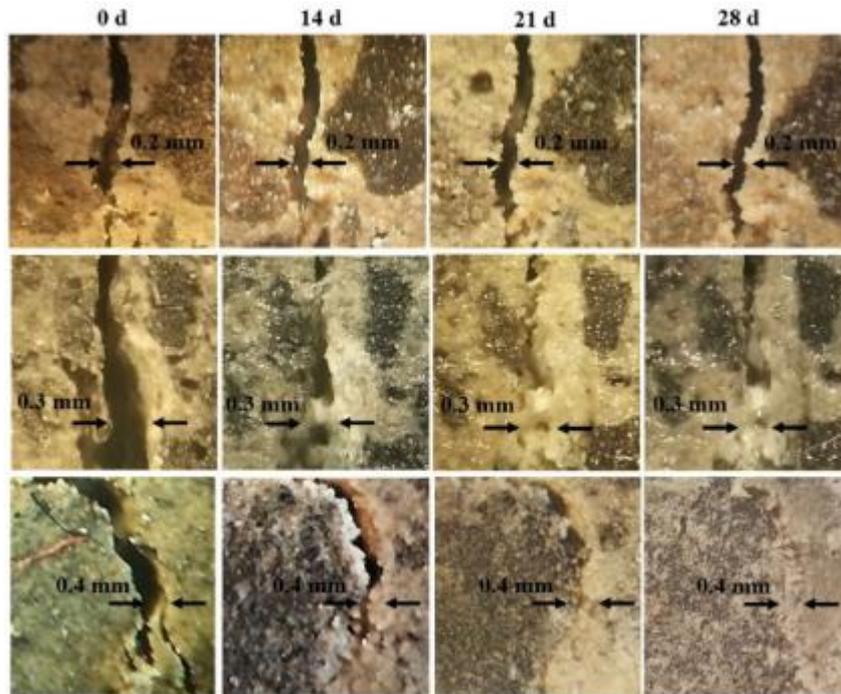
Inicialmente, foi feita a extração do DNA dos isolados e a amplificação da região específica do gene 16S rRNA via reação em cadeia da polimerase (PCR) com diferentes *primers*. O produto da reação foi sujeito à uma série de ciclos em diferentes temperaturas, sendo em seguida purificado e separado por eletroforese para a análise da pureza e da concentração do gene 16S rRNA amplificado. Finalmente, o gene foi sequenciado e foi checada sua similaridade com outras sequências genéticas depositadas na base *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Com isso, por comparação e percentual de similaridade, é dada a taxonomia dos isolados.

2.4.3 Técnicas de análise dos produtos de cicatrização

Diversas são as análises realizadas em bibliografia relacionadas à autocicatrização dos materiais cimentícios, como microscopias ópticas e eletrônicas no espectro de luz visível ou no infravermelho, ensaios de permeabilidade ao ar e à água, velocidade de propagação de ondas ultrassônicas e ensaios mecânicos, por exemplo (GUPTA; PANG; KUA, 2017). As técnicas abordadas neste item serão aquelas realizadas neste estudo: microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) e difração de raios X (DRX). Diversos dos autores citados ao longo deste referencial utilizam estas técnicas, tendo análises de resultados muito semelhante. Dessa forma, apenas alguns exemplos de cada técnica são apresentados a seguir dadas as similaridades observadas.

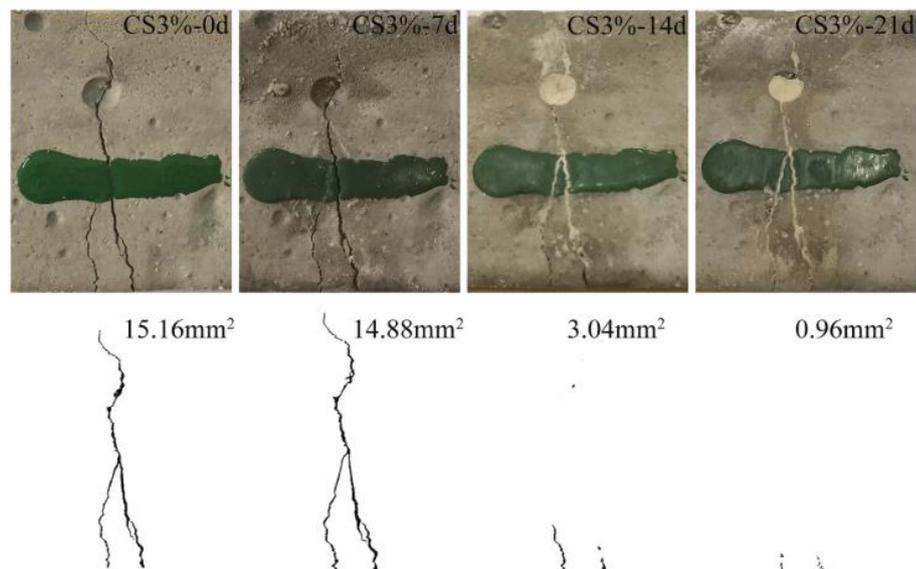
A análise por microscopia óptica possibilita o acompanhamento visual de uma fissura por um período determinado, tendo alguns exemplos detalhados a seguir. Chaerun, Syarif e Wattimena (2020) demonstraram através da microscopia óptica a cicatrização, caracterizada pela deposição de cristais esbranquiçados na fissura, promovida por *L. sphaericus* SKC/VA-1 ao longo de 28 dias. A Figura 7 apresenta o processo de autocicatrização visualizado, sendo possível observar a escala das fissuras cicatrizadas. Outras técnicas podem ser aliadas à microscopia óptica, como por exemplo uma binarização das imagens em preto e branco, possibilitando a quantificação de pixels pretos (fissura) e sua diminuição (cicatrização) ao longo do tempo. Este procedimento foi realizado, por exemplo, por Wu *et al.* (2020) e é apresentado na Figura 8.

Figura 7 – Microscopia ótica para acompanhamento da autocicatrização



Fonte: Chaerun, Syarif e Wattimena (2020, p. 4).

Figura 8 – Microscopia ótica com binarização para mensuração da área da fissura

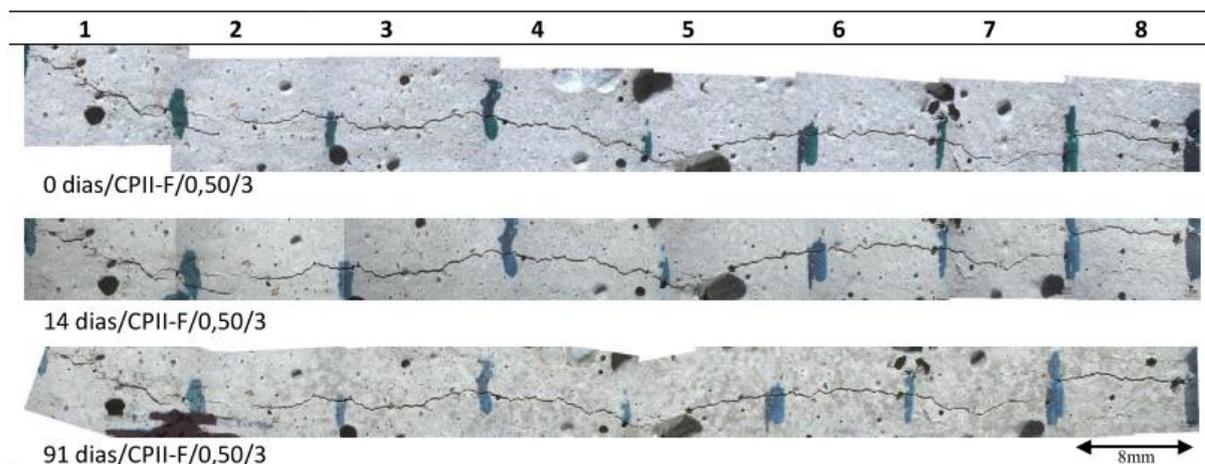


Fonte: Wu *et al.* (2020, p. 9).

Ainda, Cappellesso (2018) registrou imagens de microscopia ao longo da extensão de fissuras. Com isso, a autora realizou posteriormente o tratamento das imagens de forma a obter uma imagem em boa qualidade que apresente toda a

extensão da fissura reconstituída, possibilitando uma análise em maior escala. A Figura 9 apresenta o resultado obtido através desta técnica.

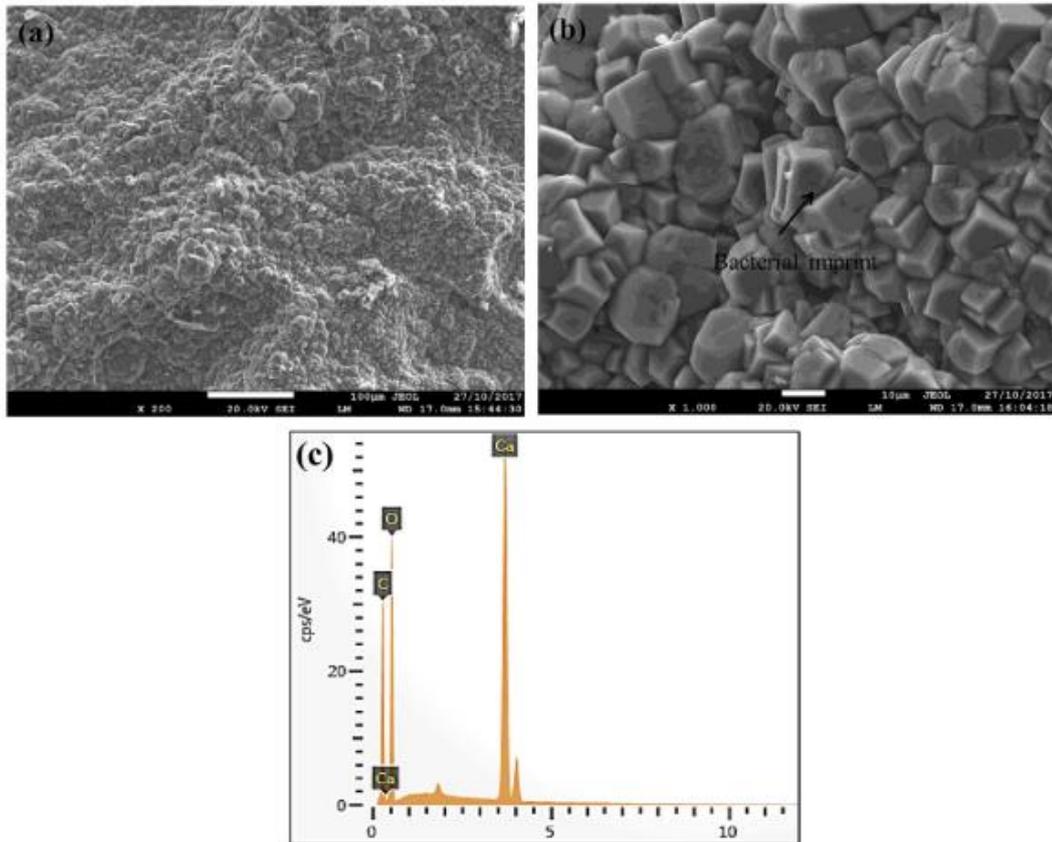
Figura 9 – Microscopia óptica com reconstituição de uma fissura ao longo de toda a sua extensão



Fonte: Cappelleso (2018, p. 115).

Avançando para análises em menor escala, distintos autores utilizam MEV para análise da morfologia dos produtos de cicatrização formados nas amostras. Wang *et al.* (2018) utilizaram esta técnica, associada à EDS, sendo possível observar a presença de cristais de aparência cúbica, os quais tiveram sua composição química elementar avaliada por EDS, resultando na presença de Ca, O e C, tendo os autores indicado que os cristais observados tratam-se de calcita. As imagens que basearam tais análises podem ser observadas na Figura 10.

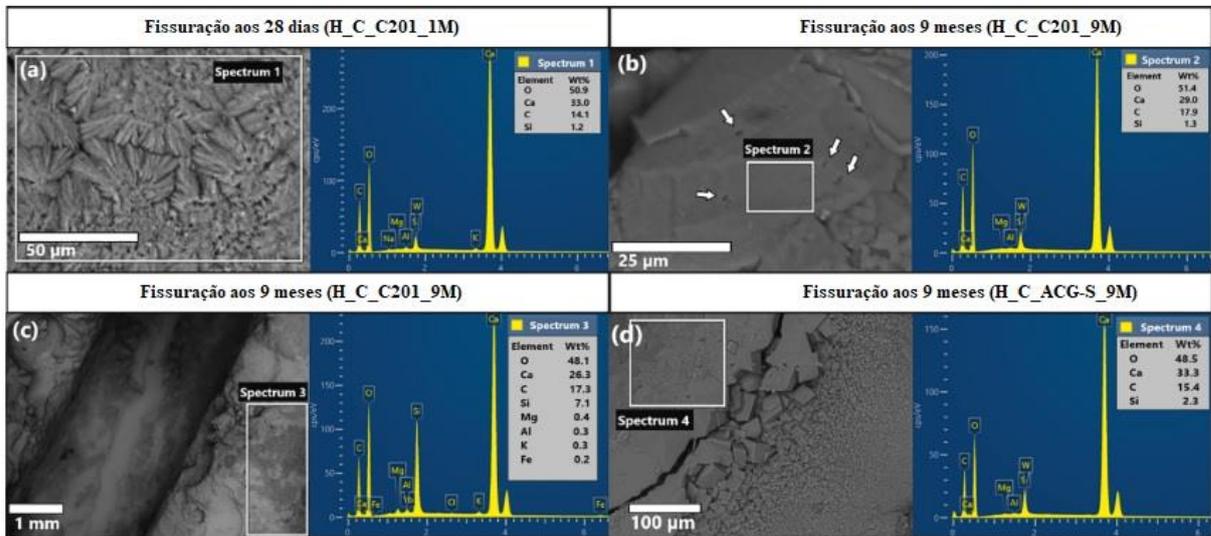
Figura 10 – (a, b) MEV apresentando cristais ao longo do interior da fissura e (c) EDS indicando sua composição química elementar



Fonte: Wang *et al.* (2018, p. 320).

Outros autores também realizaram as mesmas análises via MEV e EDS, encontrando novamente cristais formados por Ca, O e C, além de observar Si em menor quantidade (Figura 11a, b e c) e Mg, Al, K e Fe (Figura 11d) (JUSTO-REINOSO *et al.*, 2022).

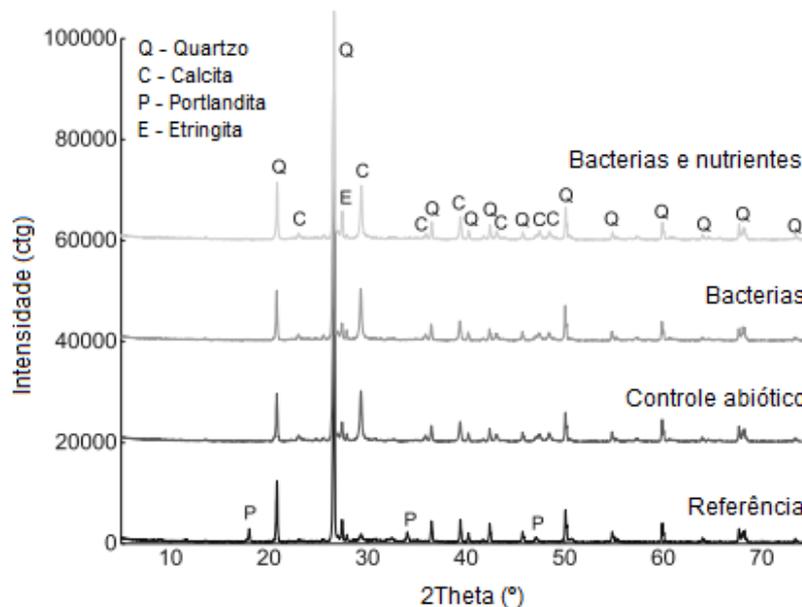
Figura 11 – Micrografias de MEV e análises de EDS em diferentes amostras, com enfoque (a, b e c) nos produtos de cicatrização e (d) na matriz cimentícia



Fonte: Justo-Reinoso *et al.* (2022, p. 13), traduzido pelo autor.

Análises de DRX foram realizadas por Xu, Wang e Wang (2018) e Yuan *et al.* (2022) nos produtos de cicatrização formados nas amostras. Em ambos os estudos, os resultados indicam que os precipitados são formados por calcita, sendo visto também por Xu, Wang e Wang (2018) (Figura 12) a presença de quartzo, atribuído à areia utilizada como agregado miúdo, e portlandita e etringita, dois hidratos do cimento.

Figura 12 – Análise de DRX em produtos de cicatrização



Fonte: Xu, Wang e Wang (2018, p. 3126), traduzido pelo autor.

Conforme todo o cenário apresentado ao longo do item 2.4, observa-se um avanço nas técnicas utilizadas para elaboração dos materiais cimentícios autocicatrizantes. Vários estudos vêm sendo publicados não somente em periódicos com enfoque em materiais de construção civil, mas também na área de microbiologia aplicada e biotecnologia, reflexo da interdisciplinaridade envolvida no desenvolvimento do assunto. Diversas frentes de estudo avançam simultaneamente, avaliando diferentes matrizes, diferentes agentes de cicatrização e diferentes métodos para inserção destes agentes nas matrizes.

Uma quantidade reduzida de estudos, porém, analisa a autocicatrização que ocorre pela adição de bactérias junto à ar incorporado no concreto. Ainda, os estudos realizados não possuem como enfoque a investigação das estruturas cristalinas formadas, exceto a publicação recente de Justo-Reinoso *et al.* (2022), que analisou os precipitados morfologicamente e elementarmente. Além disso, poucos estudos realizam o isolamento de bactérias para uso como agente de autocicatrização das matrizes cimentícias. Desta forma, esta lacuna de pesquisa é ocupada pelo desenvolvimento desta dissertação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As variáveis envolvidas na avaliação do potencial de formação de produtos de cicatrização são as apresentadas na Tabela 2, definidas com base nos objetivos da pesquisa, assim como na sua delimitação.

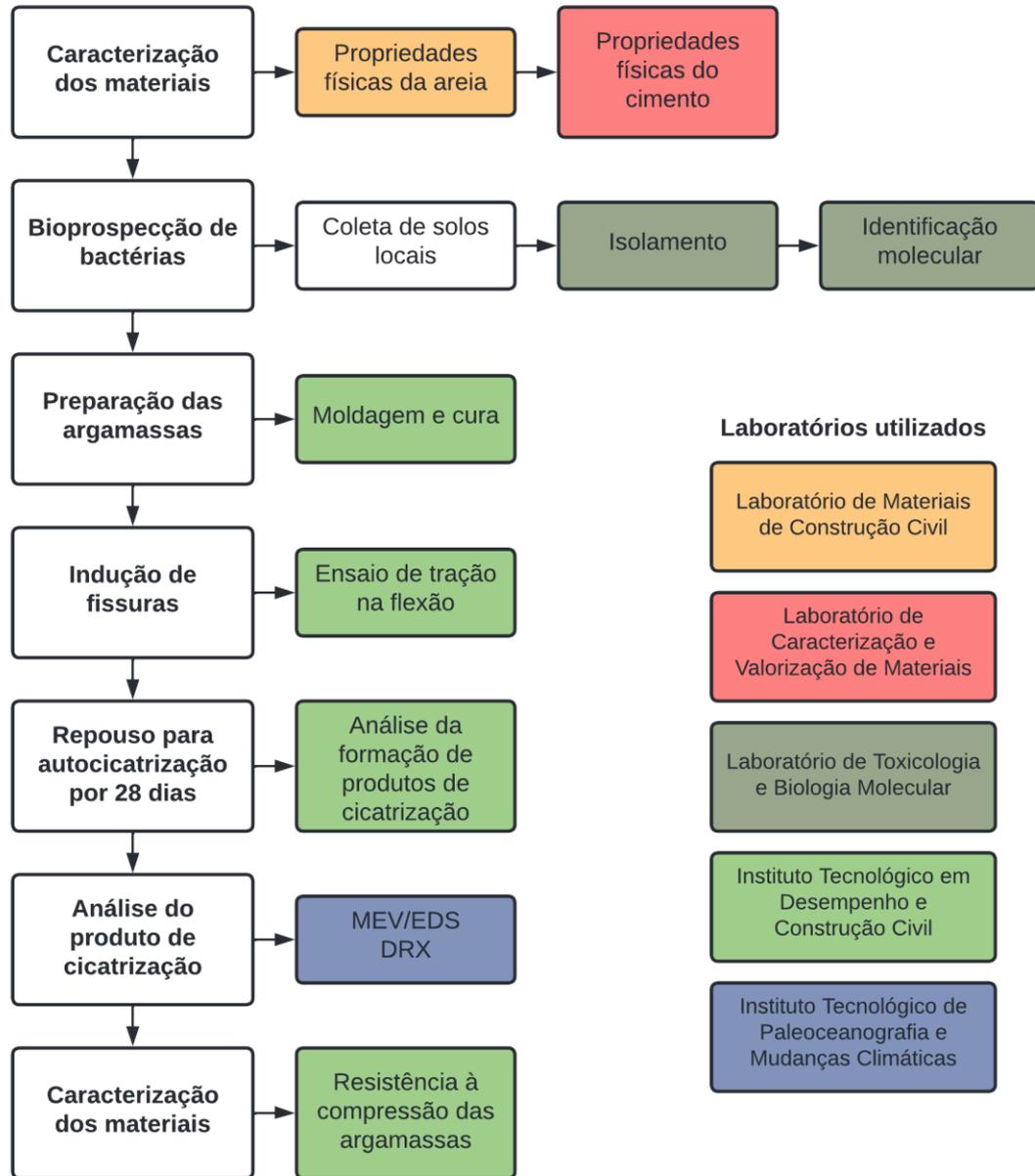
Tabela 2 – Variáveis deste estudo

Variável de controle	Variáveis fixas	Variáveis de resposta
- Linhagens de bactérias	- Tempo de crescimento bacteriano - Fonte de cálcio para autocicatrização - Traço da argamassa - Teor de aditivo incorporador de ar - Condição de cura	- Presença de produtos de cicatrização em fissuras até os 28 dias pós-fissuração - Morfologia dos produtos de cicatrização - Composição elementar dos produtos de cicatrização - Mineralogia dos produtos de cicatrização - Resistência à compressão aos 7 e aos 28 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nestas variáveis, foi desenhado o programa experimental que é apresentado de forma resumida na Figura 13. Cada tópico apresentado nessa figura corresponde a um item dentro deste capítulo, no qual se explicará em detalhes os procedimentos realizados. Todos os laboratórios e instalações utilizados se encontram na UNISINOS.

Figura 13 – Etapas principais do programa experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

O traço utilizado neste estudo consiste em uma argamassa que já foi avaliada em termos de autocicatrização pelo uso de *B. subtilis* AP 91 por Muller *et al.* (2022) e Schwantes-Cezario, Nogueira e Toralles (2017). Os autores realizaram a adição das bactérias diretamente na matriz cimentícia (SCHWANTES-CEZARIO; NOGUEIRA; TORALLES, 2017) e em cápsulas de perlita expandida (MULLER *et al.*, 2022). Nesta

dissertação, propõe-se o uso de bolhas de ar incorporado na matriz cimentícia como meio de sobrevivência das bactérias dentro da matriz cimentícia. Dessa forma, adicionou-se ao traço aditivo incorporador de ar. A composição é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição e características do traço empregado

Traço unitário		Relação água/cimento	Teor de aditivo incorporador de ar (em relação à massa de cimento)	Teor de ar incorporado (ABNT, 2020)
Cimento	Areia			
1,00	1,00	0,4	0,35%	18%

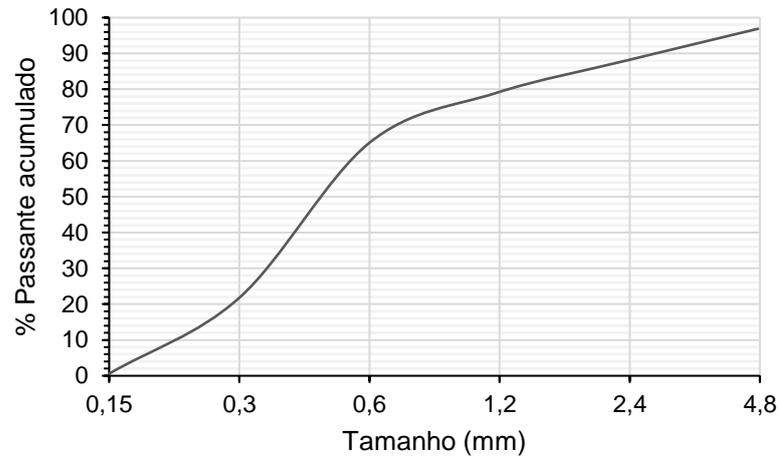
Fonte: Elaborado pelo autor.

O cimento utilizado é do tipo CP V, não apresentando adições pozolânicas (ABNT, 2018), o que evita a ocorrência de autocicatrização autônoma por reações pozolânicas. Desta forma, a autocicatrização que ocorrer no material será autógena (a qual ocorreria indiferente do tipo de cimento) ou autônoma pela atuação das bactérias. O aditivo incorporador de ar utilizado é o Centrament Air 200, produzido pela MC-Bauchemie. A quantidade de aditivo adicionada foi definida como o valor intermediário entre os teores mínimo (0,20% em relação à massa de cimento) e máximo (0,50% em relação à massa de cimento) recomendados pelo fabricante.

A caracterização da areia foi feita conforme as NBRs vigentes, determinando-se sua distribuição granulométrica (ABNT, 2022) e sua densidade nas condições seca e saturada superfície seca (ABNT, 2021). O gráfico da distribuição granulométrica da areia é apresentado na Figura 14 e sua dimensão máxima característica, seu módulo de finura e suas densidades são apresentadas na Tabela 4.

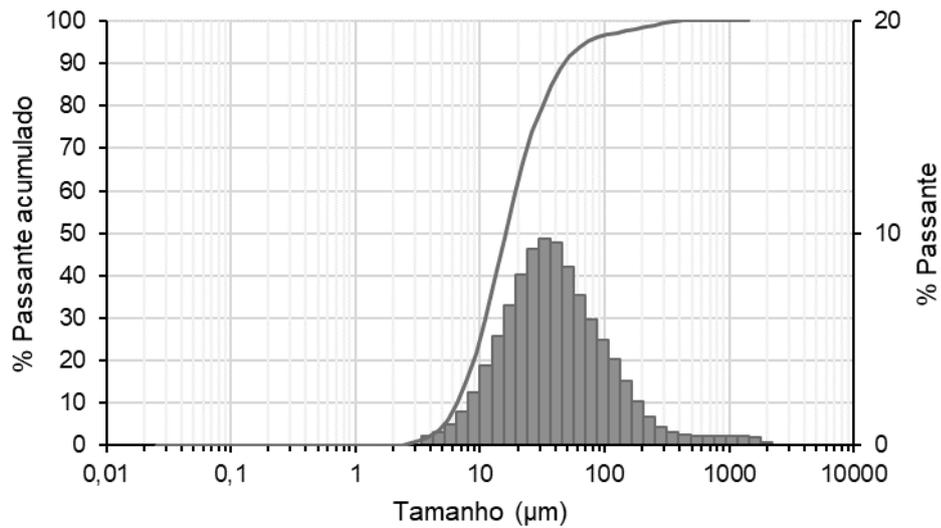
O cimento foi caracterizado quanto à distribuição granulométrica por ensaio de granulometria a laser via úmida com álcool isopropílico P.A. como solvente, e utilizando equipamento Microtrac, modelo S3500. A distribuição granulométrica do cimento é apresentada na Figura 15. Foi determinada também a área superficial por isothermas Brunauer, Emmett e Teller (BET), utilizando equipamento TriStar Plus, da marca Micromeritics, e o software MicroActive for TriStar II Plus 2.02 para tratamento dos dados. Para a execução do ensaio a amostra foi tratada a 200°C à vácuo por 24h. Por fim, foi determinada a massa específica pelo método do picnômetro, utilizando gás hélio (resultados apresentados na Tabela 4).

Figura 14 – Distribuição granulométrica da areia



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Distribuição granulométrica do cimento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Propriedades físicas da areia e do cimento

Material	Propriedade	Valor
Areia	Densidade na condição seca	2,56 g/cm ³
	Densidade na condição saturada superfície seca	2,59 g/cm ³
	Dimensão máxima característica	4,75 mm
	Módulo de finura	3,49
Cimento	Área superficial	1,3642 ± 0,0038 m ² /g
	Massa específica	2,6981 ± 0,0018 g/cm ³

Fonte: Elaborado pelo autor.

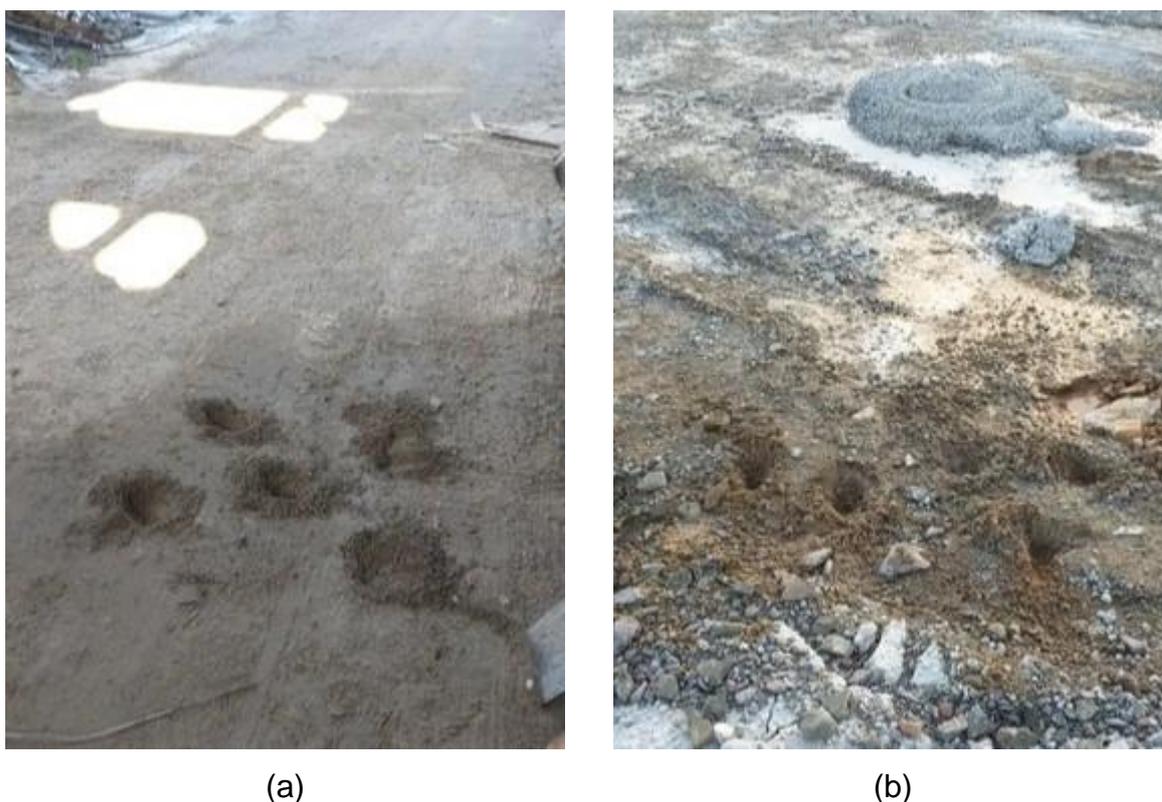
Após a moldagem das argamassas (descrito no item 3.3 a seguir) foram determinadas suas resistências à compressão através dos procedimentos descritos na NBR 7215 (ABNT, 2019), utilizando uma amostragem de 3 corpos de prova e considerando o maior valor obtido como resistência potencial à compressão. Em especial para esta análise, foram moldadas amostras referência, sem a presença de nutrientes e bactérias, mas com o mesmo teor de aditivo incorporador de ar das demais amostras. As idades de ensaio foram de 7 e de 28 dias.

3.2 BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS

Para encontrar uma ou mais bactérias capazes de realizar a MICP, foi realizado um procedimento de isolamento de microrganismos do solo. Foram coletadas 5 amostras em cada um dos dois solos analisados, provenientes de ambientes industriais com exposição ao cimento *Portland*, sendo a coleta feita na tarde do dia 23 de maio de 2022. Os solos coletados foram identificados como **A** e **B**. O solo **A** possui aspecto arenoso, não coesivo, levemente úmido e foi coletado no pátio de uma fábrica de estruturas pré-fabricadas em concreto, próximo ao silo de cimento da fábrica, que fica localizada na cidade de Porto Alegre – RS. A coleta se deu em temperatura e umidade relativa do ar (UR) aproximadas de 15 °C e 100 %. O solo **B** foi coletado próximo às baias de estoque de agregados de uma concreteira localizada na cidade de Novo Hamburgo – RS, em temperatura e UR aproximadas de 22 °C e 60,5 %. O aspecto deste solo é argiloso, bastante úmido e coesivo, além de estar contaminado

com resíduos cimentícios. A Figura 16 apresenta os pontos de coleta dos solos. Ao coletar solos de ambientes expostos ao cimento, as microbiotas ali presentes possivelmente estão adaptadas para algumas das condições químicas às quais serão expostas dentro da matriz cimentícia, como, por exemplo, o pH alcalino, o calor de hidratação e o baixo teor de oxigênio, fatores de preocupação comuns nos estudos que envolvem a MICP (JONKERS et al., 2010; LEE; PARK, 2018).

Figura 16 – Pontos de coleta dos solos (a) A e (b) B



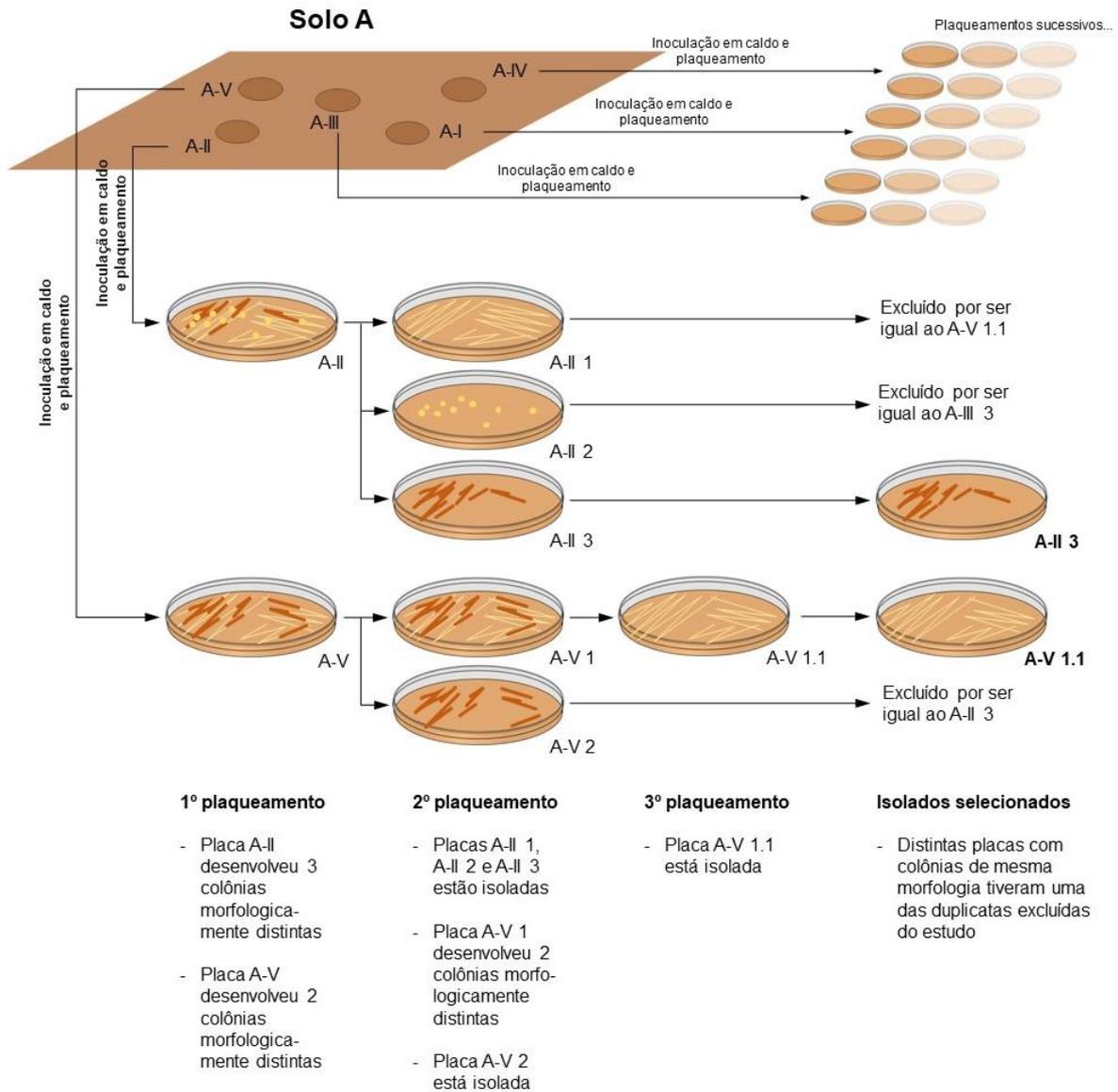
Fonte: Elaborado pelo autor.

O procedimento de coleta e isolamento das bactérias foi feito em adaptação ao método descrito por Amer Algaifi *et al.* (2020) e detalhado a seguir. Para cada uma das duas localidades de coleta, 5 amostras de solo foram coletadas a aproximadamente 5 cm de profundidade, sendo levadas ao laboratório, onde aproximadamente 2 g de cada amostra foram individualmente suspensas em 25mL de caldo de lactato de cálcio por 24 horas a 37 °C para promover o crescimento bacteriano. A solução do caldo de lactato de cálcio é composta por água deionizada com 8 g/L de lactato de cálcio e 1 g/L de extrato de levedura, sendo já utilizada como fonte de nutrientes por Muller *et al.* (2022) e Zhang *et al.* (2017a) para adição das bactérias ao concreto. Foi escolhido o uso desta mesma solução como meio para

isolamento dos microrganismos por ser seletivo para as bactérias que irão metabolizar o lactato de cálcio, isto é, só irão crescer neste meio as bactérias capazes de utilizar lactato de cálcio como fonte de carbono.

Após o crescimento das bactérias, foi feito um plaqueamento por estrias conforme Algaifi *et al.* (2021) para o início do processo de isolamento dos microrganismos. Para o plaqueamento, foi utilizado ágar de lactato de cálcio, de mesma composição que o caldo utilizado na etapa anterior, mas com adição de 16 g/L de ágar. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C de um dia para outro. Depois deste período, foi feita uma análise visual da morfologia das colônias, como descrito por Algaifi *et al.* (2021). Foram feitos novos plaqueamentos em ágar lactato de cálcio para isolamento de cada uma das distintas colônias identificadas, sendo este procedimento repetido tantas vezes quanto necessário até a obtenção dos isolados. Em todas as etapas a incubação foi feita a 37 °C. A Figura 17 apresenta um exemplo prático do processo adotado neste estudo para o plaqueamento, seleção e nomenclatura dos isolados de um determinado solo.

Figura 17 – Exemplo do processo adotado para seleção e nomenclatura dos isolados



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na sequência, foram feitas provas bioquímicas como uma segunda etapa de identificação dos isolados (ANDALIB et al., 2016). Destaca-se que está é uma análise primária, não sendo suficiente para caracterização dos isolados (YAMAOKA-YANO; VALARINI, 1998), tendo sido utilizada em auxílio à análise morfológica para diferenciação dos isolados entre si. As provas bioquímicas realizadas foram: prova de catalase, de motilidade, de urease, de oxidação, de fermentação, bile esculina, TSI e teste de citrato. Em seguida, foi realizada coloração de Gram para identificação dos microrganismos Gram-positivos (parede celular espessa) e Gram-negativos (parede

celular delgada) (MADIGAN et al., 2016). Para os isolados de iguais resultados nos testes bioquímicos e na coloração de Gram, foram descartadas as duplicatas.

Por fim, os isolados foram identificados molecularmente, assim como visto na literatura (ALGAIFI et al., 2021; AMER ALGAIFI et al., 2020). Para tanto, foi realizada a extração de DNA através da técnica de *salting out*, seguindo o protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit® Promega. As concentrações e a qualidade do DNA genômico foram estimadas em espectrofotometria UV Nanodrop™ (*Thermo Scientific™, Wilmington, DE, EUA*). O produto da extração do DNA foi utilizado para amplificar a região do gene 16S rRNA, com um segmento de aproximadamente 1200 pb, pela técnica de PCR com o *primers forward* 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e o *primer reverse* MHR1 (5' CCTTGTTACGACTTCACCC 3') com o acréscimo de uma citocina (C) na posição 5' (RECHE et al., 2016). A amostra de PCR foi composta por 1 µL do DNA extraído, 4 µL da solução de reagentes Master Mix Fire Pool (Ludwig Biotech Ltda.), 1 µL do *primer forward*, 1 µL do *primer reverse* e 13 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada com auxílio de um termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial (94 °C, 4 minutos), 38 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 minuto), anelamento (55 °C, 40 segundos) e extensão (72 °C, 90 segundos) e extensão final (72 °C, 5 minutos).

Após a amplificação, a quantificação dos amplicons foi realizada em espectrofotometria UV Nanodrop™ (*Thermo Scientific™, Wilmington, DE, EUA*) e a verificação do produto esperado da PCR foi feito em eletroforese (90 V por 45 minutos) em gel de agarose 1 %, corado com corante fluorescente de ácidos nucleicos *GelRed* (Biotium, Hayward, CA, EUA) e utilizando-se um marcador de tamanho em pares de bases (100 bp DNA Ladder Invitrogen™). A visualização do resultado foi realizada sob luz ultravioleta, por meio de um transluminador. Após, os produtos da PCR foram purificados utilizando *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e exonuclease I (*New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA*), da seguinte maneira: 0,3 µL da enzima Exo I e 0,8 µL da enzima SAP a cada 10 µL de produto de PCR. O procedimento foi realizado a 37 °C durante 20 segundos, 85 °C por 15 minutos e 12 °C ∞ (até a retirada do produto do termociclador). Os sequenciamentos foram realizados pela empresa *Advancing through Genomics* MACROGEN, localizada na Coréia do Sul, sendo cada amostra sequenciada em ambas as direções (senso e anti-senso).

Para cada isolado sequenciado, a sequência consenso gerada a partir das sequências senso e anti-senso foi montada usando Staden Package 2.0

(<http://staden.sourceforge.net/>). A confiabilidade das sequências foi avaliada por um exame visual completo nos cromatogramas utilizando o *software* ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au>). Cinco sequências consenso foram geradas e alinhadas automaticamente no ClustalW implementado no MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), com edição posterior no BioEdit 5.0.9 (HALL, 1999). Após o alinhamento, cada uma das sequências do gene 16S rRNA foram utilizadas como “*query*” para comparação com as sequências disponíveis no GenBank do NCBI usando a ferramenta BLAST. Em todos os casos, o BLAST resultou em um “*matched*” com sequências de 16S rRNA de bactérias com boa cobertura de sequências ($\geq 80\%$) e identidade ($>98\%$), sugerindo que as sequências nucleotídicas geradas a partir das amostras são correspondentes a região 16S do genoma bacteriano.

Para produção da quantidade de bactérias necessária à moldagem das argamassas, os isolados foram inoculados separadamente em caldo de lactato de cálcio e o inóculo foi cultivado em *shaker* a 165 rpm e 37 °C (MULLER et al., 2022) por um período de 24 horas. As bactérias foram inoculadas em 2 Erlenmeyers de 2L cada, sendo este o volume de caldo aproximado necessário à moldagem de todos os corpos de prova. Após as 24 horas de crescimento, o caldo com a suspensão bacteriana foi utilizado em substituição à água de amassamento para preparação das argamassas. Não foram realizadas diluições nos caldos ou contagens de microrganismos, sendo fixado apenas o período de crescimento em 24 horas. As suspensões bacterianas foram utilizadas tais quais se apresentavam após o período de crescimento.

3.3 PREPARAÇÃO DAS ARGAMASSAS

As argamassas foram misturadas conforme os procedimentos da NBR 7215 (ABNT, 2019). Seguindo a mesma norma, foram moldados corpos de prova cilíndricos de dimensões 5 x 10cm (diâmetro x altura) para caracterização da argamassa quanto à sua resistência à compressão. Para cada idade de avaliação, assim como para cada linhagem bacteriana utilizada, foram moldados 3 corpos de prova.

Para cada isolado, um cilindro 5 x 10cm adicional foi moldado para posterior extração de outro cilindro, de aproximadamente 2 x 3cm. A extração foi feita aos 7 dias de cura do concreto e o cilindro extraído foi envolto em fita adesiva, sendo então aplicado um esforço de compressão diametral a fim fissurá-lo (Figura 18). A fita foi

utilizada para evitar que a argamassa se separasse completamente em dois pedaços. Este procedimento de fissuração é o mesmo adotado por Wang *et al.* (2014b) e produziu amostras para análise via MEV.

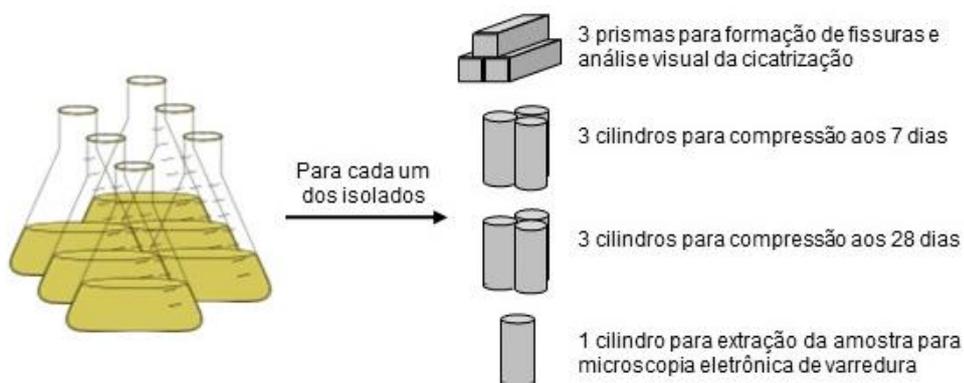
Figura 18 – Fissuração manual das amostras em morsa



Fonte: Wang *et al.* (2014, p. 292).

Finalmente, para a análise visual das fissuras, foram moldadas, para cada linhagem bacteriana, 3 prismas de argamassas com dimensões de 4 x 4 x 16cm. A nomenclatura dos prismas foi realizada através de um código alfanumérico no formato **XXX (0)**, onde **XXX** representa o código do isolado (Figura 17) e **(0)** representa o número do prisma (1, 2 ou 3). A indução de fissuras nas argamassas se deu por ensaio de tração na flexão, de forma que foi também necessário armar as amostras prismáticas, permitindo a sua deformação e a sua fissuração ao invés de sua ruptura frágil. Assim, foi disposta uma barra de aço CA 60 com 5 mm de diâmetro, posicionada como armadura positiva no prisma. A disposição de uma barra de aço como armadura para fissuração de prismas por tração na flexão já foi realizada anteriormente pelo grupo de pesquisa deste trabalho (MULLER *et al.*, 2022; PACHECO, 2020). A Figura 19 ilustra cada um dos corpos de prova moldados para cada isolado distinto.

Figura 19 – Esquema explicativo dos corpos de prova moldados para execução das análises



Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as argamassas foram curadas em ambiente controlado com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR superior a 95%, conforme recomendação da NBR 5738 (ABNT, 2015b). Os prismas destinados à avaliação visual foram removidos aproximadamente 2 horas antes do momento da análise para que possam perder sua umidade superficial e possibilitar melhor visualização em microscópio (JUSTO-REINOSO et al., 2022). Após a retirada do ambiente controlado, as amostras ficaram por, no máximo, 4 horas em temperatura e umidade relativa do ar ambientes para análise, retornando em seguida ao ambiente controlado, mantendo-se sempre na mesma posição, com a fissura analisada voltada para cima.

3.4 INDUÇÃO DE FISSURAS

A fissuração dos prismas foi executada através do desenvolvimento de tensões de tração na argamassa por ensaio de tração na flexão por 3 pontos, conforme os procedimentos da NBR 13279 (ABNT, 2005). Esse mesmo ensaio foi realizado por Alghamri, Kanellopoulos e Al-Tabbaa (2016b) e anteriormente pelo grupo de pesquisa no qual esta pesquisa participa (MULLER et al., 2022; PACHECO, 2020).

Apesar do método de fissuração já ter sido realizado anteriormente, devido à inserção de ar incorporado, a matriz da argamassa mostrou-se demasiadamente frágil nos pontos de carregamento e apoio e era “amassada” durante a aplicação da carga. Desta forma, para acelerar o tensionamento da argamassa, a taxa de aplicação de carga foi aumentada frente ao proposto pela NBR 13279 (ABNT, 2005), sendo utilizada uma taxa de 100 N/s. Além disso, mesmo com a adição de armadura ao

prisma, algumas das argamassas romperam imediatamente após o surgimento da(s) fissura(s). Portanto, nem todos os prismas moldados puderam ser aproveitados como desejado.

3.5 REPOUSO PARA AUTOCICATRIZAÇÃO

Durante o período para autocicatrização das argamassas, o ambiente ao qual estiveram expostas foi o mesmo ambiente utilizado para sua cura. Isto é, a temperatura foi de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e a UR foi superior a 95%. Estas condições para autocicatrização são as mesmas adotadas por Pacheco (2020), sendo assumido que as bactérias dentro da matriz estão em contato tanto com oxigênio, quanto com água. Essa configuração é favorável ao seu metabolismo, intensificando sua capacidade de cicatrização, conforme foi demonstrado por Tziviloglou *et al.* (2016).

Além disso, no que se refere ao posicionamento dos prismas de argamassa no ambiente de cura, e conforme já descrito no item 3.3, destaca-se que os prismas foram mantidos sempre com sua fissura objeto de análise voltada para cima no ambiente de cura. Dessa forma, admite-se que não ocorram variações no processo de deposição do CaCO_3 nas fissuras por influência da posição dos prismas.

3.6 ANÁLISE DO PRODUTO DE CICATRIZAÇÃO

Para análise do produto de cicatrização foram realizadas técnicas distintas, cada qual visando atender diferentes objetivos específicos¹ deste trabalho. Para alcançar os objetivos **a** e **c**, foi realizado acompanhamento visual por microscopia óptica na superfície do concreto fissurado a fim de detectar o surgimento de produtos de cicatrização. O objetivo **d** foi atingido pela análise via MEV/EDS e DRX dos produtos de cicatrização gerados. Finalmente, o objetivo **b** foi alcançado pela análise da resistência à compressão, conforme descrito anteriormente no item 3.1.

3.6.1 Acompanhamento visual

A verificação visual da autocicatrização das amostras foi feita com utilização de um microscópio óptico SMZ-168, Motic. Para cada prisma de argamassa foi escolhida

¹ Objetivos listados na página 16.

sua fissura mais evidente para acompanhamento visual nas idades de 0, 7, 14 e 28 dias após o surgimento da fissura. O acompanhamento se deu continuamente ao longo da extensão da fissura, em uma única face do prisma de argamassa e limitando-se a um comprimento máximo de, aproximadamente, 4cm.

Para a visualização da fissura, foram realizadas fotografias ao longo da extensão a ser analisada. Após, para facilitar a análise, as sequências fotográficas de cada fissura foram tratadas digitalmente de modo a recompor toda a fissura em uma única imagem. Um exemplo deste tratamento é apresentado na Figura 20. Este método é uma adaptação do utilizado por Cappellesso (2018).

Figura 20 – Reconstrução digital das fissuras para acompanhamento visual



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.2 Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva e difração de raios X

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos cilindros 2 x 3 cm após 28 dias da abertura das fissuras. Para tanto, a fita ao redor dos cilindros foi removida e eles foram separados em duas partes, expondo as faces da fissura. Uma das metades do cilindro foi preparada para execução da MEV. A preparação se deu

através da secagem em estufa a 40 °C durante 7 dias (JUSTO-REINOSO et al., 2022) e posterior metalização com ouro. Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo EVO MA15, acoplado com equipamento de EDS para análise da composição elementar do material. Foi utilizada uma tensão de aceleração de 15 kV para os imageamentos e para a análise por EDS.

A análise da composição mineralógica dos produtos de cicatrização foi realizada através da técnica de DRX. Para isto, com o uso de uma agulha esterilizada, na última idade de análise visual, isto é, aos 28 dias de cicatrização, foi realizada a coleta dos produtos de cicatrização das argamassas acompanhadas por análise visual. O equipamento utilizado é da marca PANanalytical, modelo Empyrean, com configuração de intervalo de ângulo de 5 a 75 °, tempo de 1 segundo e passo de 0,05.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados coletados ao longo do programa experimental são apresentados nos subitens a seguir.

4.1 BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS

Ambos os solos escolhidos para isolamento continham bactérias capazes de crescer no meio de lactato de cálcio, o que foi observado pelo desenvolvimento de colônias bacterianas em todas as placas de Petri. As sucessivas etapas de isolamento resultaram em 10 distintos isolados para análise. Os isolados do solo A foram identificados como **A-II 3**, **A-III 3**, **A-V 1.1** e **A-V 3**, enquanto os isolados do solo B foram identificados como **B-I 1**, **B-II 2**, **B-II 3**, **B-III 1**, **B-III 3** e **B-IV 4**¹. Figuras das placas contendo os isolados, bem como os resultados das provas bioquímicas para cada um deles são apresentados no Apêndice A. Após as provas bioquímicas, os isolados com resultados iguais tiveram suas duplicatas descartadas, de forma que a seleção final contempla os isolados: **A-II 3**, **A-V 1.1**, **A-V 3**, **B-I 1**, **B-II 3** e **B-IV 4**.

A identificação molecular dos isolados é apresentada na Tabela 5. O isolado A-V 3 não apresentou resultados conclusivos, não sendo possível realizar sua identificação.

¹ A relembra, o sistema de nomenclatura dos isolados adotado pelo autor está descrito no item 3.2 e detalhado pela Figura 17, sendo composto por uma letra, referente ao solo (A ou B), um número romano, referente à amostra do solo (I a V) e um número arábico, referente à numeração da bactéria em cada amostra.

Tabela 5 – Identificação molecular dos isolados

Isolado	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
A-II 3	Proteocateria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Cronobacter</i>
A-V 1.1	Proteocateria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Cronobacter</i>
B-I 1	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>
B-II 3	Proteocateria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>
B-IV 4	Proteocateria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos gêneros identificados, é destacado inicialmente o isolado B-I 1 como *Bacillus*. Jenson (2014) aponta que este gênero é composto por diversas espécies de bactérias formadoras de esporos, vastamente encontradas na natureza e que podem ser isoladas a partir de alimentos, solos, águas, animais e plantas, o que justifica sua presença dentre os isolados deste trabalho. Ainda segundo o autor, os esporos formados pelos indivíduos deste gênero são estruturas dormentes altamente resistentes formada pelas células em ambientes com agressivas temperaturas, pH ou déficit nutricional. Em condições adequadas, os esporos são capazes de germinar, transformando-se novamente em células ativas. A literatura já apresenta que tal característica é bastante adequada para uso destas espécies em compósitos cimentícios autocicatrizantes, dadas as condições agressivas das matrizes cimentícias, como por exemplo seu elevado pH (JONKERS, 2011). Concordando com esse apontamento, diversos estudos são encontrados utilizando espécies do gênero *Bacillus* como agentes de cicatrização em concretos e argamassas (EHRENBRING, 2020; KHUSHNOOD et al., 2022; MULLER et al., 2022; NIELSEN et al., 2020; PACHECO, 2020; QIAN et al., 2021b; SHAHEEN et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

Em seguida, o isolado B-IV 4 é identificado como *Pseudomonas*, um gênero encontrado na maioria dos ambientes que possuem umidade (IGLEWSKI, 1996), sendo apontado por Madigan *et al.* (2016) que há uma grande diversidade metabólica no gênero, o que o faz presente em diversos ambientes. Dodd (2014) afirma que as espécies deste gênero são aeróbicas e possuem motilidade¹. Seu metabolismo é descrito como quimiorganotrófico, utilizando uma grande variedade de fontes de carbono para sua nutrição, justificando seu crescimento na presença de lactato de cálcio. Assim como o gênero *Bacillus*, *Pseudomonas* também já foi empregado no estudo de materiais cimentícios autocicatrizantes (ERŞAN et al., 2016; RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN; BANG, 2001).

Com relação aos isolados do gênero *Cronobacter* (A-II 3 e A-V 1.1), uma revisão de literatura feita por Koutsoumanis, Lianou e Sofos (2014) apresenta que os ambientes naturais destes indivíduos ainda não estão estabelecidos, havendo sua presença em inúmeros locais, como plantas, fontes animais (fluido cérebro-espinhal, sangue, urina, trato intestinal, fezes, etc.) e ambientes hospitalares, de processamento

¹ Cabe destacar que a prova bioquímica de motilidade realizada no isolado B-IV 4 apresentou resultado negativo (ver Apêndice A). Tal observação pode ser decorrente do viés da análise visual pela qual são avaliadas as provas bioquímicas.

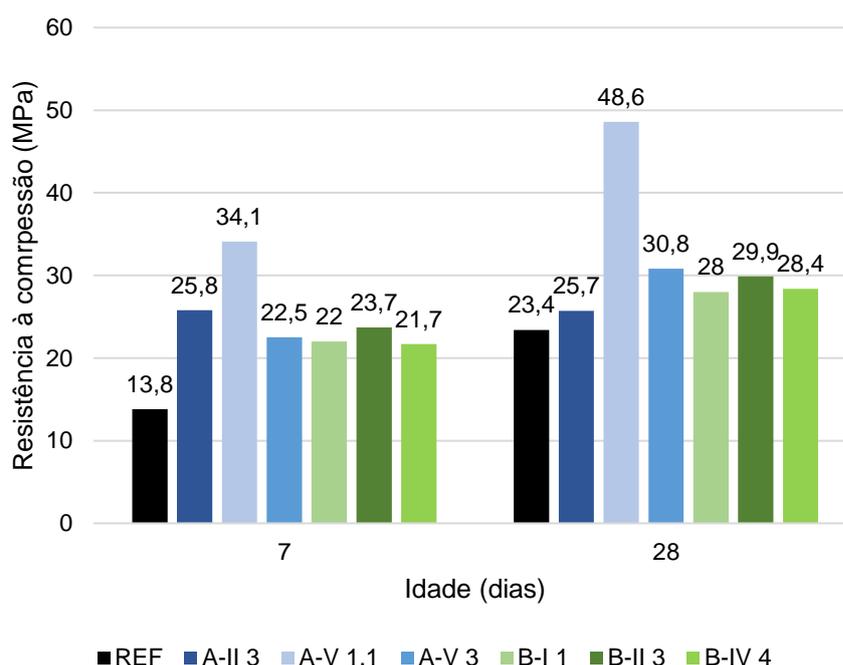
de alimentos e domésticos. De fato, Patel *et al.* (2014) afirmam que os membros da família Enterobacteriaceae (enterobactérias), como é o caso de *Cronobacter* spp. e de *Citrobacter* spp. (isolado B-IV 4), são comumente habitantes do intestino humano ou de outros animais, sendo complementado por Olstein *et al.* (2013) que *Citrobacter* spp. costumam ocupar os mesmos nichos que *Salmonella* spp. (também pertencente à família Enterobacteriaceae), surgindo como uma contaminação do trato intestinal de animais de sangue quente. É possível que tais isolados tenham sido obtidos das amostras de solo por contaminação por alguma fonte animal, como urina ou fezes.

Além disso, o gênero *Cronobacter* está epidemiologicamente ligado a casos de contaminação de fórmulas infantis e infecção em recém-nascidos (KOUTSOUMANIS; LIANOU; SOFOS, 2014). Tais apontamentos indicam uma patogenicidade das enterobactérias, tornando-as menos atrativas para seu estudo como agente de cicatrização em compósitos cimentícios, o que é percebido uma vez que não foram encontradas publicações nesta área fazendo uso de enterobactérias. Para complementar, o metabolismo das enterobactérias é apresentado como uma conversão de glicose em ácido ou de ácido em gás, sendo nitrato transformado em nitrito (PATEL *et al.*, 2014). Boquet, Boronat e Ramos-Cormenzana (1973) isolaram do solo diversas bactérias capazes de precipitar CaCO_3 a partir de uma fonte orgânica de cálcio (acetato de cálcio), incluindo *Salmonella*, o que pode indicar a possibilidade das enterobactérias de crescimento em um ambiente com lactato de cálcio como fonte de carbono, justificando a presença de *Citrobacter* e *Cronobacter* dentre os isolados deste estudo. Destaca-se que, na área da autocicatrização, foi encontrado um único estudo (ZHANG *et al.*, 2019) que utilizou um consórcio bacteriano de lodo ativado como agente de cicatrização, sendo identificado *Citrobacter* sp. dentre as espécies deste consórcio. Os autores atribuíram à esta espécie a metabolização de ácido láctico em CO_2 , o qual reage com o hidróxido de cálcio precipitando CaCO_3 (conforme equações (7 e (9, páginas 27 e 28).

4.2 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO

Os resultados de resistência potencial à compressão obtidos pelas argamassas produzidas com os distintos isolados são apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Resistência potencial à compressão desenvolvida pela argamassas para cada um dos isolados



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar um acréscimo na resistência potencial à compressão frente à amostra referência para todas as amostras nas duas idades de análise. Cabe ressaltar que a amostra referência também possui ar incorporado em sua matriz. Diversos outros estudos realizaram a adição das bactérias diretamente na matriz, sem encapsulamento (ANDALIB et al., 2016; QIAN et al., 2016; SIDDIQUE et al., 2016a, 2016b, 2017b) e também observaram aumentos na resistência à compressão. Conforme apresentado na literatura, este comportamento se dá pela MICP nos poros da matriz, reduzindo os vazios e, portanto aumentando sua resistência à compressão. Dessa forma, os acréscimos de resistência à compressão observados neste estudo amostras indicam que as bactérias atuaram nos poros de ar incorporado na matriz.

Dentre os resultados observados, destaca-se o aumento de resistência de aproximadamente 108% dado pela adição do isolado A-V 1.1 em relação à amostra

referência aos 28 dias. Um aumento desta magnitude não foi encontrado nos estudos que compõem o referencial bibliográfico deste trabalho. Realizando a adição direta de bactérias na água de amassamento, método de similar praticidade ao encapsulamento em bolhas de ar incorporado, Andalib *et al.* (2016) obtiveram o maior aumento de resistência observado no referencial deste trabalho para esta técnica, com um acréscimo de 24% para um concreto originalmente de 50MPa. No estudo destes autores, a bactérias utilizada foi *B. megaterium*. Outros acréscimos de resistência observados neste estudo, aos 28 dias, ficaram entre 10% (A-II 3) e 32% (A-V 3), concordando com resultados já apresentados por outros autores.

Com relação aos resultados na idade de 7 dias, novamente as amostras moldadas com o isolado A-V 1.1 apresentaram melhor desempenho, com aumento de aproximadamente 147% na resistência potencial à compressão em comparação à amostra referência. Os demais isolados apresentaram aumentos entre 57% (B-IV 4) e 87% (A-II 3), percentuais bastante expressivos positivamente.

Em termos de avanço de resistência dos 7 aos 28 dias, é observado que não houve avanço entre as idades apenas para a amostra A-II 3. É importante notar que há um avanço na resistência para a amostra referência, visto que aos 7 dias a resistência da argamassa ainda não atingiu seu máximo, pois o cimento ainda está em processo de hidratação (LOTHENBACH *et al.*, 2008). Dessa forma, seria de se esperar um aumento na resistência em decorrência desta hidratação. Jang *et al.* (2020) observaram redução na resistência à compressão, sendo esta redução devida à adição de lactato de cálcio e extrato de levedura em amostras de argamassa. Os resultados apresentados por Luo e Qian (2016), no entanto, podem contrapor parte desta hipótese, uma vez que a adição de apenas lactato de cálcio levou a um pequeno aumento na resistência aos 28 dias.

Ainda, cabe notar que a amostra A-II 3 apresentou resistência 87% maior que a argamassa referência aos 7 dias, indicando que houve a ocorrência de MICP a densificação da matriz, de forma que este comportamento seria esperado também aos 28 dias. A estagnação da resistência poderia ser possível pela atuação das bactérias somente em idades iniciais, período após o qual o ambiente poderia não estar propício à sobrevivência da bactéria, e havendo sobra de nutrientes na matriz após sua breve atuação, havendo possibilidade de que estes nutrientes tenham prejudicado a resistência à compressão. Outros estudos devem de ser realizados a fim de responder

esta questão com maior clareza. Não se descarta, também, a possibilidade de falha na moldagem destas amostras.

4.3 ANÁLISE DO PRODUTO DE CICATRIZAÇÃO

A análise do produto de cicatrização está separada a seguir no acompanhamento visual e na análise por MEV, por EDS e por DRX.

4.3.1 Acompanhamento visual

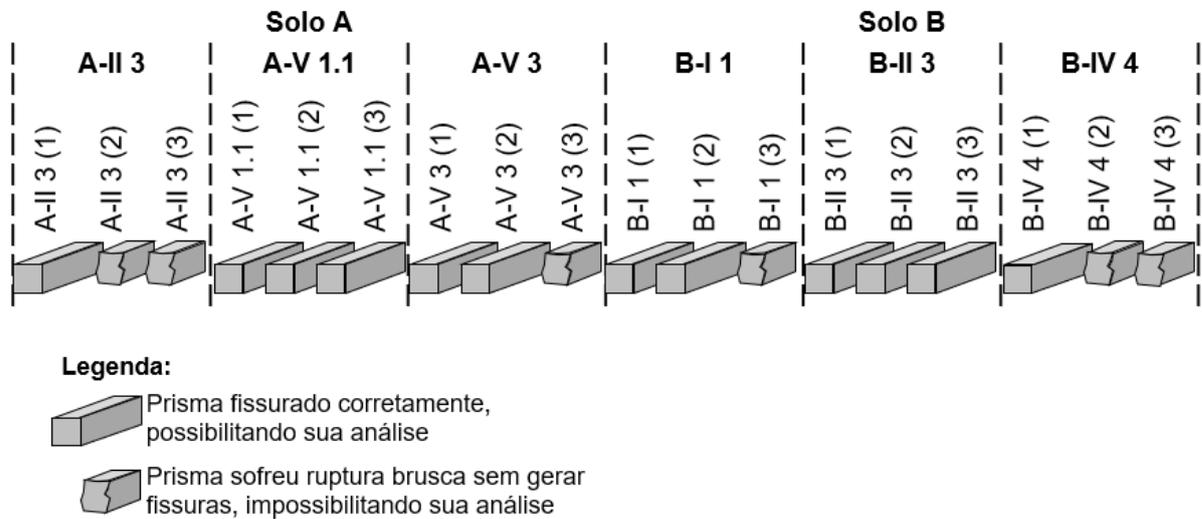
Conforme descrito no item 3.3, para cada um dos 6 isolados, foram moldados 3 prismas de argamassa. Entretanto, como apontado no item 3.4, durante a indução das fissuras, nem todos os prismas sofreram uma fissuração lenta, possibilitando um término da aplicação de carga na argamassa antes de sua ruptura em distintos pedaços. A Figura 22 demonstra um prisma fissurado com êxito e um prisma rompido, enquanto a Figura 23 ilustra quais os prismas que foram fissurados e quais que foram rompidos.

Figura 22 – (a) Prisma fissurado com sucesso e (b) prisma rompido durante o processo de fissuração em ensaio de tração na flexão



Fonte: Elaborado pelo autor.

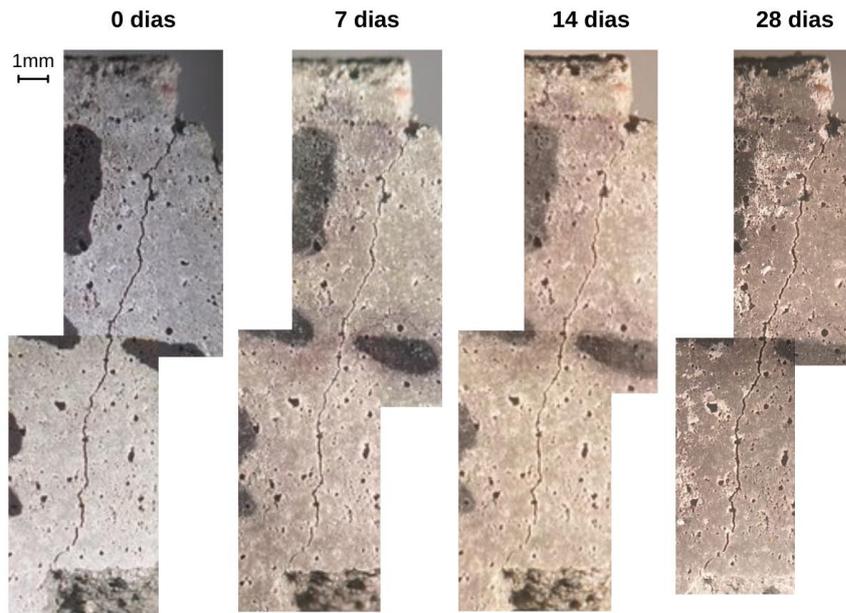
Figura 23 – Aproveitamento dos prismas de argamassa para acompanhamento visual de fissuras



Fonte: Elaborado pelo autor.

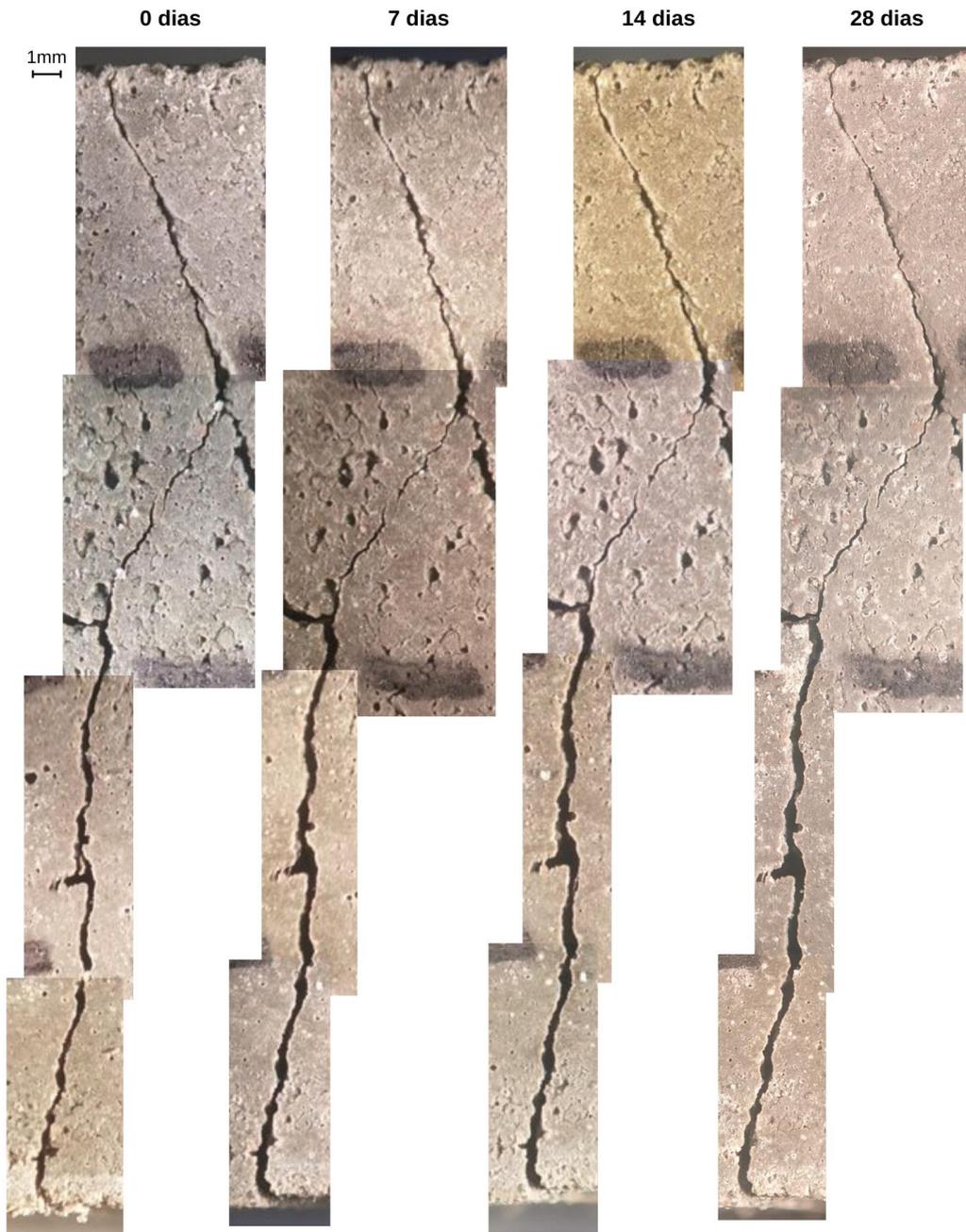
A seguir, as Figura 24, Figura 25, Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29 apresentam as fissuras acompanhadas nos prismas contendo os isolados do solo A, sendo eles, respectivamente, A-II 3 (1), A-V 1.1 (1), A-V 1.1 (2), A-V 1.1 (3), A-V 3 (1) e A-V 3 (2).

Figura 24 – Fissura no prisma A-II 3 (1)



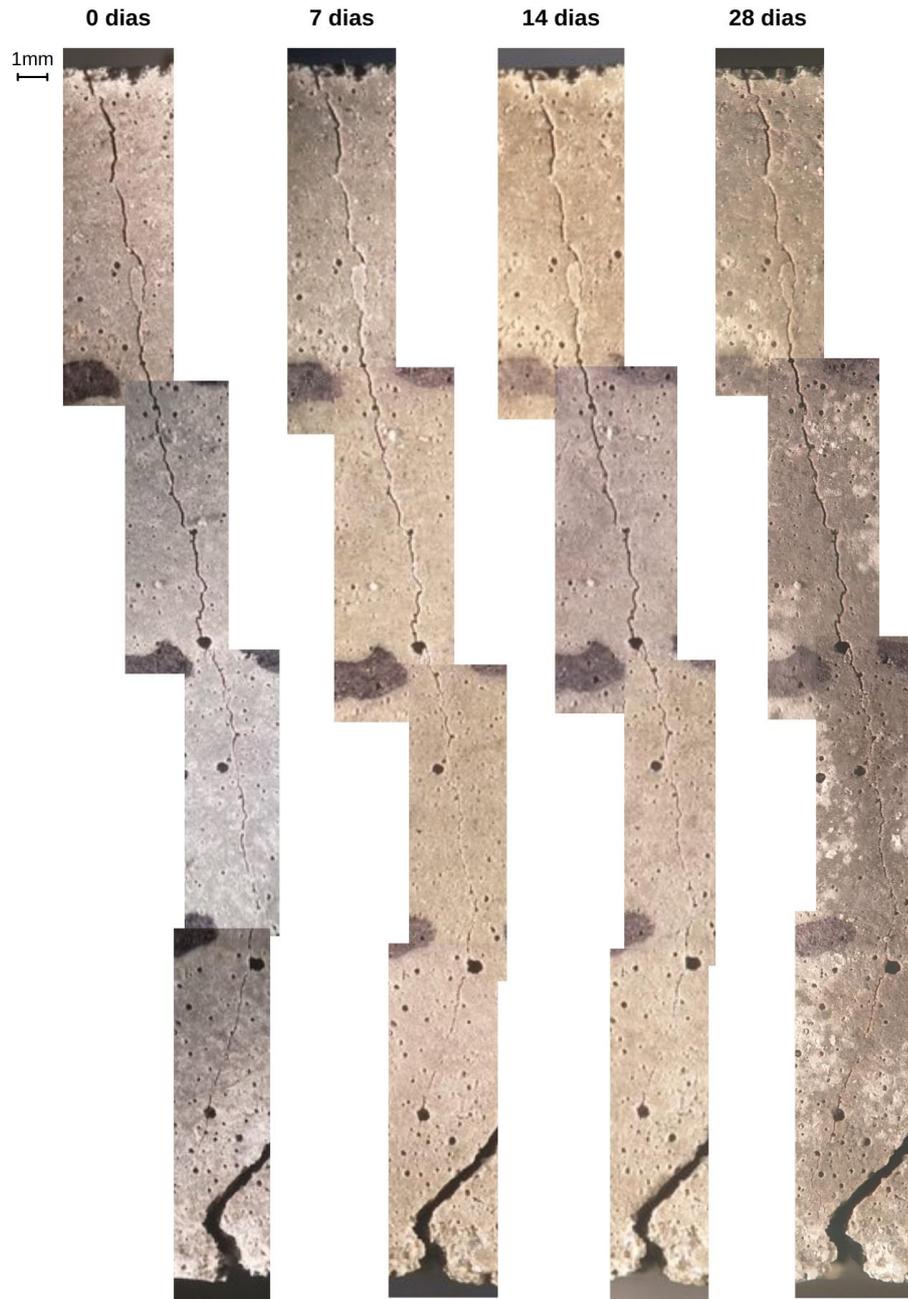
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25 – Fissura no prisma A-V 1.1 (1)



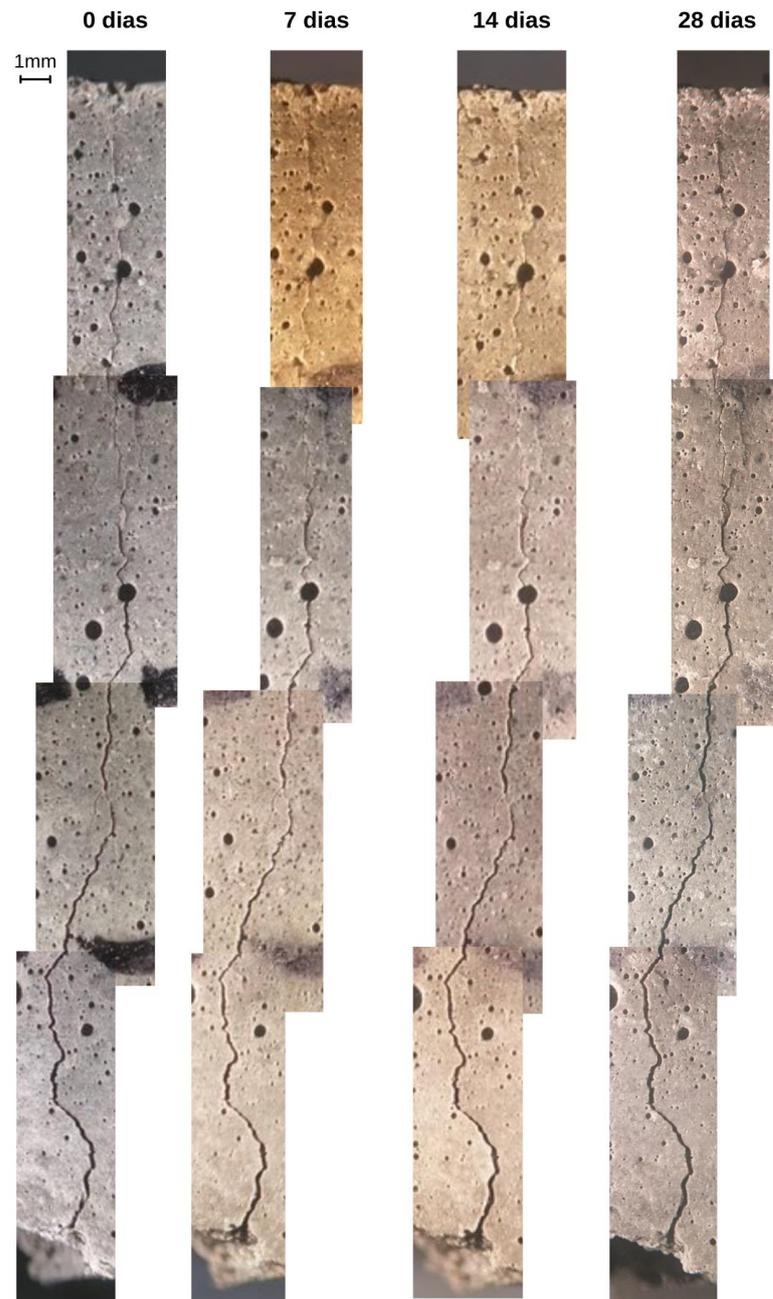
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26 – Fissura no prisma A-V 1.1 (2)



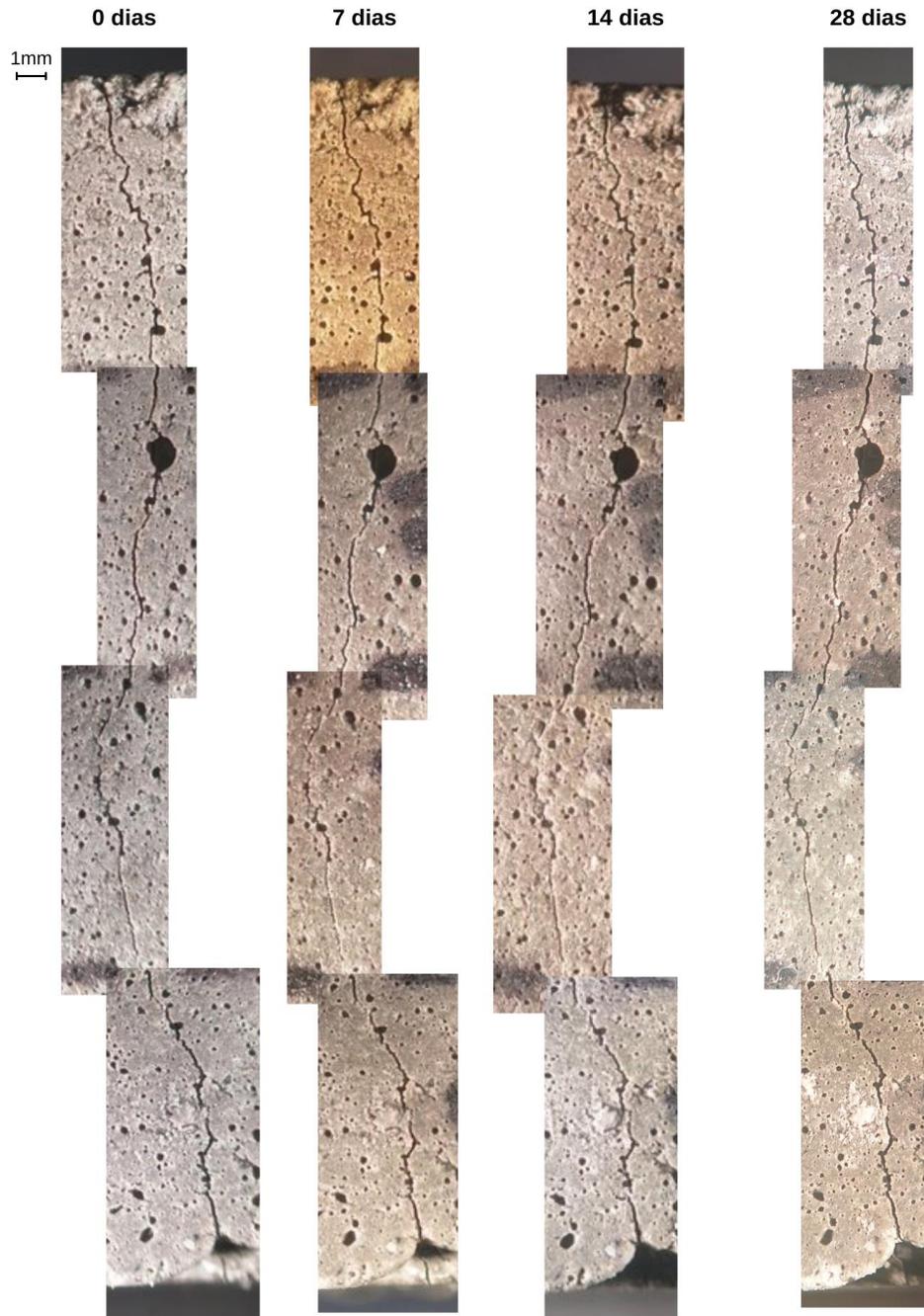
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 – Fissura no prisma A-V 1.1 (3)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 – Fissura no prisma A-V 3 (1)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 – Fissura no prisma A-V 3 (2)

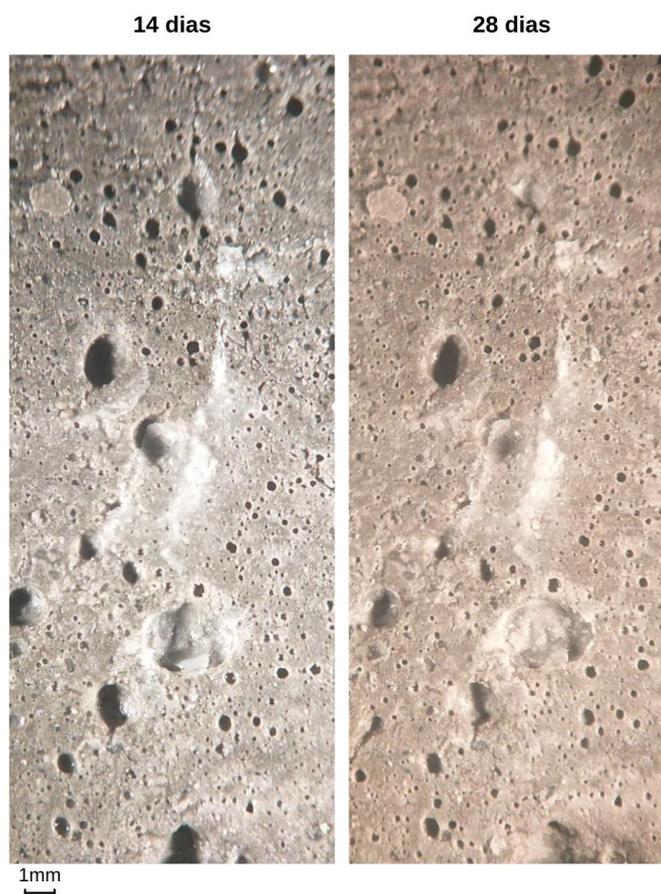


Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar que, em todas as fissuras, não houve surgimento visível de produtos de cicatrização, indicando que nas áreas delimitadas para análise não ocorreu o preenchimento das fissuras por CaCO_3 precipitado pelas bactérias utilizadas. Apesar de não possuir produtos de cicatrização na fissura acompanhada, foi observado o surgimento destes produtos nas faces dos prismas que não eram

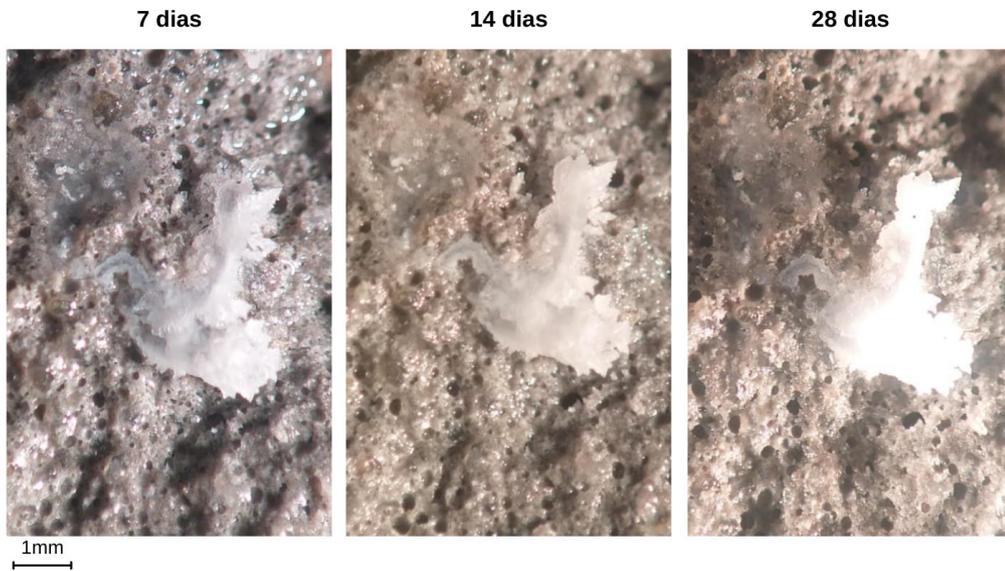
objeto principal de análise. O prisma A-V 3 (2) apresentou produtos de cicatrização em sua face lateral, ao longo de parte da extensão de uma fissura, como apresenta a Figura 30. O prisma A-V 3 (3) sofreu ruptura brusca durante seu carregamento e apresentou uma pequena formação de cristais esbranquiçados em uma sua face fraturada exposta (Figura 31). Por fim, houve formação de produtos de cicatrização na face lateral do prisma A-V 1.1 (1), como mostram as Figura 32 Figura 33. Por indicarem pontos do prisma não previstos para análise, as figuras não apresentam o estado dos prismas em idade inicial, mas apenas após o surgimento dos produtos de cicatrização.

Figura 30 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma A-V 3 (2) – Registros aos 14 e 28 dias



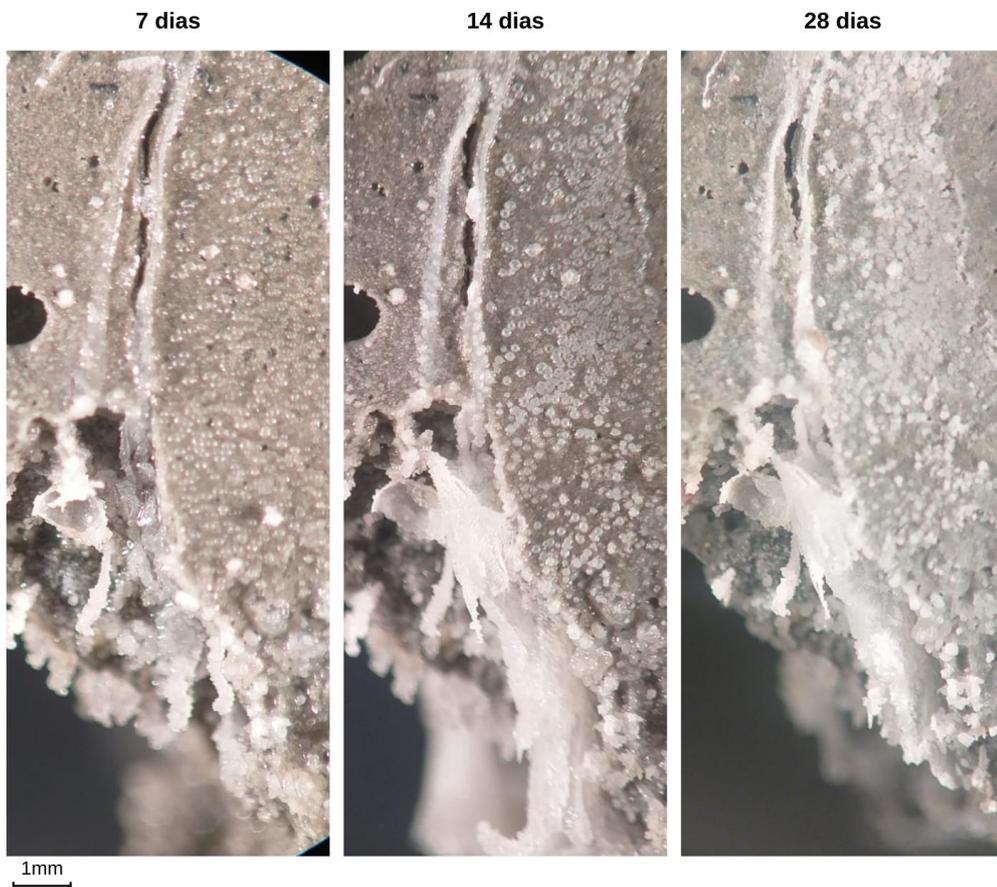
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 – Formação de cristais na superfície exposta fraturada do prisma A-V 3 (3)
– Registros aos 7, 14 e 28 dias



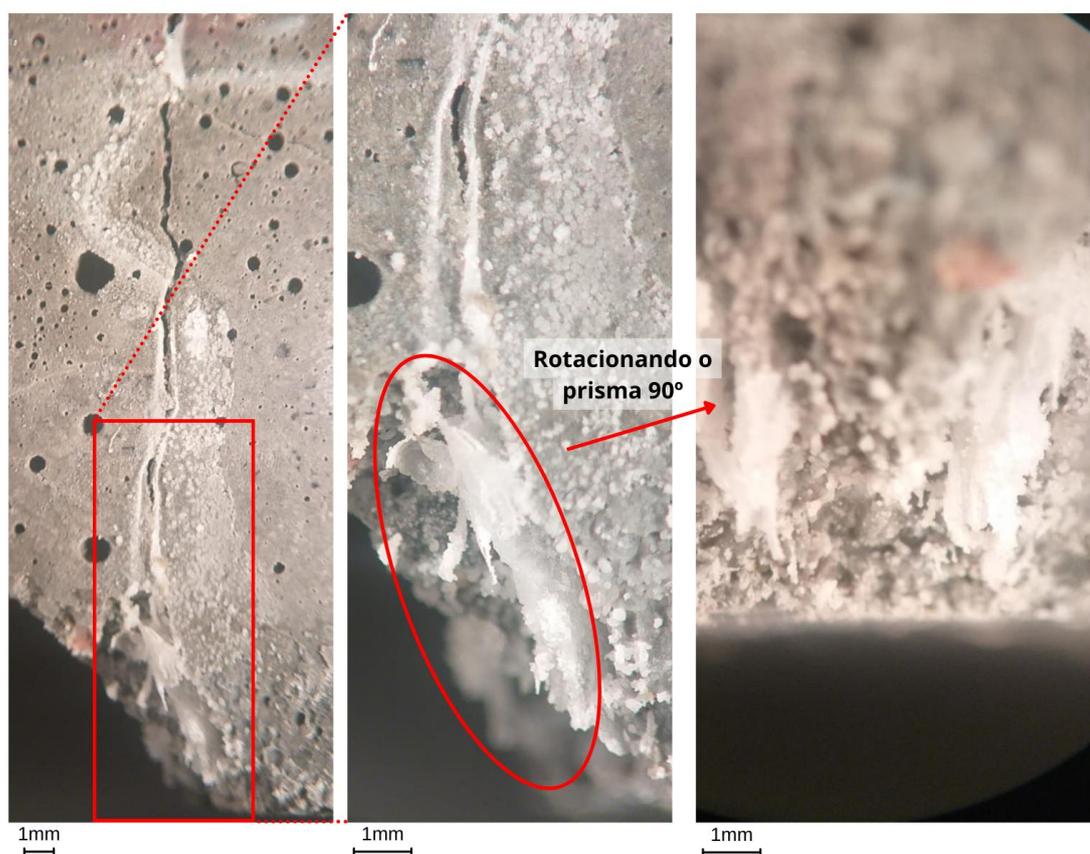
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma A-V 1.1 (1) – Registros aos 7, 14 e 28 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma A-V 1.1 (1) – Registro aos 28 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

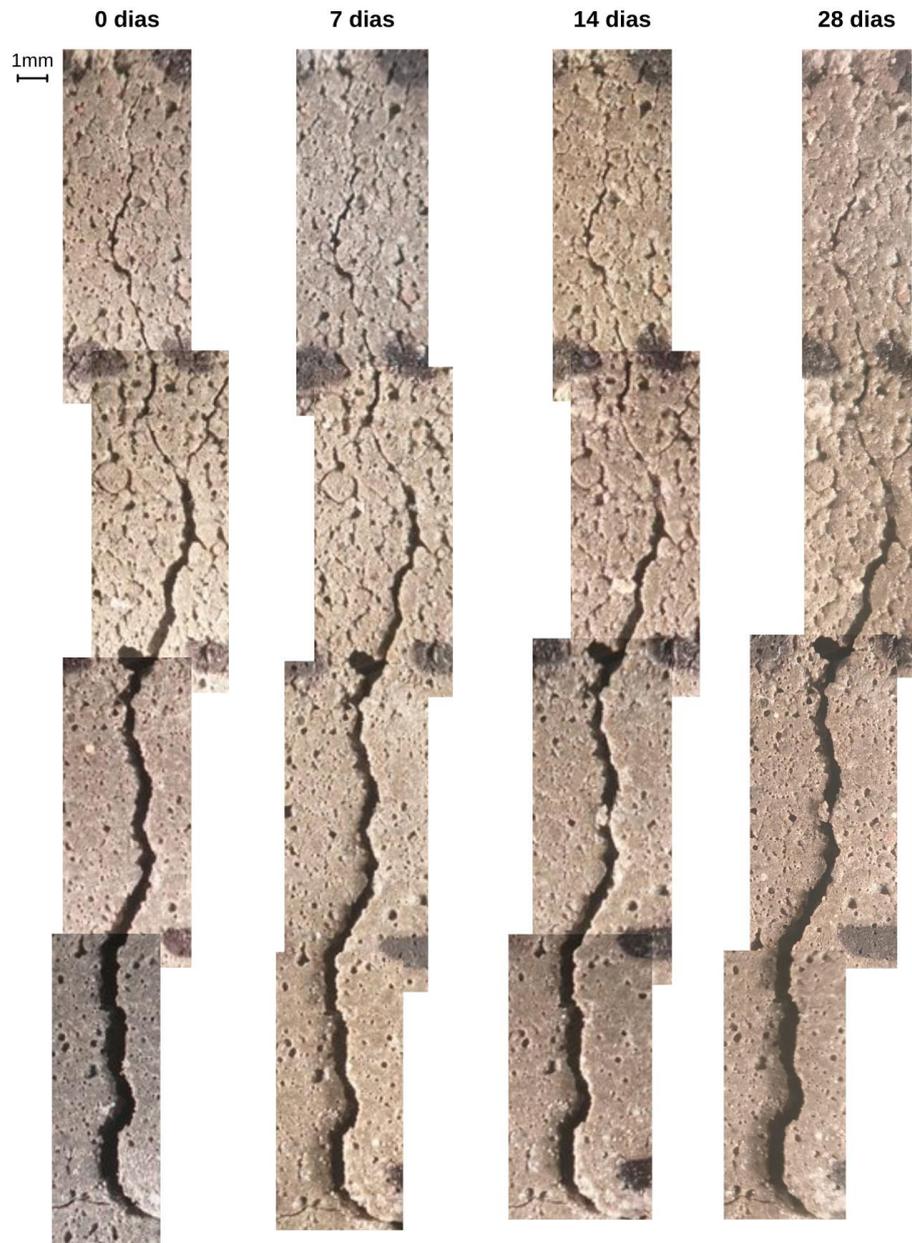
Nas Figura 30 e Figura 31 observa-se o surgimento de produtos de cicatrização nas idades de 14 e 7 dias, respectivamente, os quais não sofreram alterações nas idades subsequentes. A Figura 32 mostra que aos 7 dias de cicatrização já houve a formação de cristais na fissura, com aumento na quantidade de material presente aos 14 dias. Porém, aos 28 dias houve uma redução na quantidade de material, indicando a perda de parte do volume de cristais formados, sendo este apontamento mostrado também na Figura 33. Todas as figuras apresentam produtos de cicatrização de coloração branca, o que é indicado na literatura como CaCO_3 (ZAMANI et al., 2020).

Destaca-se que os prismas de argamassa foram armazenados sempre na mesma posição, com a fissura principal voltada para cima. Portanto, é visto um padrão de surgimento de produtos de cicatrização em direção às regiões mais inferiores dos prismas. É possível que tenha sido formado CaCO_3 na região de análise (face superior) em idade inferior aos 7 dias, porém estes cristais podem ter tido baixa adesão à matriz cimentícia. Os resultados das análises de MEV, EDS e DRX, os quais

serão apresentados no próximo item deste trabalho, demonstram que de fato houve a formação de CaCO_3 em todas as argamassas analisadas, indicando que de fato ocorre a MICP pela matriz. Portanto, levanta-se a hipótese de que água condensada na superfície da fissura pode ter percolado por ela por ação da gravidade e carregado os cristais para a região inferior dos prismas. Segundo Bentz *et al.* (2015), CaCO_3 na forma de calcita possui melhor adesão aos hidratos do cimento que aragonita. Dessa forma, é possível que a estrutura cristalina desenvolvida possua influência na estabilidade do produto de cicatrização dentro da fissura. Outra suspeita levantada seria a de uma solubilização do CaCO_3 na água que percola pela fissura, carregando o material para a região inferior e, eventualmente, para fora dos prismas. Entretanto, esta hipótese pode ser contraposta, dado que a literatura apresenta o CaCO_3 como um composto de baixa solubilidade em água (ZAMANI *et al.*, 2020). Independentemente destas questões, a Figura 32 prova que há uma perda de material entre os 14 e os 28 dias de autocicatrização, a qual parece ocorrer devido à ruptura dos cristais formados, deixando apenas os cristais da região mais próxima ao prisma aderida a ele.

As Figura 34, Figura 35, Figura 36, Figura 37, Figura 38, Figura 39 e Figura 40 apresentam, respectivamente, as fissuras dos prismas B-I 1 (1), B-I 1 (2), B-II 3 (1), B-II 3 (2), B-II 3 (3) e B-IV 4 (1), sendo este último separado nas duas últimas figuras. Destaca-se que todas as figuras se referem à isolados do solo B.

Figura 34 – Fissura no prisma B-I 1 (1)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 – Fissura no prisma B-I 1 (2)



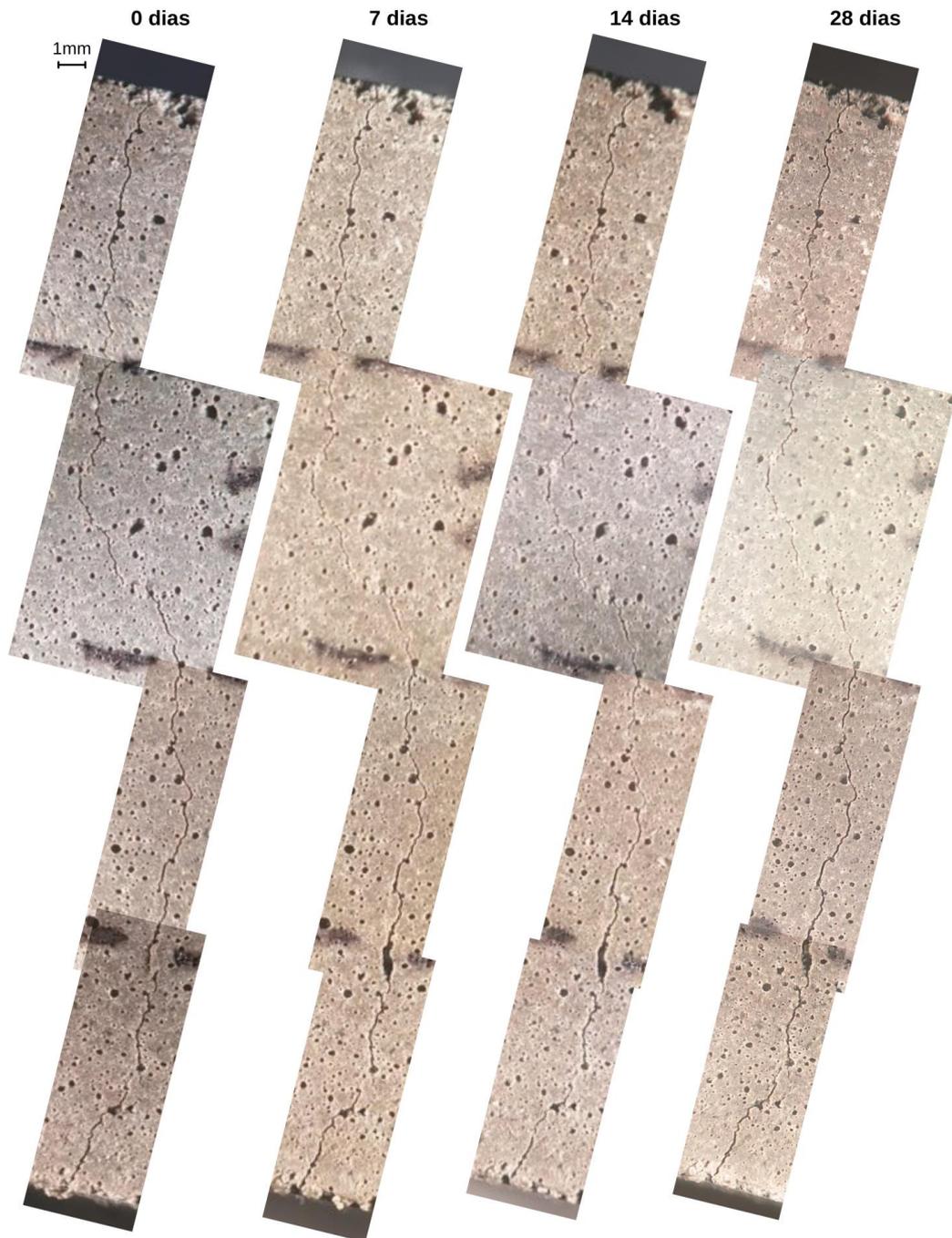
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 – Fissura no prisma B-II 3 (1)



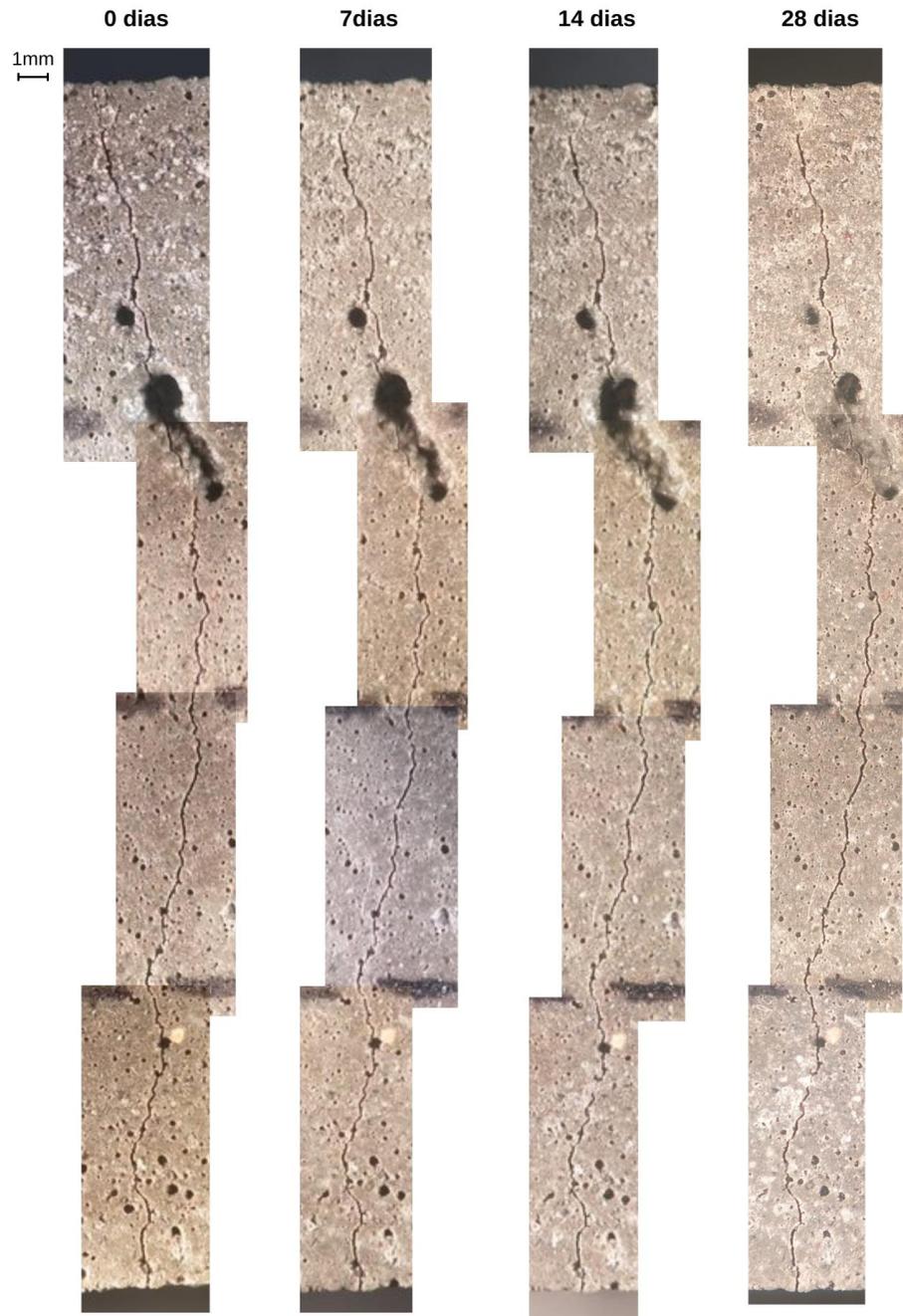
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 – Fissura no prisma B-II 3 (2)



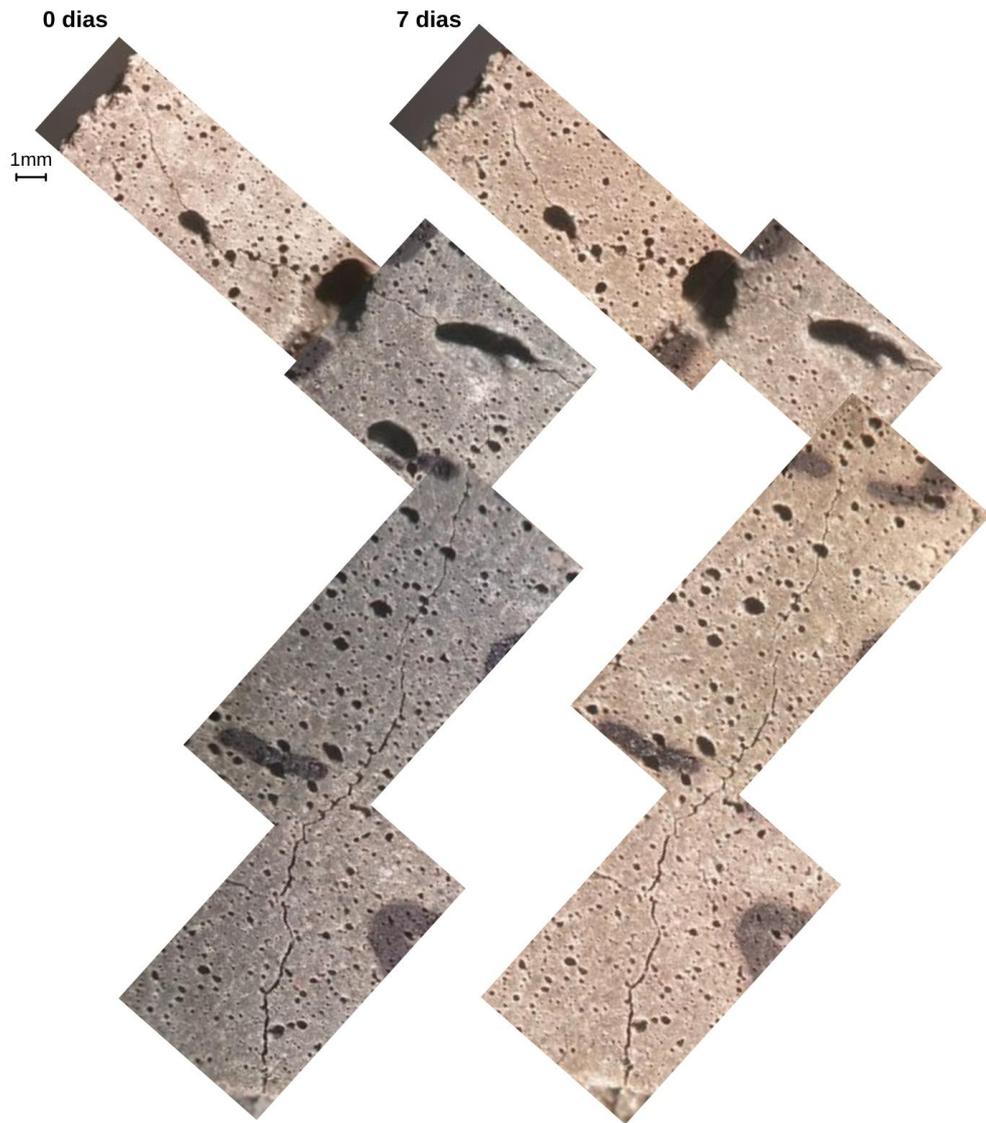
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 38 – Fissura no prisma B-II 3 (3)



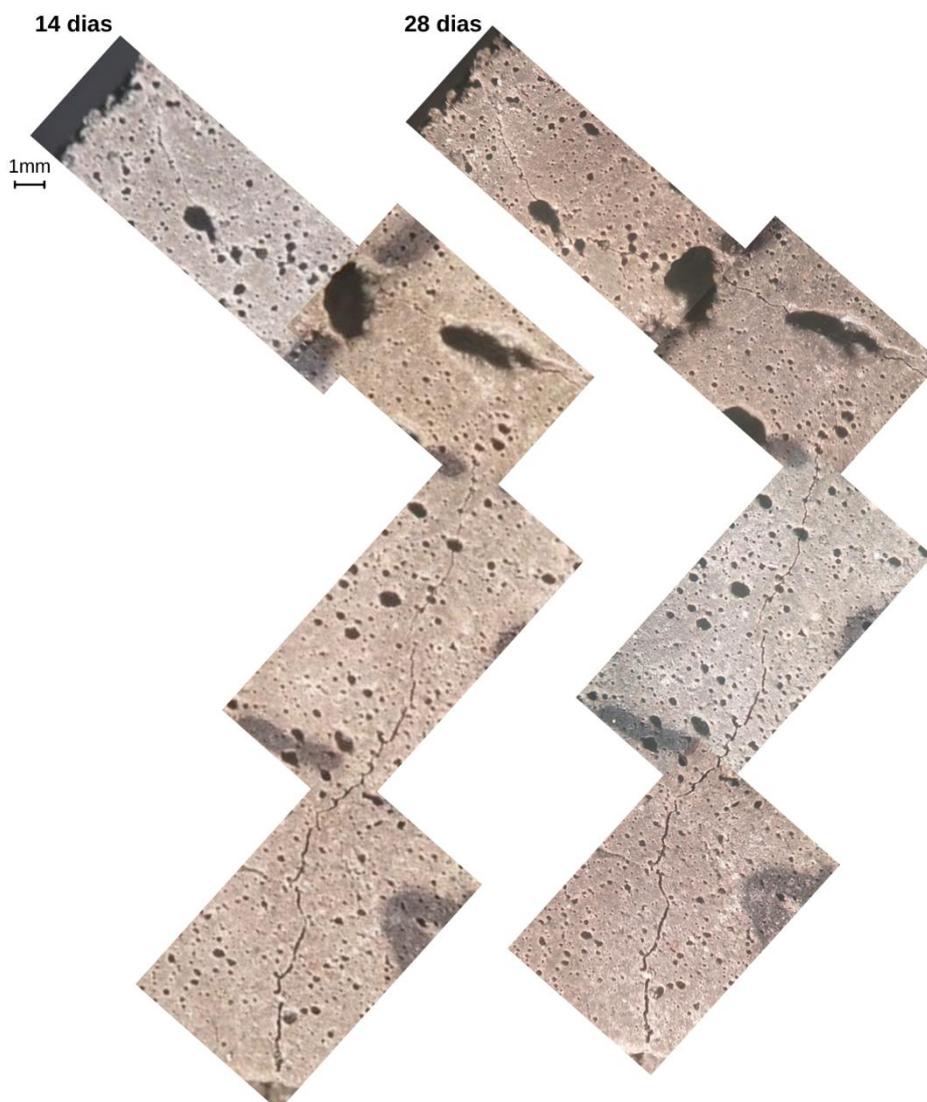
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 39 – Fissura no prisma B-IV 4 (1) aos 0 e 7 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 40 – Fissura no prisma B-IV 4 (1) aos 14 e 28 dias

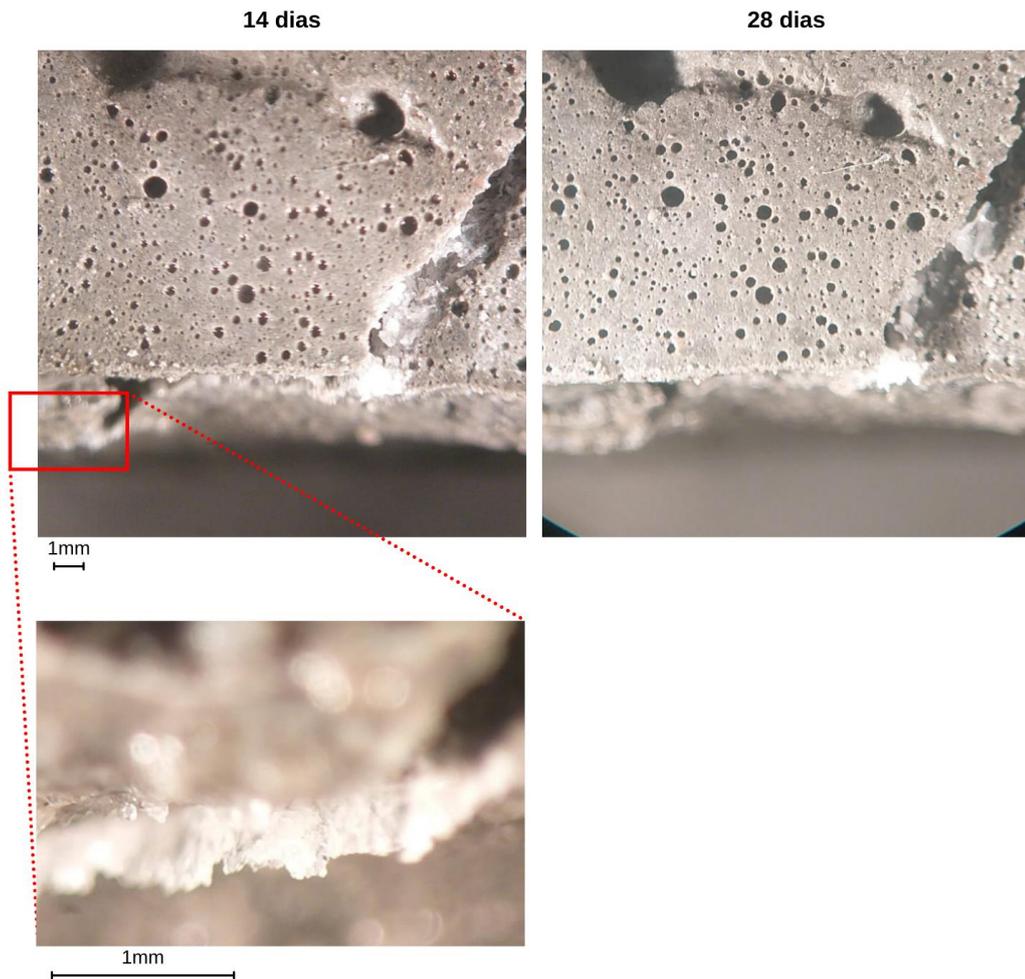


Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que, novamente, não foram formados produtos de cicatrização em nenhuma das fissuras observadas, e assim como as argamassas moldadas com os isolados do solo A, foi observada a ocorrência de produtos de cicatrização de coloração branca, provavelmente CaCO_3 , nas faces laterais e inferior dos prismas. Houve a formação de produtos de cicatrização no interior de uma fissura na lateral do prisma B-I 1 (1) aos 14 dias como apresenta a Figura 41. Já o prisma B-I 1 (2) apresentou produtos de cicatrização em sua face lateral, sendo possível também visualizar esta cicatrização pela face fraturada exposta durante o carregamento do prisma (Figura 42). Neste prisma o surgimento do CaCO_3 se deu aos 14 dias, com aumento do volume de cristais aos 28 dias, ocupando 100% da espessura da fissura. Os prismas B-II 3 (1), B-II 3 (2) e B-II 3 (3) apresentaram produtos de cicatrização na

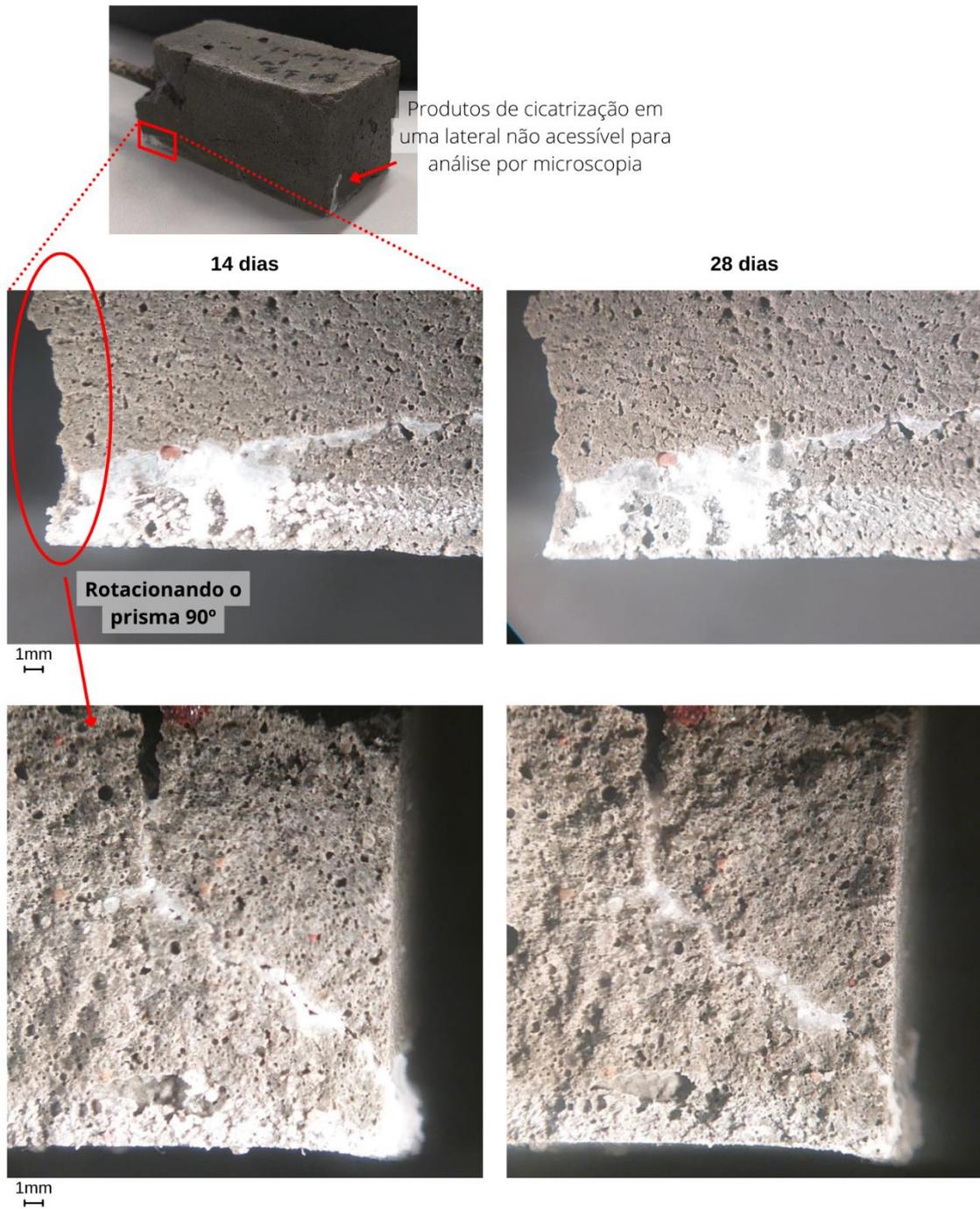
sua face inferior, como mostram as Figura 43, Figura 44 e Figura 45, enquanto no prisma B-IV 4 (1) houve o surgimento pontual de cristais em sua superfície fraturada (Figura 46).

Figura 41 – Produtos de cicatrização em uma fissura na face lateral e na face inferior do prisma B-I 1 (1) – Registros aos 14 e 28 dias



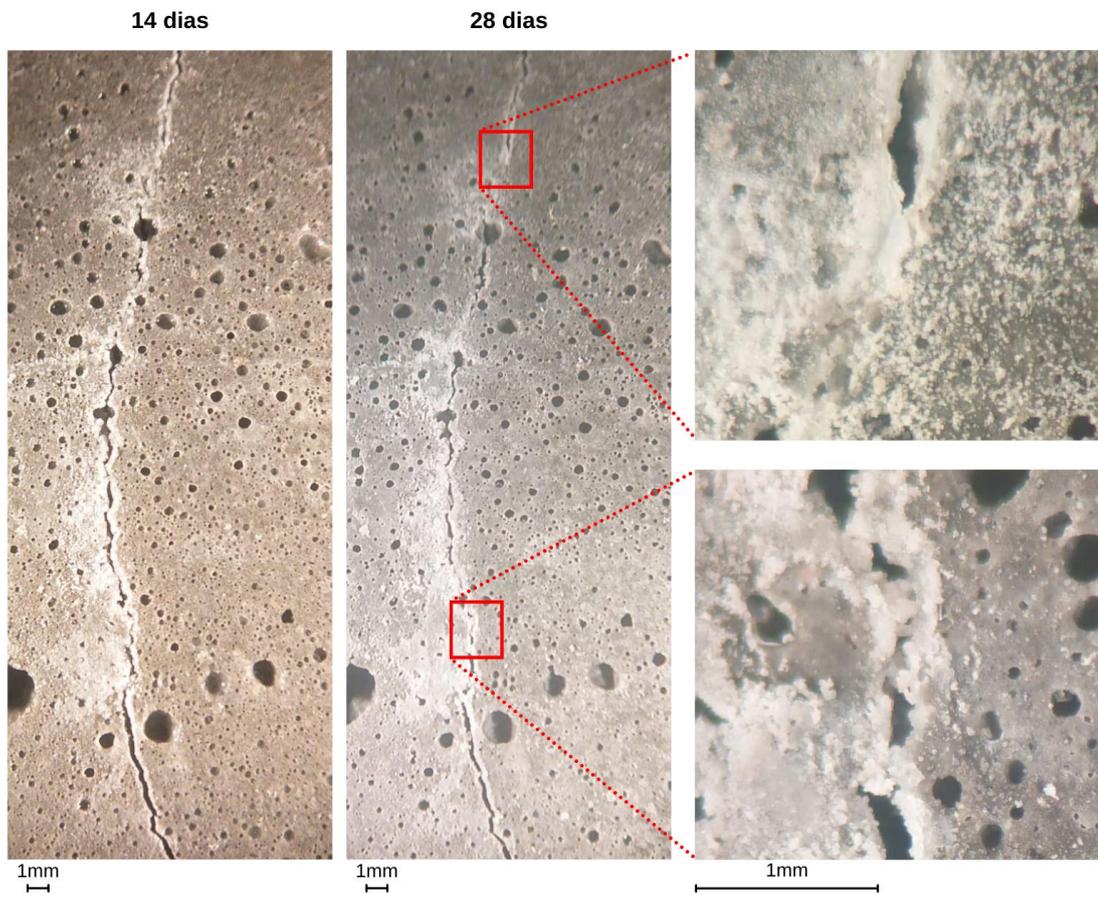
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 42 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral e na superfície exposta fraturada do prisma B-I 1 (2) – Registros aos 14 e 28 dias



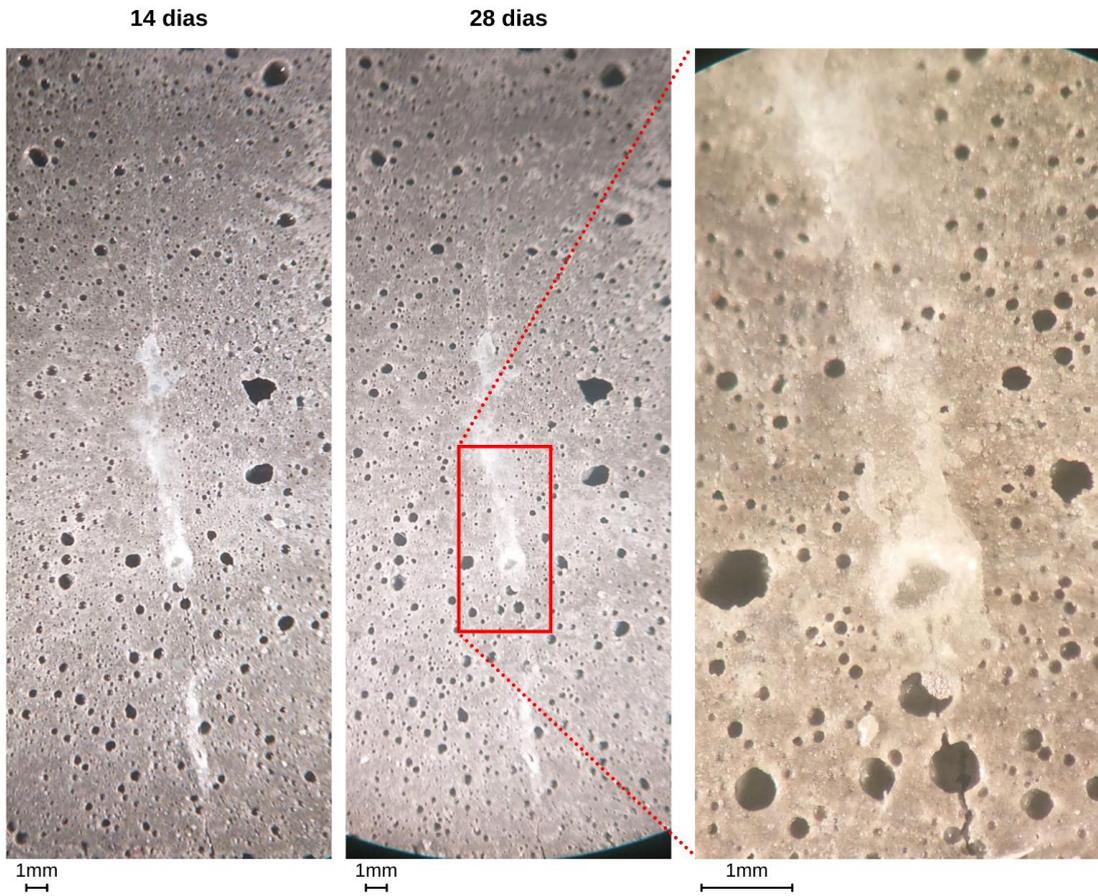
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 43 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face inferior do prisma B-II 3 (1) – Registros aos 14 e 28 dias



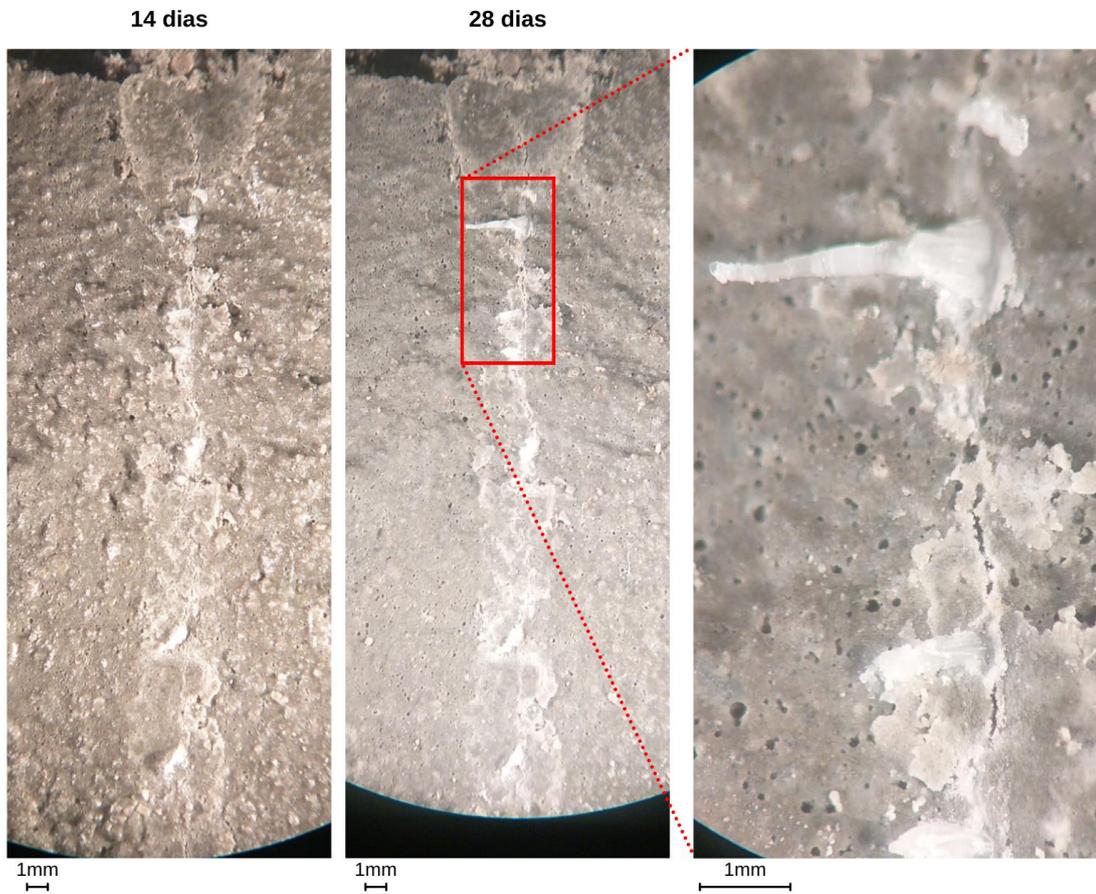
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 44 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face lateral do prisma B-II 3 (2) – Registros aos 14 e 28 dias



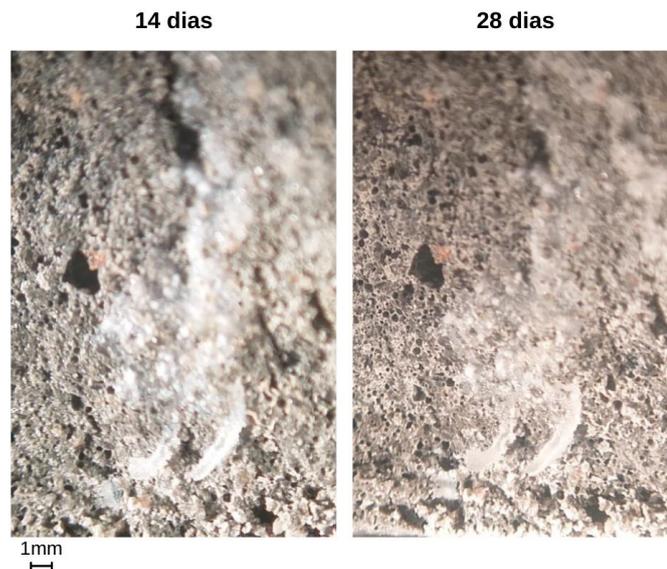
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 45 – Produtos de cicatrização ao longo de uma fissura na face inferior do prisma B-II 3 (3) – Registros aos 14 e 28 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 46 – Formação de cristais na superfície exposta fraturada do prisma B-IV 4 (1) – Registros aos 14 e 28 dias



Fonte: Elaborado pelo autor.

As ocorrências observadas em todos as argamassas moldadas com os isolados do solo B são equivalentes às ocorrências observadas naquelas moldadas com os isolados do solo A. Portanto, as hipóteses apresentadas anteriormente aplicam-se à totalidade das amostras analisadas.

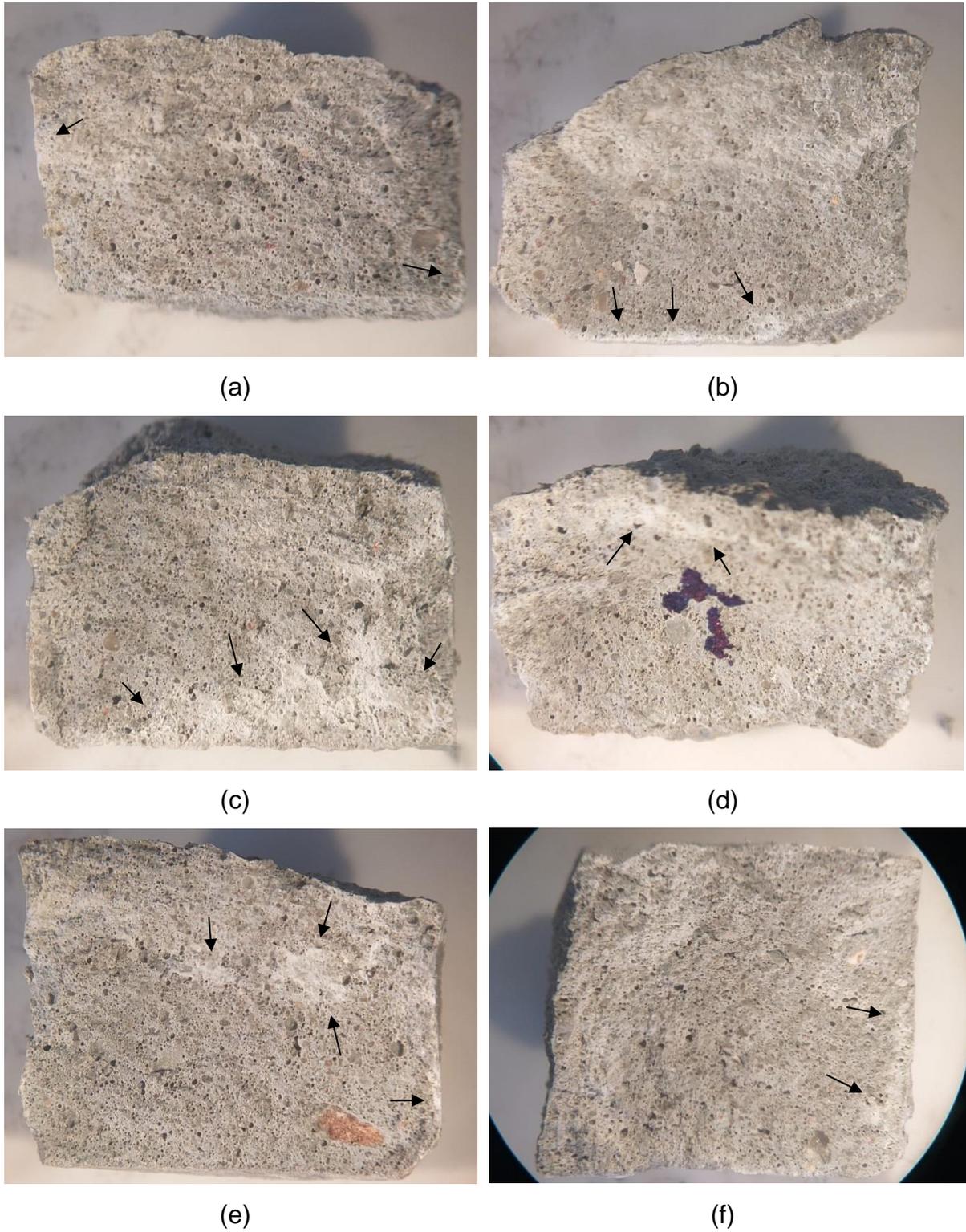
4.3.2 Morfologia, composição elementar e mineralógica dos produtos de cicatrização

Os resultados neste item estão subdivididos conforme as análises realizadas para a obtenção de cada uma das propriedades, conforme: MEV para morfologia dos cristais, EDS para sua composição elementar e DRX para sua composição mineralógica.

4.3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 47 apresenta a superfície exposta da fissura de cada argamassa, obtida após separação das duas metades do prisma fissurado para análise por MEV. Após o período de repouso para autocicatrização, mesmo removendo a fita que envolvia os prismas, eles se mantiveram íntegros, sendo necessário repetir o processo de compressão diametral no mesmo sentido executado para a fissuração inicial. É possível observar regiões com a superfície mais esbranquiçada em cada amostra (indicadas por setas na Figura 47), sendo essas as regiões foco de análise por MEV.

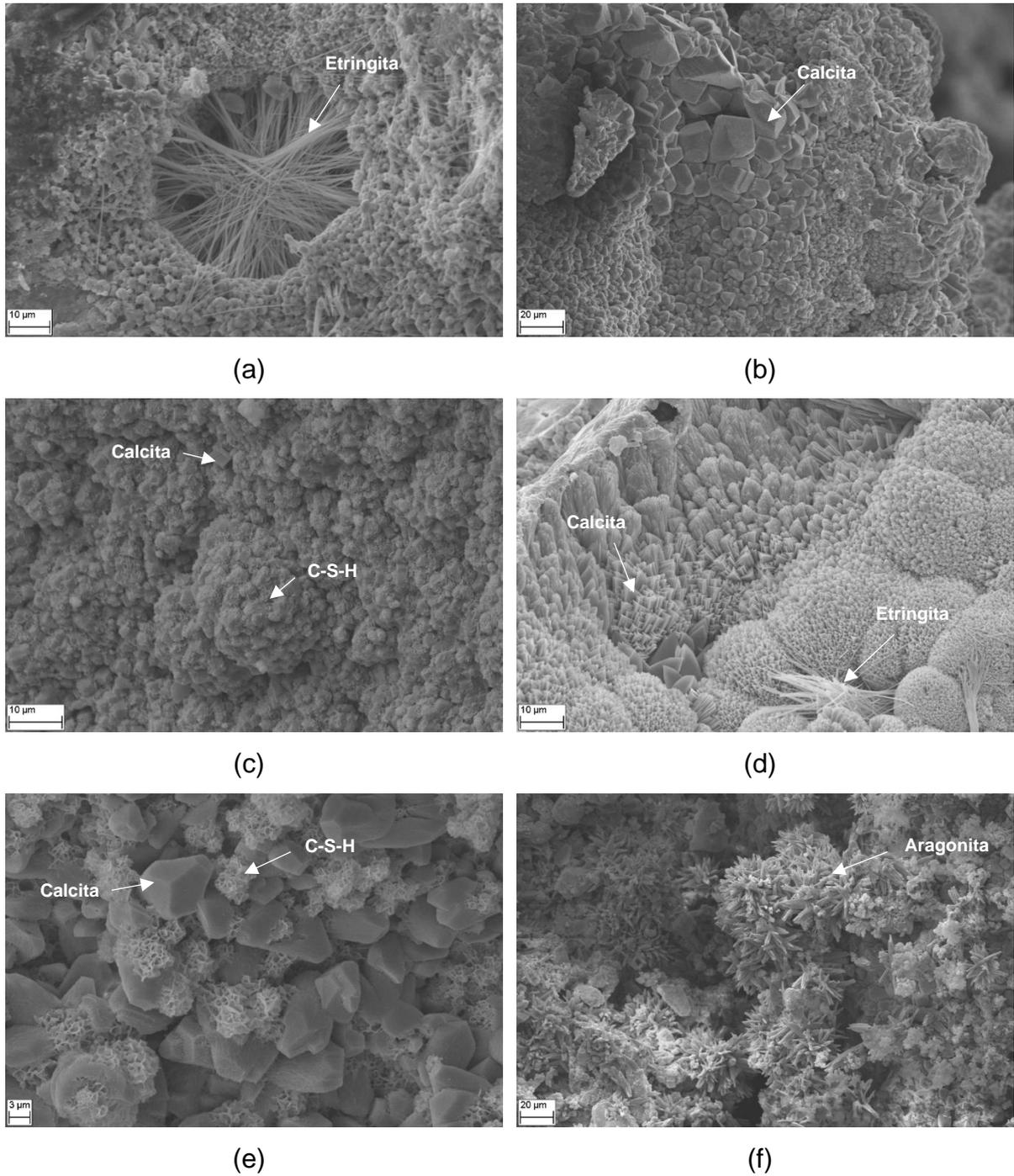
Figura 47 – Superfícies expostas das fissuras para análise por MEV das argamassas
(a) A-II 3, (b) A-V 1.1, (c) A-V 3, (d) B-I 1, (e) B-II 3 e (f) B-IV 4



Fonte: Elaborado pelo autor.

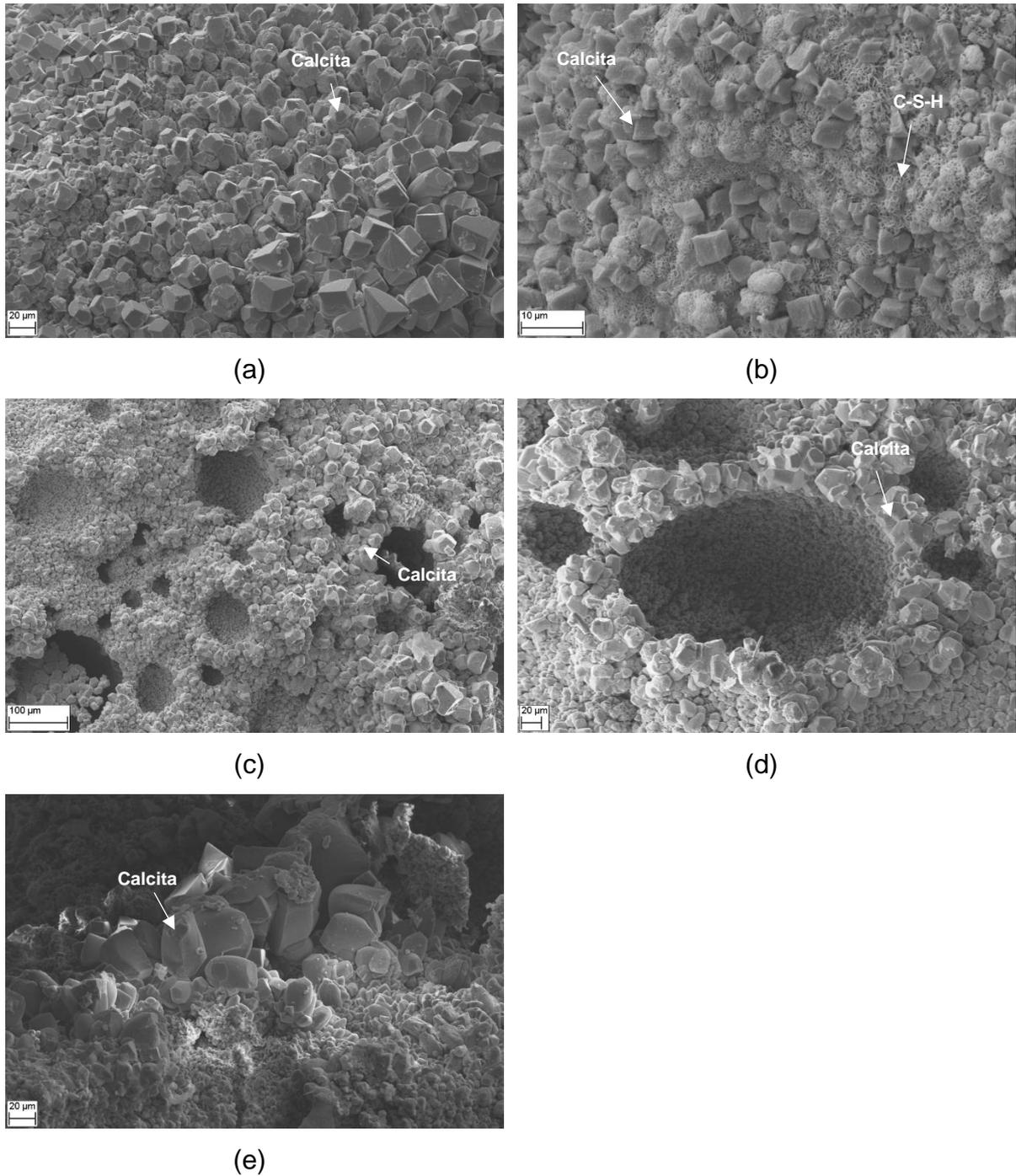
A Figura 48 mostra as micrografias obtidas das argamassas A-II 3, A-V 1.1 e A-V 3, enquanto a Figura 49 apresenta as micrografias das argamassas B-I 1, B-II 3 e B-IV 4. Demais micrografias das amostras são apresentadas no Apêndice B.

Figura 48 – Micrografias das argamassas (a, b) A-II 3, (c, d) A-V 1.1 e (e, f) A-V 3



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 49 – Micrografias das argamassas (a, b) B-I 1, (c, d) B-II 3 e (e) B-IV 4



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar em todas as micrografias que as superfícies das fissuras estão cobertas por estruturas cristalinas de distintas morfologias. Na Figura 48a são visíveis cristais em formato de agulhas preenchendo um poro na matriz cimentícia, o que foi igualmente observado por Chinchón-Payá *et al.* (2011) e é atribuído a formação de etringita, um dos produtos de hidratação do cimento. É interessante apontar que

esta ocorrência gera uma redução na porosidade da matriz cimentícia, o que implica em sua maior compacidade, podendo ser prejudicial à sobrevivência das bactérias encapsuladas nos poros. Esta manifestação de etringita no interior do poro de ar incorporado foi observada também nas amostras A-V 1.1 e A-V 3 (imagens apresentadas no Apêndice B), porém, por ser um produto de hidratação do cimento, é possível extrapolar o resultado para as demais amostras, dado que este é um material presente em todas.

Na Figura 48b e 47d e na Figura 49a, 48c, 48d e 48e, é visível a formação de cristais de formatos retangular e cúbico, o que foi também observado por Wang *et al.* (2018). Uma análise por EDS realizada por estes autores evidenciou que trata-se de CaCO_3 , sendo também constatado por Justo-Reinoso *et al.* (2022) e por Khushnood *et al.* (2022) que este formato de cristal trata-se de uma clivagem romboédrica, associada à calcita. Com relação ao tamanho dos cristais de calcita, é possível observar variações de 1 μm ou menos (Figura 48d) até cristais na ordem de 30 a 40 μm (Figura 48b e Figura 49e) sendo que diferentes tamanhos de cristais são comumente vistos em uma mesma amostra. Outros estudos também apresentam a formação de calcita por bactérias em cristais de 1 μm (KHUSHNOOD *et al.*, 2019) até cristais na ordem de 20 μm (WANG *et al.*, 2018).

Outra formação apresentada, ainda referente à calcita, se trata de uma sobreposição destes cristais por C-S-H cristalizado sob a forma de favo de mel (Figura 48c e 47e; Figura 49b), como apontado pela literatura (BORŠTNAR; DANEU; DOLENEC, 2020; KUNAL *et al.*, 2016). Cabe notar que o C-S-H é um dos produtos de hidratação do cimento, portanto, é esperada sua formação antes da precipitação dos cristais de CaCO_3 . Uma sobreposição do C-S-H sobre o CaCO_3 pode indicar que ainda está ocorrendo a hidratação de partículas anidras de cimento. Outra possibilidade é que esteja ocorrendo a transformação dos cristais de calcita em C-S-H. Na Figura 48e, na região inferior esquerda, é possível observar o que se assemelha a esta transformação, a qual justifica o acréscimo na resistência à compressão observado nas amostras contendo os isolados, visto que o C-S-H é o principal hidrato do cimento responsável pela sua resistência mecânica (MEHTA; MONTEIRO, 2014).

Ainda, outra explicação para esta ocorrência seria na já existência dos cristais de calcita antes do início da hidratação do cimento. Isto é possível visto que as argamassas foram moldadas utilizando no lugar da água, a solução de lactato de cálcio e extrato de levedura na qual as bactérias foram cultivadas. Ao realizarem a

moldagem de um compósito cimentício com uma solução de nutrientes na qual as bactérias foram cultivadas, tal qual realizado neste presente estudo, foi indicado por Basaran Bundur, Kirisits e Ferron (2015) que o crescimento das bactérias é associado ao consumo dos nutrientes (no caso desta pesquisa: lactato de cálcio e extrato de levedura). Conforme apresentado no item 2.3, o consumo de nutrientes faz parte do metabolismo bacteriano (MADIGAN et al., 2016) e, no caso do consumo de lactato de cálcio, é realizada a MICP (JONKERS et al., 2010). Dessa forma, fica evidente que a solução utilizada para moldagem das argamassas teve parte de seus nutrientes metabolizados, resultando na existência de CaCO_3 em suspensão, sendo então justificado este aparente surgimento de C-S-H por sobre os cristais de calcita.

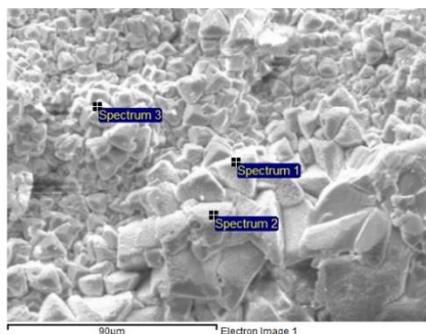
Em contrapartida, Xu, Wang e Wang (2018) também apresentaram micrografias de calcitas aparentemente cobertas por C-S-H. Entretanto, os autores encapsularam as bactérias em areia de fundição, o que é incomparável com a hipótese apresentada anteriormente, visto que em seu estudo não havia bactérias ou nutrientes metabolizados em suspensão na água de amassamento das amostras. Neste caso, a micrografia apresentada pelos autores reforça a hipótese de hidratação tardia de cimento anidro após a MICP. Cabe salientar que tal ocorrência de C-S-H sobre calcita não foi comentada pelos autores em sua publicação.

Finalmente, uma única micrografia (Figura 48f) indica a formação de cristais em formato de agulhas, agrupados em conjuntos que irradiam de um centro comum. Esta configuração é bastante semelhante à observada por Ševčík, Šašek e Viani (2018) para cristais de CaCO_3 identificados como aragonita. A amostra A-V 3 foi a única a apresentar esta estrutura cristalina para as análises por MEV. É possível que a bactéria utilizada nesta amostra seja a única capaz de precipitar aragonita, porém não é possível afirmar isto visto que a análise por MEV é realizada em escala micrométrica e pode não representar o comportamento da amostra completa.

4.3.2.2 Espectroscopia de energia dispersiva

As Figura 50, 51, 52, 53, 54 e 55 apresentam, respectivamente, os resultados de EDS para as estruturas cristalinas observadas nas amostras A-II 3, A-V 1.1, A-V 3, B-I 1, B-II 3 e B-IV 4.

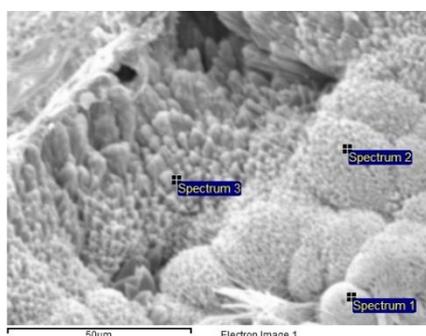
Figura 50 – Composição elemental de estrutura cristalina na amostra A-II 3



Elemento	% massa		
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3
C	42,55	41,89	35,75
O	42,26	35,64	43,90
Mg	0,38	-	-
Al	0,22	-	-
Ca	14,58	22,47	20,34

Fonte: Elaborado pelo autor.

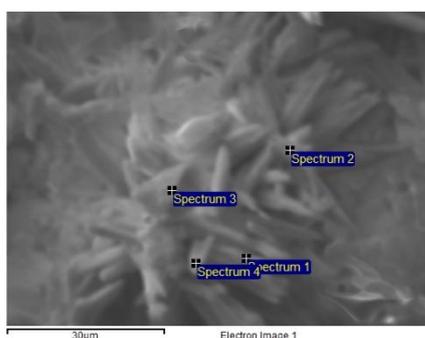
Figura 51 – Composição elemental de estrutura cristalina na amostra A-V 1.1



Elemento	% massa		
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3
C	38,06	36,39	34,06
O	50,44	52,23	44,36
Ca	11,50	44,36	21,58

Fonte: Elaborado pelo autor.

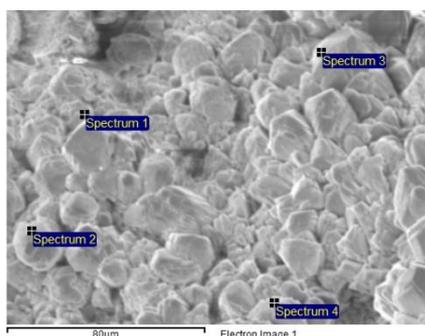
Figura 52 - Composição elemental de estrutura cristalina na amostra A-V 3



Elemento	% massa			
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3	Spectrum 4
C	20,43	23,71	27,88	17,79
N	-	-	9,16	-
O	40,86	42,75	35,23	41,26
Na	-	-	0,76	-
Mg	0,41	0,35	1,25	0,26
Al	-	-	-	0,09
Si	0,45	-	19,31	0,70
Ca	37,85	33,19	6,42	39,90

Fonte: Elaborado pelo autor.

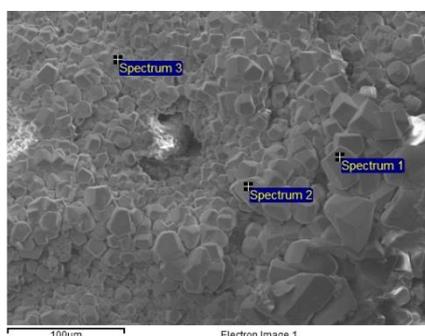
Figura 53 – Composição elemental de estrutura cristalina na amostra B-I 1



Elemento	% massa			
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3	Spectrum 4
C	30,51	40,32	31,43	39,40
O	41,00	46,43	45,26	48,90
Si	-	-	0,13	-
Ca	28,48	12,79	23,18	11,70
Fe	-	0,46	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

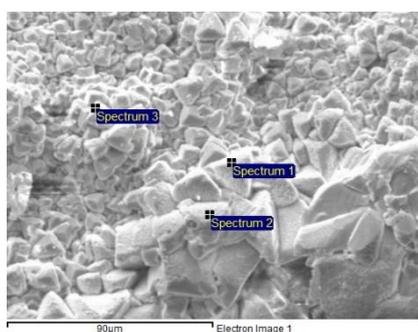
Figura 54 – Composição elemental de estrutura cristalina na amostra B-II 3



Elemento	% massa		
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3
C	38,89	42,81	23,30
O	37,16	43,94	33,97
Ca	23,95	13,24	42,74

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 55 - Composição elemental de estrutura cristalina na amostra B-IV 4



Elemento	% massa		
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3
C	17,33	40,75	36,07
N	15,34	-	-
O	28,84	52,43	44,58
K	-	0,06	-
Ca	38,49	6,76	19,36

Fonte: Elaborado pelo autor.

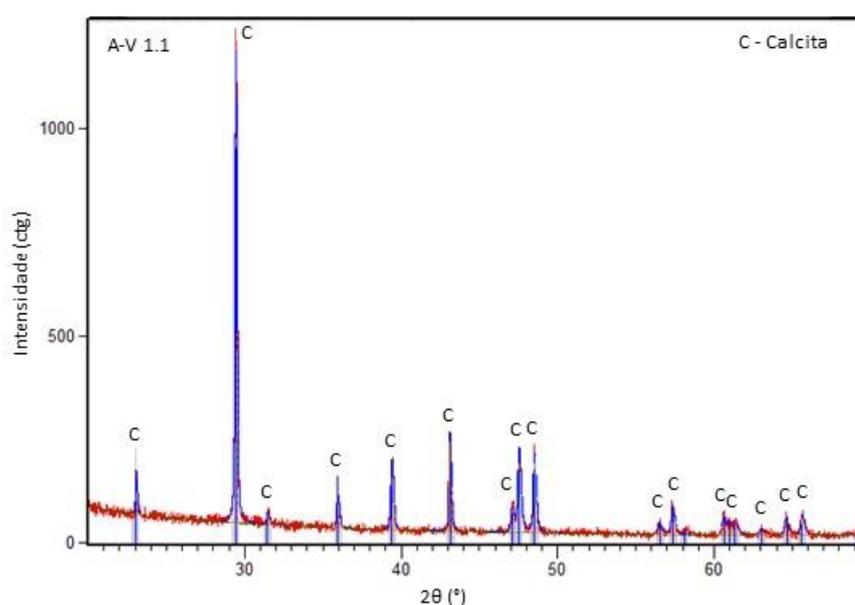
Além da identificação de morfologia das estruturas cristalinas dadas anteriormente, classificando os precipitados como calcita e aragonita, é possível verificar sua composição elemental dada por EDS. As Figura 50, 51, 53, 54 e 55 apresentam os resultados para amostras com morfologia de calcita, enquanto apenas a Figura 52 apresenta uma amostra com morfologia de aragonita. Todas as estruturas analisadas são formadas majoritariamente por C, O e Ca, reforçando que realmente se trata de CaCO_3 e corroborando com resultados de EDS encontrados na literatura

(CHAERUN; SYARIF; WATTIMENA, 2020; JUSTO-REINOSO et al., 2022; WANG et al., 2018; XU; WANG; WANG, 2018; YUAN et al., 2022). A estrutura caracterizada como aragonita também apresentou grandes percentuais destes elementos, indicando novamente uma provável estrutura cristalina de CaCO_3 que não calcita. Neste caso, é observado também a presença de Mg, tipicamente associado a formações de aragonita (MEHTA; MONTEIRO, 2014). Conforme apontam Xu, Wang e Wang (2018), a presença de nitrogênio vista em A-V 3 (Figura 52) e em B-IV 4 (Figura 55) indicam a presença de nutrientes (neste caso, extrato de levedura) adicionados às amostras, enquanto Si, Al e Fe são observados em menor quantidade, o que também foi encontrado em algumas amostras deste estudo (Figura 50, Figura 52 e Figura 53). Outros elementos minoritários como K (Figura 55) e, novamente, Mg (Figura 50 e Figura 52) são atribuídos pela literatura à hidratos constituintes da pasta de cimento (JUSTO-REINOSO et al., 2022).

4.3.2.3 Difração de raios X

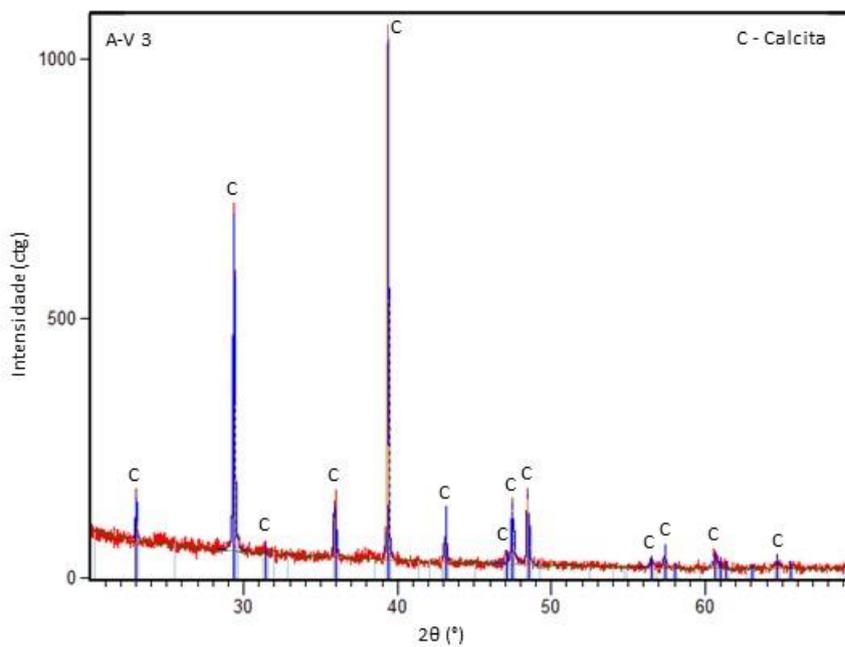
Os resultados obtidos na análise por DRX para as amostras A-V 1.1, A-V 3, B-I 1, B-II 3 e B-IV 4 são apresentadas nas Figura 56, Figura 57, Figura 58, Figura 59 e Figura 60. Conforme visto em no item 4.2.1, a amostra A-II 3 não apresentou produtos de cicatrização visíveis em sua superfície, logo, não foi coletado material para a execução da análise via DRX.

Figura 56 – Difratoograma da amostra A-V 1.1



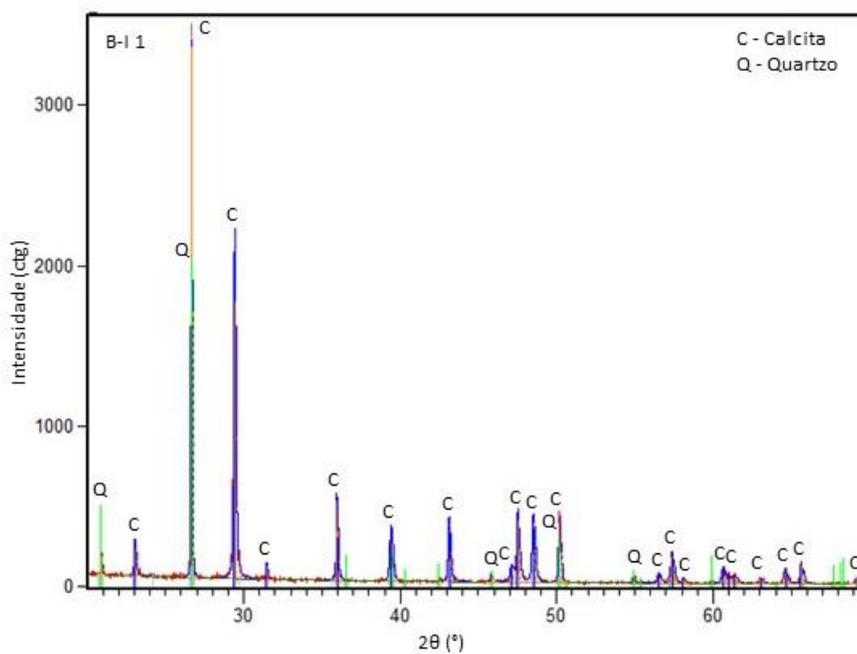
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 57 – Difratoograma da amostra A-V 3



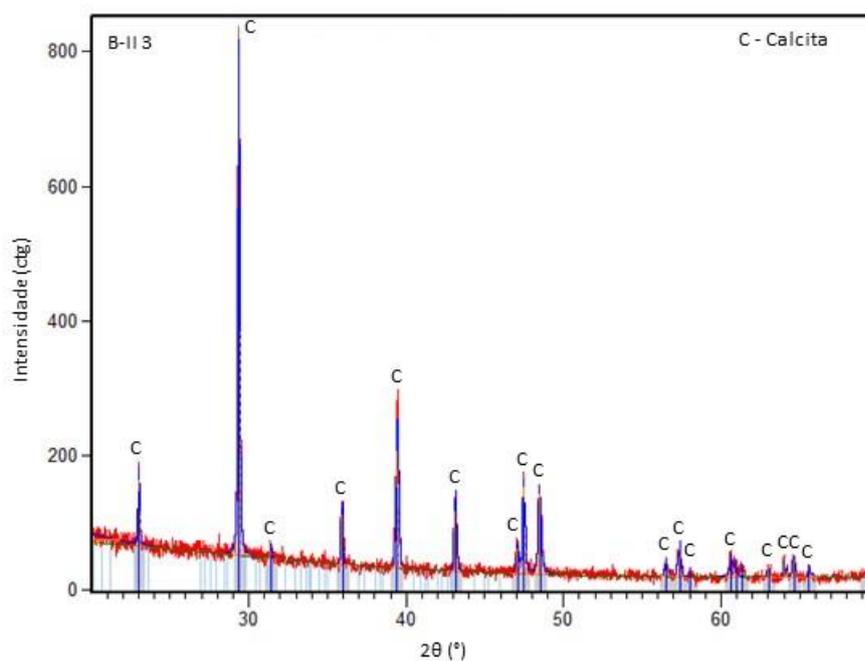
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 58 – Difratoograma da amostra B-I 1



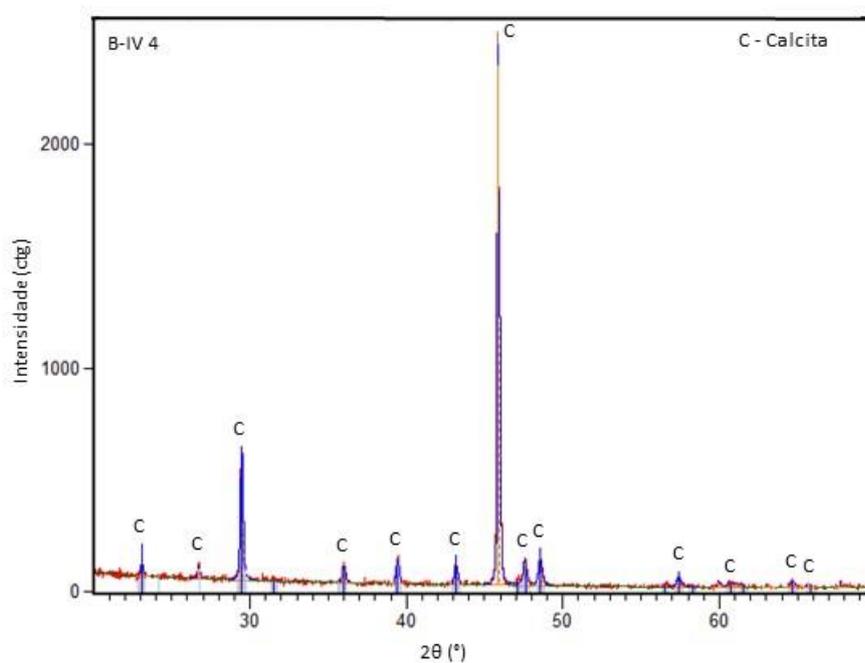
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 59 – Difratograma da amostra B-II 3



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 60 – Difratograma da amostra B-IV 4



Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as amostras analisadas apresentaram picos característicos de calcita, em concordância com os resultados da MEV e da EDS. A literatura também apresenta análises em que os produtos de cicatrização são identificados via DRX como calcita (XU; WANG; WANG, 2018; YUAN et al., 2022). Apenas a amostra B-I 1 apresentou

picos característicos de quartzo, mineral constituinte da areia utilizada como agregado miúdo, tendo também sido observado nos difratogramas de Xu, Wang e Wang (2018).

4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os resultados apresentam, em pelo menos uma das análises realizadas, a ocorrência de MICP e de autocicatrização nas amostras de todos os isolados. Estes resultados indicam que a utilização de ar incorporado como meio de encapsulamento das bactérias na matriz foi efetiva. A Tabela 6 apresenta uma síntese dos resultados individuais já apresentados e discutidos anteriormente.

Tabela 6 – Síntese dos resultados

Isolado	Gênero	Resistência à compressão			Análise visual*	MEV, EDS e DRX
		7 dias		28 dias		
		Em relação à referência	Em relação à referência	Em relação aos 7 dias		
A-II 3	<i>Cronobacter</i>	+87%	+10%	0%	Nenhuma cicatrização foi observada	Calcita, etringita nos poros de ar incorporado Traços de Mg e Al (matriz cimentícia)
A-V 1.1	<i>Cronobacter</i>	+147%	+108%	+42%	Surgimento de cristais ao longo de fissura aos 7 dias, com crescimento aos 14 dias e redução aos 28 dias	Calcita e calcita com C-S-H
A-V 3	-	+63%	+32%	+37%	Surgimento pontual de cristais aos 7 e aos 14 dias	Calcita com C-S-H e aragonita Traços de N (nutrientes), Na, Mg, Al e Si (matriz cimentícia)
B-I 1	<i>Bacillus</i>	+59%	+20%	+27%	Surgimento de cristais ao longo de fissura aos 14 dias, com crescimento aos 28 dias	Calcita e calcita com C-S-H Traços de Si e Fe (matriz cimentícia)
B-II 3	<i>Citrobacter</i>	+72%	+28%	+26%	Surgimento de cristais ao longo de fissura aos 14 dias	Calcita
B-IV 4	<i>Pseudomonas</i>	+57%	+21%	+31%	Surgimento de cristais ao longo de fissura aos 14 dias, com crescimento aos 28 dias	Calcita Traços de N (nutrientes) e K (matriz cimentícia)

* Exceto para a fissura principal, a qual não apresentou cicatrização em nenhuma das amostras.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A execução deste trabalho teve como objetivo geral a avaliação do potencial de formação de CaCO_3 por bactérias indígenas adicionadas em uma matriz cimentícia encapsuladas em bolhas de ar incorporado. Dessa forma, no que se refere ao isolamento e à classificação das bactérias, é possível observar que o método utilizado de cultivo em meio de lactato de cálcio foi favorável ao isolamento de bactérias capazes de atuar na cicatrização de um compósito cimentício. Dentre os isolados classificados, destacam-se B-I 1 e B-IV 4 por serem, respectivamente, dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, os quais já foram estudados por diversos autores para a elaboração de compósitos cimentícios autocicatrizantes, além de os *Bacillus* possuírem capacidade de gerar esporos para uma melhor sobrevivência na matriz cimentícia. Os outros isolados (A-II 3, A-V 1.1 e B-II 3) foram classificados como enterobactérias, sendo potenciais patógenos para humanos, o que lhes destaca negativamente por expor os trabalhadores que teriam contato com estes microrganismos durante a produção do material, além dos futuros usuários destas edificações.

Em termos da resistência potencial à compressão das argamassas desenvolvidas, as amostras moldadas com bactérias obtiveram ganhos entre 57 e 87% aos 7 dias e entre 10 e 32% aos 28 dias, quando comparadas à amostra referência. Em exceção, o isolado A-V 1.1 apresentou um ganho expressivo de 147 e 108% na resistência aos 7 dias e 28 dias, respectivamente. Entretanto, cabe notar que este isolado foi classificado como enterobactéria. Para o isolado A-II 3 foi observado uma estagnação na resistência entre os 7 e os 28 dias, sendo uma das hipóteses levantadas com base na literatura, um impacto negativo na resistência devido à inserção de nutrientes orgânicos na matriz cimentícia.

As análises visuais através de microscopia óptica indicaram que não houve MICP nas fissuras na parte superior das amostras, mas sim na sua região inferior. Foi observado, para algumas das bactérias, a ocorrência de cicatrização na forma de cristais de coloração branca já aos 7 dias, podendo ou não se intensificar nas semanas seguintes. Os resultados parecem indicar também uma perda dos produtos de cicatrização após sua formação, sendo essa uma potencial explicação para a ausência desses produtos na zona superior das amostras, uma vez que podem ter se

desprendido e carregados para regiões mais profundas, inacessíveis ao microscópio ou para fora da amostra.

Ao realizar análises da morfologia e das composições elementar e mineralógicas dos produtos de cicatrização, ficou evidente que se trata de CaCO_3 , como era esperado através da metabolização do lactato de cálcio utilizado como nutriente para as bactérias. Em sua maioria, as amostras apresentaram a cristalização do CaCO_3 como calcita, com grãos de tamanhos entre 1 e 40 μm , embora aragonita também tenha sido observada em uma das argamassas.

O conjunto dos resultados observados indica que as bactérias utilizadas neste estudo foram capazes de atuar promovendo a MICP. Dessa forma, é observado sucesso no seu encapsulamento em bolhas de ar incorporado, utilizando o meio de cultura com as células em suspensão em substituição à água de amassamento pura na preparação do material. Grande parte dos resultados aqui apresentados estão em sinergia com resultados observados em publicações realizadas nesta área de pesquisa, indicando que os isolados obtidos possuem um potencial de uso para desenvolvimento de estudos futuros. Ressalta-se, mais uma vez, que parte dos isolados, caracterizados como enterobactérias, não foram estudados anteriormente como agentes de cicatrização em materiais cimentícios e foram indicados pela literatura como patógenos.

REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR 13279: Argamassa para assentamento e revestimento de paredes e tetos - Determinação da resistência à tração na flexão e à compressão**, 2005.

ABNT. **NBR 6118: Projeto de estruturas de concreto - Procedimento**, 2014.

ABNT. **NBR 12655 - Concreto de cimento Portland - Preparo, controle, recebimento e aceitação - Procedimento**, 2015a.

ABNT. **NBR 5738: Concreto - Procedimento para moldagem e cura de corpos de prova**, 2015b.

ABNT. **NBR 16697: Cimento Portland - Requisitos**, 2018.

ABNT. **NBR 7215: Cimento Portland - Determinação da resistência à compressão de corpos de prova cilíndricos**, 2019.

ABNT. **NBR 16887 - Concreto - Determinação do teor de ar em concreto fresco - Método pressométrico**, 2020.

ABNT. **ABNT NBR 16916 - Agregado miúdo - Determinação da densidade e da absorção de água**, 2021.

ABNT. **NBR 17054 - Agregados - Determinação da composição granulométrica - Método de ensaio**, 2022.

ABREU, É. F. **Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário**. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ACHAL, V.; MUKERJEE, A.; REDDY, M. S. Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. **Construction and Building Materials**, v. 48, p. 1–5, 2013.

ACHAL, V.; MUKERJEE, A.; SUDHAKARA REDDY, M. Biogenic treatment improves the durability and remediates the cracks of concrete structures. **Construction and**

Building Materials, v. 48, p. 1–5, 2013.

AFIFUDIN, H. et al. **Microbial Participation in the Formation of Calcium Silicate Hydrated (CSH) from Bacillus Subtilis**. *Procedia Engineering. Anais...2011*

ALAZHARI, M. et al. Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 160, p. 610–619, 2018a.

ALAZHARI, M. et al. Application of expanded perlite encapsulated bacteria and growth media for self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 160, p. 610–619, 30 jan. 2018b.

ALDEA, C.-M. et al. Extent of Healing of Cracked Normal Strength Concrete. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 12, n. 1, p. 92–96, 26 jul. 2000.

ALGAIIFI, H. A. et al. Bio-inspired self-healing of concrete cracks using new *B. pseudomycooides* species. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 12, p. 967–981, 2021.

ALGHAMRI, R.; KANELLOPOULOS, A.; AL-TABBAA, A. Impregnation and encapsulation of lightweight aggregates for self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 124, p. 910–921, 2016a.

ALGHAMRI, R.; KANELLOPOULOS, A.; AL-TABBAA, A. Impregnation and encapsulation of lightweight aggregates for self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, 2016b.

ALVES, K. J. **Comunidades de arqueias metanogênicas em diferentes usos dos solos da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

ALYOUSIF, A. **Self-Healing Capability of Engineered Cementitious Composites Incorporating Different Types of Pozzolanic Materials**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Civil), Ryerson University, Toronto, 2016.

AMER ALGAIIFI, H. et al. Insight into the role of microbial calcium carbonate and the factors involved in self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v.

254, p. 119–258, 2020.

ANDALIB, R. et al. Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. **Construction and Building Materials**, v. 118, n. August, p. 180–193, 2016.

BASARAN BUNDUR, Z.; KIRISITS, M. J.; FERRON, R. D. Biomineralized cement-based materials: Impact of inoculating vegetative bacterial cells on hydration and strength. **Cement and Concrete Research**, v. 67, p. 237–245, 2015

BENTZ, D. P. et al. Multi-scale investigation of the performance of limestone in concrete. **CONSTRUCTION & BUILDING MATERIALS**, v. 75, p. 1–10, 2015.

BOQUET, E.; BORONAT, A.; RAMOS-CORMENZANA, A. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. **Nature**, v. 246, p. 527–529, 1973.

BORŠTNAR, M.; DANEU, N.; DOLENEC, S. Phase development and hydration kinetics of belite-calcium sulfoaluminate cements at different curing temperatures. **Ceramics International**, v. 46, n. 18, p. 29421–29428, 2020.

CAPPELLESSO, V. G. **Avaliação da autocicatrização de fissuras em concretos com diferentes cimentos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2018.

CARMONA FILHO, A.; CARMONA, T. G. **Fissuração nas Estruturas de Concreto**. Mérida, 2013.

CELADYN, W. Durability of Buildings and Sustainable Architecture. **Czasopismo Techniczne**, 2014.

CHAERUN, S. K.; SYARIF, R.; WATTIMENA, R. K. Bacteria incorporated with calcium lactate pentahydrate to improve the mortar properties and self-healing occurrence. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

CHAURASIA, L. et al. A novel approach of biomineralization for improving micro and macro-properties of concrete. **Construction and Building Materials**, v. 195, p. 340–351, 2019.

CHEMROUK, M. The deteriorations of reinforced concrete and the option of high performances reinforced concrete. **Procedia Engineering**, v. 125, p. 713–724, 2015.

CHEN, H. J. et al. Self-healing concrete by biological substrate. **Materials**, v. 12, n. 24, p. 1–16, 2019.

CHEN, H.; QIAN, C.; HUANG, H. Self-healing cementitious materials based on bacteria and nutrients immobilized respectively. **Construction and Building Materials**, v. 126, p. 297–303, 2016.

CHINCHÓN-PAYÁ, S. et al. **The Sulfate Attack in Concrete by Degradation of Iron Sulfides and the Effect of the Host Rock**. International Conference on Durability of Building Materials and Components. **Anais...**2011

ÇOPUROĞLU, O. et al. Experimental Techniques Used to Verify Healing. In: DE ROOIJ, M. et al. (Eds.). . **State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee 221-SHC: Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials**. [s.l.] Springer, 2013. p. 19–64.

DE BELIE, N.; WANG, J. Bacteria-based repair and self-healing of concrete. **Journal of Sustainable Cement-Based Materials**, v. 5, n. 1, p. 35–56, 2015.

DE MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. **Ecological Engineering**, v. 36, p. 118–136, 2010.

DE ROOIJ, M. et al. (EDS.). **State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee 221-SHC: Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials**. [s.l.] Springer, 2013.

DE ROOIJ, M. R.; SCHLANGEN, E.; JOSEPH, C. Introduction. In: DE ROOIJ, M. et al. (Eds.). . **State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee 221-SHC: Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials**. [s.l.] Springer, 2013. p. 1– 18.

DE WENDEN, C. W. CITIES AND MIGRATIONS : AN OVERVIEW. **GLOCALISM: JOURNAL OF CULTURE, POLITICS AND INNOVATION**, v. 3, p. 1–11, 2021.

DODD, C. E. R. Pseudomonas: Introduction. In: BATT, C. A.; TORTORELO, M. LOU (Eds.). . **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014. v. 3p.

244–247.

EDVARDESEN, C. Water Permeability and Autogenous Healing of Cracks in Concrete. **Aci Materials Journal**, v. 96, n. 4, p. 448–454, 1999.

EHRENBRING, H. Z. **Desenvolvimento de Engineered Cementitious Composites (ECC) autocicatrizantes com diferentes fibras poliméricas e agentes de cicatrização**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2020.

ERŞAN, Y. Ç. et al. Enhanced crack closure performance of microbial mortar through nitrate reduction. **Cement and Concrete Composites**, v. 70, p. 159–170, 2016.

FAHIMIZADEH, M. et al. Biological self-healing of cement paste and mortar by non-ureolytic bacteria encapsulated in alginate hydrogel capsules. **Materials**, v. 13, n. 17, 2020.

GRANGER, S. **Caractérisation expérimentale et modélisation du phénomène d'auto-cicatrisation des fissures dans les bétons**. [s.l.] Ecole Centrale de Nante, 2006.

GUPTA, S.; PANG, S. D.; KUA, H. W. Autonomous healing in concrete by bio-based healing agents – A review. **Construction and Building Materials**, v. 146, p. 419–428, 2017.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HEEREN, N.; HELLWEG, S. Tracking Construction Material over Space and Time: Prospective and Geo-referenced Modeling of Building Stocks and Construction Material Flows. **Journal of Industrial Ecology**, v. 23, n. 1, p. 253–267, 2019.

HOSSEINI BALAM, N.; MOSTOFINEJAD, D.; EFTEKHAR, M. Effects of bacterial remediation on compressive strength, water absorption, and chloride permeability of lightweight aggregate concrete. **Construction and Building Materials**, v. 145, p. 107–116, 2017.

IGARASHI, S.; KUNIEDA, M.; NISHIWAKI, T. **Committee Report: JCI-TC075B. Technical Committee on Autogenous Healing in Cementitious Materials.** [s.l.: s.n.].

IGLEWSKI, B. H. Pseudomonas. In: BARON, S. (Ed.). . **Medical Microbiology.** 4. ed. Galveston: [s.n.].

JADHAV, U. U. et al. Viability of bacterial spores and crack healing in bacteria-containing geopolymer. **Construction and Building Materials**, v. 169, p. 716–723, 2018.

JANG, I. et al. Effects of spray-dried co-cultured bacteria on cement mortar. **Construction and Building Materials**, v. 243, p. 118206, 2020.

JENSON, I. Bacillus: Introduction. In: BATT, C. A.; TORTORELO, M. LOU (Eds.). . **Encyclopedia of Food Microbiology.** 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014. v. 1p. 111–117.

JIANG, L. et al. Sugar-coated expanded perlite as a bacterial carrier for crack-healing concrete applications. **Construction and Building Materials**, v. 232, 2020.

JONKERS, H. M. et al. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 230–235, 2010.

JONKERS, H. M. Bacteria-based self-healing concrete. **Frankfurter Afrikanistische Blätter**, v. 8, n. 1, p. 49–79, 2011.

JONKERS, H. M.; THIJSEN, A. Bacteria Mediated Remediation of Concrete Structures. **2nd International Symposium on Service Life Design for Infrastructure**, n. October, p. 833–840, 2010.

JOSEPH, C. et al. Experimental investigation of adhesive-based self-healing of cementitious materials. **Magazine of Concrete Research**, v. 62, n. 11, p. 831–843, 2010.

JOSHI, S.; GOYAL, S.; SUDHAKARA REDDY, M. Bio-consolidation of cracks with fly ash amended biogrouting in concrete structures. **Construction and Building Materials**, v. 300, p. 124044, 2021.

JUSTO-REINOSO, I. et al. Air-entraining admixtures as a protection method for bacterial spores in self-healing cementitious composites: Healing evaluation of early and later-age cracks. **Construction and Building Materials**, v. 327, n. January, p. 126877, 2022.

KALHORI, H.; BAGHERPOUR, R. Application of carbonate precipitating bacteria for improving properties and repairing cracks of shotcrete. **Construction and Building Materials**, v. 148, p. 249–260, 2017.

KARIMI, N.; MOSTOFINEJAD, D. Bacillus subtilis bacteria used in fiber reinforced concrete and their effects on concrete penetrability. **Construction and Building Materials**, v. 230, p. 117051, 2020.

KEOLEIAN, G.; KENDALL, A.; DETTLING, J. Life-cycle cost model for evaluating the sustainability of bridge decks. **Lcc**, n. Unfpa 2001, p. 143–150, 2005.

KHALIQ, W.; EHSAN, M. B. Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. **Construction and Building Materials**, v. 102, p. 349–357, 2016.

KHUSHNOOD, R. A. et al. Bio-inspired self-healing cementitious mortar using Bacillus subtilis immobilized on nano-/micro-additives. **Journal of Intelligent Material Systems and Structures**, v. 30, n. 1, p. 3–15, 2019.

KHUSHNOOD, R. A. et al. Bio-mineralized self-healing recycled aggregate concrete for sustainable infrastructure. **Science of the Total Environment**, v. 703, p. 135007, 2020.

KHUSHNOOD, R. A. et al. Bio-inspired self-healing and self-sensing cementitious mortar using Bacillus subtilis immobilized on graphitic platelets. **Construction and Building Materials**, v. 316, n. August 2021, p. 125818, 2022.

KOUTSOUMANIS, K. P.; LIANOU, A.; SOFOS, J. N. Food Safety: Emerging Pathogens. In: **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 3p. 250–272.

KUA, H. W. et al. Biochar-immobilized bacteria and superabsorbent polymers enable

self-healing of fiber-reinforced concrete after multiple damage cycles. **Cement and Concrete Composites**, v. 100, n. September 2018, p. 35–52, 2019.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

KUNAL et al. Influence of Bacterial-Treated Cement Kiln Dust on Strength and Permeability of Concrete. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 28, n. 10, p. 1–11, 2016.

LEE, Y. S.; PARK, W. Current challenges and future directions for bacterial self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 3059–3070, 2018.

LI, V. C. et al. Recovery against Mechanical Actions. In: DE ROOIJ, M. et al. (Eds.). . **State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee 221-SHC: Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials**. [s.l.] Springer, 2013. p. 119–216.

LI, V. C.; HERBERT, E. Robust Self-Healing Concrete for Sustainable Infrastructure. **Journal of Advanced Concrete Technology**, v. 10, p. 207–218, 2012.

LICORDARI, M. Le béton armé dans le concept de patrimoine à préserver. **e-Phaïstos**, v. 4, p. 72–82, 2015.

LING, H.; QIAN, C. Effects of self-healing cracks in bacterial concrete on the transmission of chloride during electromigration. **Construction and Building Materials**, n. 144, p. 406–411, 2017.

LOTTHENBACH, B. et al. Influence of limestone on the hydration of Portland cements. **Cement and Concrete Research**, v. 38, n. 6, p. 848–860, 2008.

LUCAS, S. S. et al. Study of self-healing properties in concrete with bacteria encapsulated in expanded clay. **Science and Technology of Materials**, v. 30, n. January, p. 93–98, 2018.

LUO, M.; QIAN, C. Influences of bacteria-based self-healing agents on cementitious materials hydration kinetics and compressive strength. **Construction and Building**

Materials, v. 121, p. 659–663, 2016.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Grupo A Educação S.A., 2016.

MEHTA, P. K.; MONTEIRO, P. J. M. **Concreto Microestrutura, Propriedades e Materiais**. 2. ed. São Paulo: [s.n.].

MIHASHI, H.; NISHIWAKI, T. Development of Engineered Self-Healing and Self-Repairing Concrete-State-of-the-Art Report. **Journal of Advanced Concrete Technology**, v. 10, n. 5, p. 170–184, 2012.

MULLER, V. **Avaliação da influência da concentração de soluções bacterianas de Bacillus subtilis AP91 no desenvolvimento de materiais cimentícios autocicatrizantes**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia Civil), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2019.

MULLER, V. et al. Analysis of cementitious matrices self-healing with bacillus bacteria. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 15, n. 4, p. 1–17, 2022.

MÜLLER, V.; PACHECO, F.; TUTIKIAN, B. Técnicas e Metodologias de Biomineralização na Cicatrização de Fissuras do Concreto. **Revista de Arquitetura IMED**, v. 8, n. 2, p. 164–182, 2019.

NAIN, N. et al. Enhancement in strength parameters of concrete by application of Bacillus bacteria. **Construction and Building Materials**, v. 202, p. 904–908, 2019.

NIELSEN, S. D. et al. Constraints on CaCO₃ precipitation in superabsorbent polymer by aerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 365–375, 2020.

OLSTEIN, A. et al. Paradigm diagnostics salmonella indicator broth (PDX-SIB) for detection of salmonella on selected environmental surfaces. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 2, p. 404–412, 2013.

PACHECO, F. **Análise da eficácia dos mecanismos de autocicatrização do concreto**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2020.

PARASTEGARI, N.; MOSTOFINEJAD, D.; POURSIINA, D. Use of bacteria to improve electrical resistivity and chloride penetration of air-entrained concrete. **Construction and Building Materials**, v. 210, p. 588–595, 2019.

PATEL, A. K. et al. Enterobacteriaceae, Coliforms and E.Coli: Introduction. In: BATT, C. A.; TORTORELO, M. LOU (Eds.). . **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2014. v. 1p. 659–666.

QIAN, C. et al. Bio-mineralization on cement-based materials consuming CO₂ from atmosphere. **Construction and Building Materials**, v. 106, p. 126–132, 2016.

QIAN, C. et al. Application of microbial self-healing concrete: Case study. **Construction and Building Materials**, v. 290, p. 123226, 2021a.

QIAN, C. et al. Bio-mineralization induced by *Bacillus mucilaginosus* in crack mouth and pore solution of cement-based materials. **Materials Science and Engineering C**, v. 126, n. March, p. 112120, 2021b.

QU, Z. et al. A simple method to create hydrophobic mortar using bacteria grown in liquid cultures. **Construction and Building Materials**, v. 297, p. 123744, 2021.

RAMACHANDRAN, S. K.; RAMAKRISHNAN, V.; BANG, S. S. Remediation of Concrete Using Micro-Organisms. **ACI Materials Journal**, v. 98, n. 1, p. 3–9, 2001.

RAUF, M. et al. Comparative performance of different bacteria immobilized in natural fibers for self-healing in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 258, p. 119578, 2020.

RECENA, F. A. P. **Retração do Concreto**. Porto Alegre: [s.n.], 2014.

RECHE, M. H. L. R. et al. Diversity of culturable Gram-negative bacteria isolated from irrigation water of two rice crop regions in Southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 6, 2016.

REINHARDT, H. W. et al. Recovery against Environmental Action. In: DE ROOIJ, M. et al. (Eds.). . **State-of-the-Art Report of RILEM Technical Committee 221-SHC: Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials**. [s.l.] Springer, 2013. p. 65–118.

REINHARDT, H. W.; JOOSS, M. Permeability and self-healing of cracked concrete as a function of temperature and crack width. **Cement and Concrete Research**, v. 33, n. 7, p. 981–985, 2003.

RIZWAN, S. A. et al. Use of Effective Micro-organisms (EM) technology and self-compacting concrete (SCC) technology improved the response of cementitious systems. **Construction and Building Materials**, v. 152, p. 642–650, 2017.

ROSSI, E. et al. Assessment of Functional Performance, Self-Healing Properties and Degradation Resistance of Poly-Lactic Acid and Polyhydroxyalkanoates Composites. **Polymers**, v. 14, n. 5, 2022.

ŞAHMARAN, M.; LI, V. C. Durability properties of micro-cracked ECC containing high volumes fly ash. **Cement and Concrete Research**, v. 39, n. 11, p. 1033–1043, 2009.

SANGADJI, S. **Porous Network Concrete a bio-inspired building component to make concrete structures self-healing**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Institut Teknologi Bandung, Banyuwangi, 2015.

SCHLANGEN, E.; HEIDE, N. TER; BREUGEL, K. VAN. Crack Healing of Early Age Cracks in Concrete. **Measuring, Monitoring and Modeling Concrete Properties**, p. 273–284, 2007.

SCHWANTES-CEZARIO, N.; NOGUEIRA, G. S. F.; TORALLES, B. M. Biocimentação de compósitos cimentícios mediante adição de esporos de *Bacillus subtilis* AP91. **Revista De Engenharia Civil IMED**, v. 4, n. 2, p. 142–158, 2017.

SEIFAN, M. et al. Amine-modified magnetic iron oxide nanoparticle as a promising carrier for application in bio self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 175–184, 2018a.

SEIFAN, M. et al. Bio-reinforced self-healing concrete using magnetic iron oxide nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 5, p. 2167–2178, 2018b.

SEIFAN, M. et al. The role of magnetic iron oxide nanoparticles in the bacterially induced calcium carbonate precipitation. **Applied Microbiology and Biotechnology**,

v. 102, n. 8, p. 3595–3606, 2018c.

SEIFAN, M. et al. Mechanical properties of bio self-healing concrete containing immobilized bacteria with iron oxide nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 10, p. 4489–4498, 2018d.

SEIFAN, M.; SAMANI, A. K.; BERENJIAN, A. **Bioconcrete: next generation of self-healing concrete** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016.

ŠEVČÍK, R.; ŠAŠEK, P.; VIANI, A. Physical and nanomechanical properties of the synthetic anhydrous crystalline CaCO₃ polymorphs: vaterite, aragonite and calcite. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 6, p. 4022–4033, 2018.

SHAHEEN, N. et al. Synthesis and characterization of bio-immobilized nano/micro inert and reactive additives for feasibility investigation in self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 226, p. 492–506, 2019.

SIDDIQUE, R. et al. Influence of bacteria on compressive strength and permeation properties of concrete made with cement baghouse filter dust. **Construction and Building Materials**, v. 106, p. 461–469, 2016a.

SIDDIQUE, R. et al. Properties of bacterial rice husk ash concrete. **Construction and Building Materials**, v. 121, p. 112–119, 2016b.

SIDDIQUE, R. et al. Effect of bacteria on strength, permeation characteristics and micro-structure of silica fume concrete. **Construction and Building Materials**, v. 142, p. 92–100, 2017a.

SIDDIQUE, R. et al. Effect of bacteria on strength, permeation characteristics and micro-structure of silica fume concrete. **Construction and Building Materials**, v. 142, p. 92–100, 2017b.

SIERRA-BELTRAN, M. G.; JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair. **Construction and Building Materials**, v. 67, n. PART C, p. 344–352, 2014.

SISOMPHON, K.; COPUROGLU, O.; FRAAIJ, A. Application of encapsulated lightweight aggregate impregnated with sodium monofluorophosphate as a self-

healing agent in blast furnace slag mortar. **Heron**, v. 56, n. 1–2, p. 17–36, 2011.

SONG, Y. et al. A novel granular sludge-based and highly corrosion-resistant bio-concrete in sewers. **Science of the Total Environment**, v. 791, p. 148270, 2021.

SU, Y. et al. Influence of bacterial self-healing agent on early age performance of cement-based materials. **Construction and Building Materials**, v. 218, p. 224–234, 2019.

TAN, L. et al. Effect of carbonation on bacteria-based self-healing of cementitious composites. **Construction and Building Materials**, v. 257, p. 119501, 2020.

TAYEBANI, B.; MOSTOFINEJAD, D. Self-healing bacterial mortar with improved chloride permeability and electrical resistance. **Construction and Building Materials**, v. 208, p. 75–86, 2019.

THE BUSINESS RESEARCH COMPANY. **Cement And Concrete Products Global Market Report 2021: COVID 19 Impact and Recovery to 2030**, 2021.

TZIVILOGLOU, E. et al. Bacteria-based self-healing concrete to increase liquid tightness of cracks. **Construction and Building Materials**, 2016.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 1996**, 1996.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 1997**, 1997.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 1998**, 1998.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 1999**, 1999.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2000**, 2000.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2001**, 2001.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2002**, 2002.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2003**, 2003.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2004**, 2004.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2005**, 2005.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2006**, 2006.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2007**, 2007.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2008**, 2008.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2009**, 2009.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2010**, 2010.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2011**, 2011.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2012**, 2012.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2013**, 2013.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2014**, 2014.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2015**, 2015.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2016**, 2016.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2017**, 2017.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2018**, 2018.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2019**, 2019.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Mineral Commodity Summaries 2020**, 2020.

VAN BREUGEL, K. Is there a market for self-healing cement-based materials? *In: Proceedings of the First International Conference on Self Healing Materials*, Noordwijk, Netherlands, p. 1–9, 2007.

WANG, J. et al. X-ray computed tomography proof of bacterial-based self-healing in concrete. **Cement & Concrete Composites**, v. 53, p. 289–304, 2014a.

WANG, J. et al. Application of modified-alginate encapsulated carbonate producing bacteria in concrete: A promising strategy for crack self-healing. **Frontiers in**

Microbiology, v. 6, n. OCT, p. 1–14, 2015.

WANG, J. et al. *Bacillus sphaericus* LMG 22257 is physiologically suitable for self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 12, p. 5101–5114, 2017.

WANG, J. et al. A chitosan based pH-responsive hydrogel for encapsulation of bacteria for self-sealing concrete. **Cement and Concrete Composites**, v. 93, n. May, p. 309–322, 2018.

WANG, J. Y. et al. Application of hydrogel encapsulated carbonate precipitating bacteria for approaching a realistic self-healing in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 68, p. 110–119, 2014b.

WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. Quantification of crack-healing in novel bacteria based self-healing concrete. **Cement & Concrete Composites**, v. 33, p. 763–770, 2011.

WU, M. et al. Application of bacterial spores coated by a green inorganic cementitious material for the self-healing of concrete cracks. **Cement and Concrete Composites**, v. 113, n. 579, p. 103718, 2020.

XU, H. et al. Self-Healing Concrete Using Rubber Particles to Immobilize Bacterial Spores. **Materials**, v. 12, p. 1–16, 2019.

XU, J. et al. Application of ureolysis-based microbial CaCO₃ precipitation in self-healing of concrete and inhibition of reinforcement corrosion. **Construction and Building Materials**, v. 265, p. 120364, 2020.

XU, J.; WANG, X. Self-healing of concrete cracks by use of bacteria-containing low alkali cementitious material. **Construction and Building Materials**, v. 167, p. 1–14, 2018.

XU, J.; WANG, X.; WANG, B. Biochemical process of ureolysis-based microbial CaCO₃ precipitation and its application in self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 3121–3132, 2018.

YAMAOKA-YANO, D. M.; VALARINI, P. J. Métodos de identificação de bactérias. In: DE MELO, I. S.; DE AZEVEDO, J. L. (Eds.). . **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna:

EMBRAPA, 1998. p. 369–390.

YANG, Y.; YANG, E. H.; LI, V. C. Autogenous healing of engineered cementitious composites at early age. **Cement and Concrete Research**, v. 41, n. 2, p. 176–183, 2011.

YUAN, H. et al. Application of zeolite as a bacterial carrier in the self-healing of cement mortar cracks. **Construction and Building Materials**, v. 331, n. March, p. 127324, 2022.

ZAMANI, M. et al. Bacteria encapsulation using synthesized polyurea for self-healing of cement paste. **Construction and Building Materials**, v. 249, p. 118556, 2020.

ZHANG, B. et al. Synthesis of actinomorphic flower-like SnO₂ nanorods decorated with CuO nanoparticles and their improved isopropanol sensing properties. **Applied Surface Science**, v. 456, n. June, p. 586–593, 2018.

ZHANG, J. et al. Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 148, p. 610–617, 2017a.

ZHANG, J. et al. Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 148, p. 610–617, 2017b.

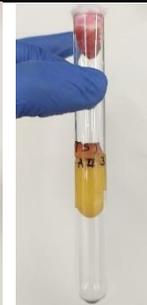
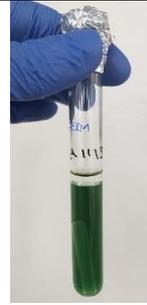
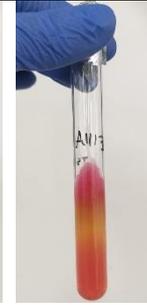
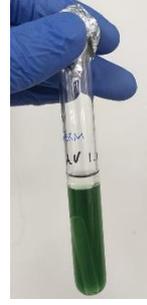
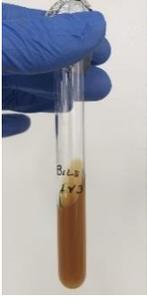
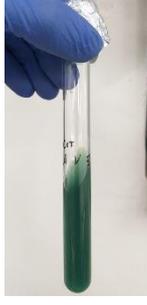
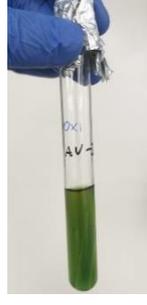
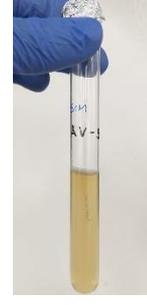
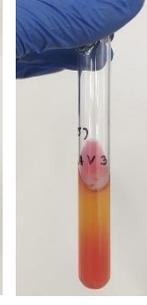
ZHANG, J. et al. Aragonite formation induced by open cultures of microbial consortia to heal cracks in concrete: Insights into healing mechanisms and crystal polymorphs. **Construction and Building Materials**, v. 224, p. 815–822, 2019.

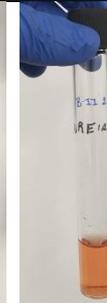
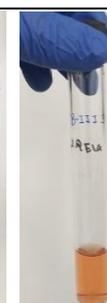
ZHANG, J. L. et al. Screening of bacteria for self-healing of concrete cracks and optimization of the microbial calcium precipitation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6661–6670, 2016.

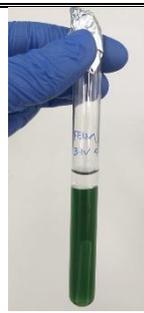
ZHANG, Z.; DING, Y.; QIAN, S. Influence of bacterial incorporation on mechanical properties of engineered cementitious composites (ECC). **Construction and Building Materials**, v. 196, p. 195–203, 2019.

APÊNDICE A – PROVAS BIOQUÍMICAS DOS 10 ISOLADOS ANALISADOS E COLÔNIAS DOS 6 ISOLADOS SELECIONADOS PARA USO

Tabela A.1 – Resultados das provas bioquímicas (visual)

Isolado	Bile	Citrato	Oxidação	Fermentação	SIM	TSI	Ureia
A-II 3							
A-III 3							
A-V 1.1							
A-V 3							

Isolado	Bile	Citrato	Oxidação	Fermentação	SIM	TSI	Ureia
B-I 1							
B-II 2							
B-II 3							
B-III 1							
B-III 3							

Iso- lad o	Bile	Citrato	Oxida- ção	Fermen- tação	SIM	TSI	Ureia
B-IV 4							

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A.2 – Resultados das provas bioquímicas e exclusão dos isolados duplicatas

Isolado	Catalase	Motilidade	Urease	Oxidação	Fermentação	Bile	TSI (ápice/base)	Citrato	Decisão de uso
A-II 3	+	+	-	+	+	+	Rosa/Amarelo	+	Utilizado
A-III 3	-	-	-	-	-	-	Rosa/Amarelo	-	Excluído (= A-V 1.1)
A-V 1.1	-	-	-	-	-	-	Rosa/Amarelo	-	Utilizado
A-V 3	+	-	-	-	+	-	Rosa/Amarelo	-	Utilizado
B-I 1	+	-	-	-	-	-	Rosa/Amarelo	-	Utilizado
B-II 2	+	-	-	-	-	-	Rosa/Amarelo	-	Excluído (= B-I 1)
B-II 3	+	-	-	+	+	-	Rosa/Amarelo	-	Utilizado
B-III 1	+	-	-	-	-	-	Amarelo/Rosa	-	Excluído (= B-IV 4)
B-III 3	+	-	-	+	+	-	Rosa/Amarelo	-	Excluído (= B-II 3)
B-IV 4	+	-	-	-	-	-	Amarelo/Amarelo	-	Utilizado

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura A.1 – Colônias dos isolados (a) A-II 3, (b) A-V 1.1, (c) A-V 3, (d) B-I 1, (e) B-II 3 e (f) B-IV 4



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

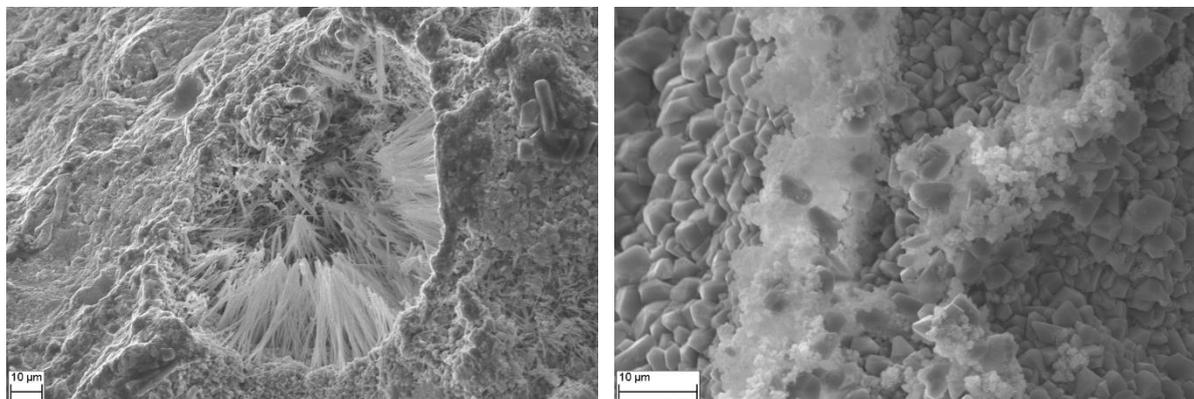


(f)

Fonte: Elaborado pelo autor.

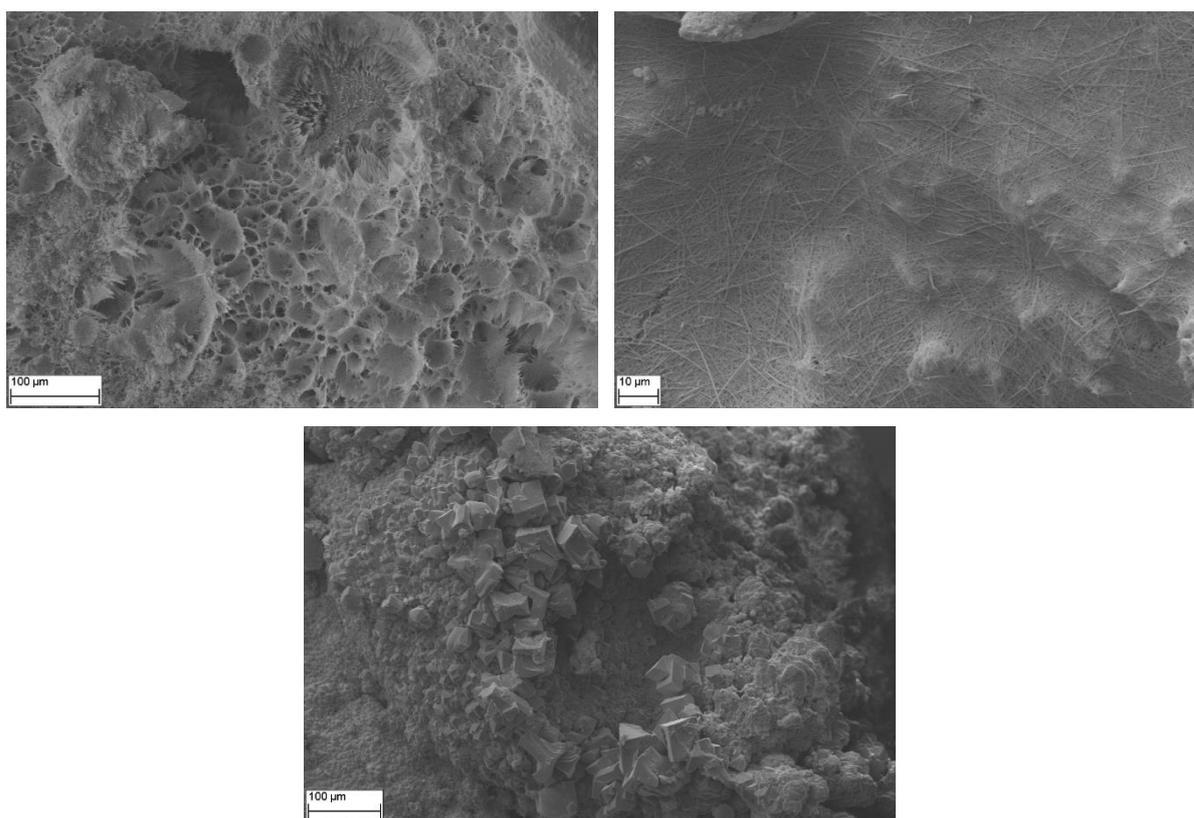
APÊNDICE B – MICROGRAFIAS ADICIONAIS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Figura B.1 – Micrografias da amostra A-II 3



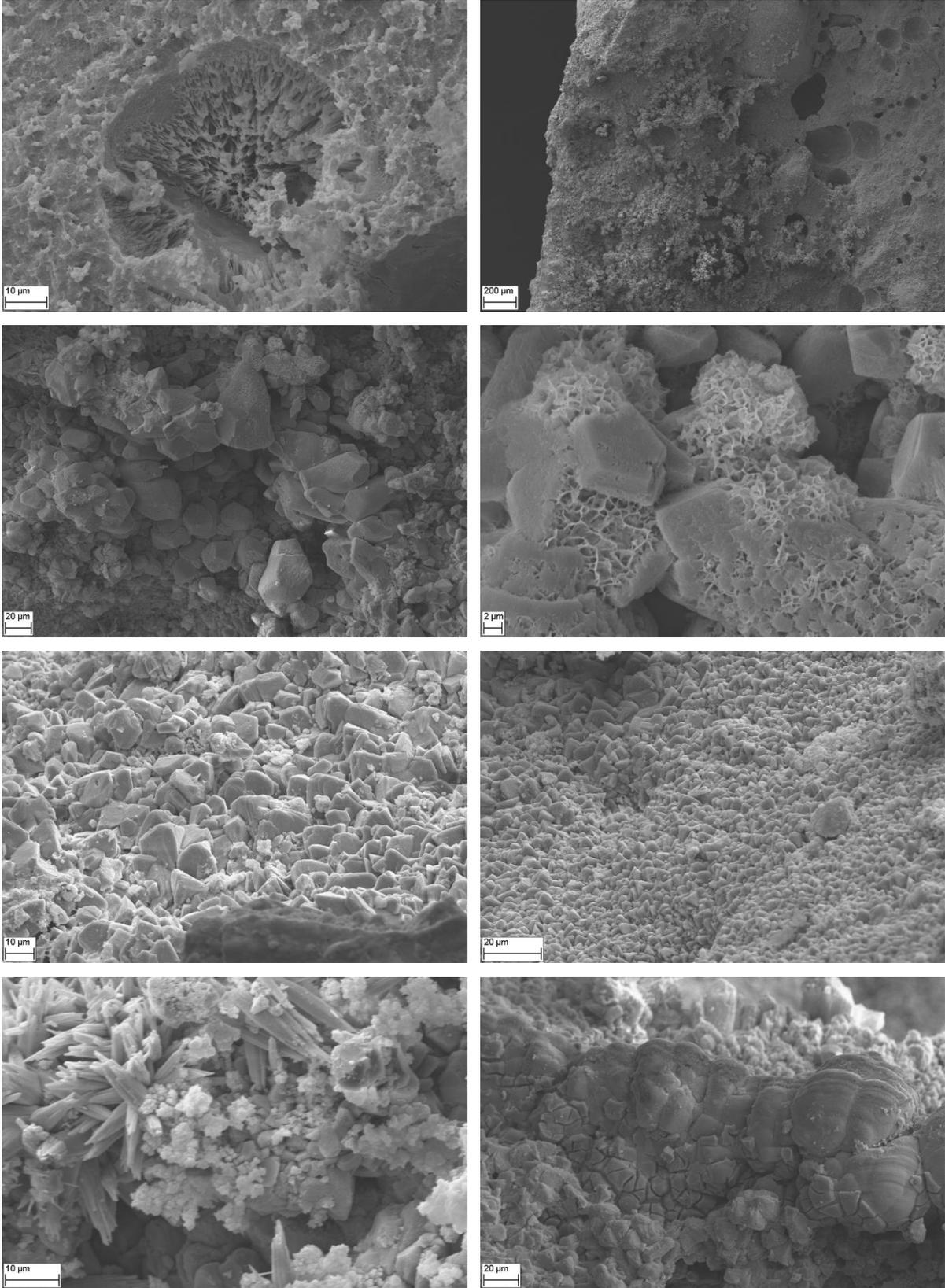
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura B.2 – Micrografias da amostra A-V 1.1



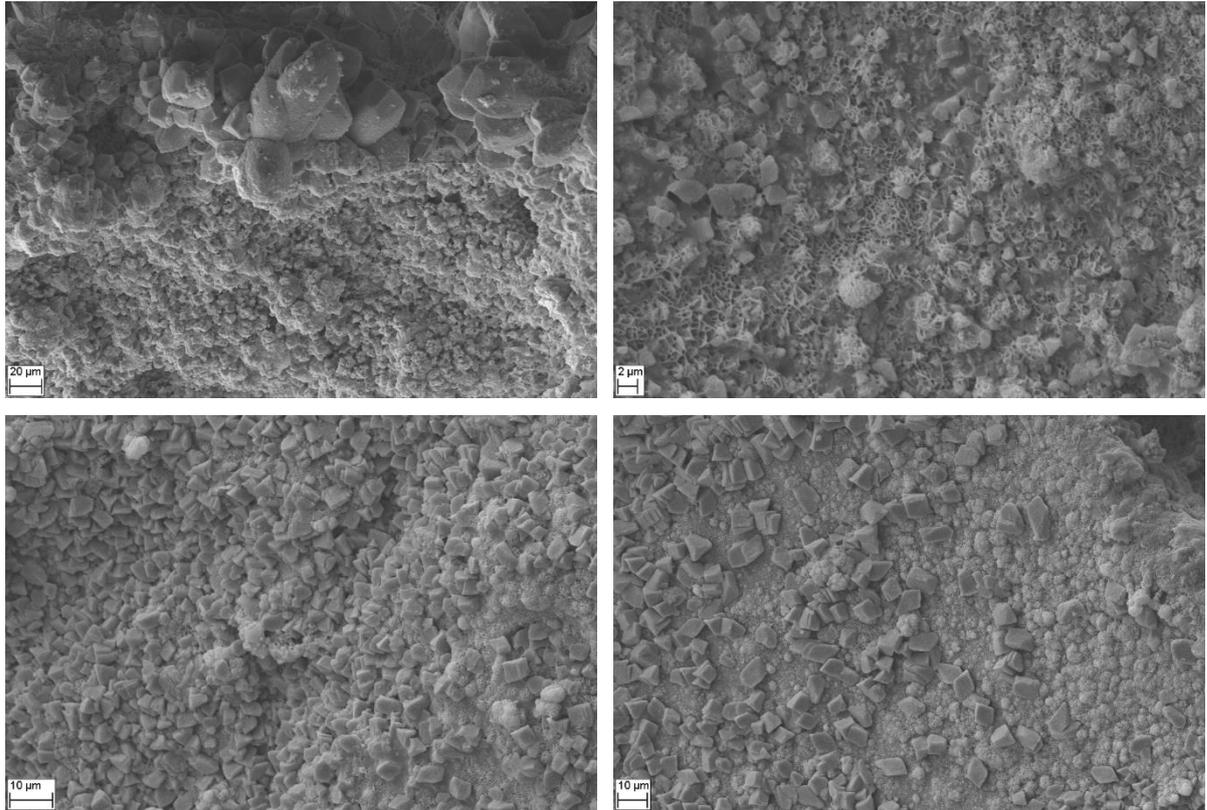
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura B.3 – Micrografias da amostra A-V 3



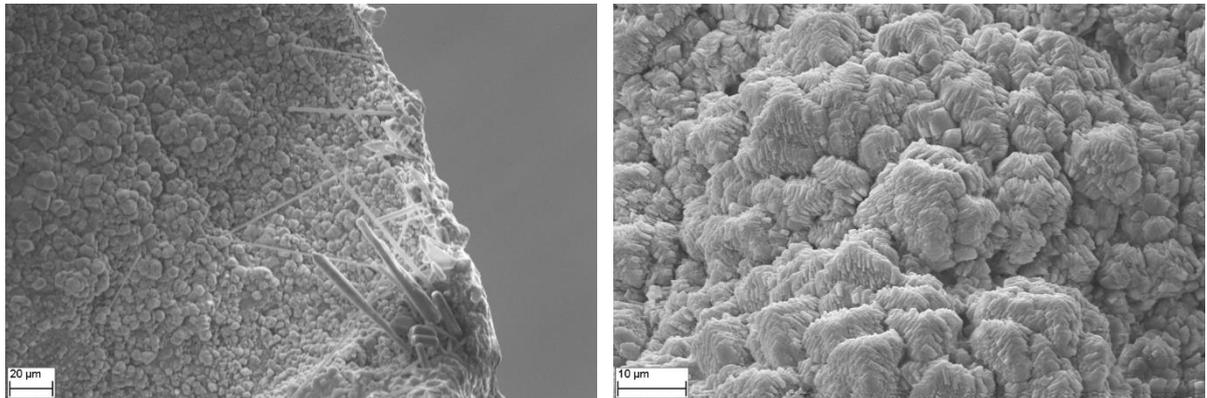
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura B.4 – Micrografias da amostra B-I 1



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura B.5 – Micrografias da amostra B-II 3



Fonte: Elaborado pelo autor.