

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Curso de Biotecnologia – Ênfase em Biotecnologia Molecular

João Vitor Bitencourt Borowski

AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO USO DE NITRATO DE CÁLCIO E AMIDO NA
PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO INDUZIDA MICROBIOLOGICAMENTE

Porto Alegre

2022

João Vitor Bitencourt Borowski

AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO USO DE NITRATO DE CÁLCIO E AMIDO NA
PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO INDUZIDA MICROBIOLOGICAMENTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
bacharel em Biotecnologia – Ênfase em
Biotecnologia Molecular do Instituto de
Biociências da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Henning
Vainstein

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Borowski, João Vitor Bitencourt

AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO USO DE NITRATO DE CÁLCIO
E AMIDO NA PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO
INDUZIDA MICROBIOLOGICAMENTE / João Vitor Bitencourt
Borowski. -- 2022.

59 f.

Orientadora: Marilene Henning Vainstein.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Curso de Biotecnologia: Biotecnologia
Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Bioconcreto. 2. Autocicatrização. 3. Bacillus
subtilis. 4. Amido. 5. Nitrato de cálcio. I. Henning
Vainstein, Marilene, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

João Vitor Bitencourt Borowski

AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO USO DE NITRATO DE CÁLCIO E AMIDO NA
PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO INDUZIDA MICROBIOLOGICAMENTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
bacharel em Biotecnologia – Ênfase em
Biotecnologia Molecular do Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Avaliado em: Porto Alegre, 27 de abril de 2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Marilene Henning Vainstein

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Biologia
Molecular e Biotecnologia

Prof. Dr. Charley Christian Staats

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Biologia
Molecular e Biotecnologia

MSc. Henrique Alves de Brito

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Biologia
Molecular e Biotecnologia

Porto Alegre

2022

Este trabalho faz parte de projeto aprovado pela FAPERGS, Produção de matriz cimentícia bioautocicatrizante, executado em parceria entre o Centro de Biotecnologia (CBiot) e o Núcleo Orientado para a Inovação da Edificação (NORIE) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo amparo institucional e principalmente por propiciar o contato com o excelente corpo docente que compõem o curso de Biotecnologia, do qual me orgulho de ter sido aluno;

À professora e orientadora Dr^a. Marilene Henning Vainstein, pelos ensinamentos e apoio ao longo dos anos, por sempre me instigar a ir além e acreditar no meu potencial;

Ao grupo de bioautocicatrização, por me proporcionar estar imerso na intersecção entre as áreas de biotecnologia, engenharia civil e química, por ser um grupo plural, e por todas as discussões e troca científica que tivemos ao longo dos anos;

Aos colegas do LABFIMB, por sua amizade e bons momentos compartilhados, por todo o apoio, companheirismo e ensinamentos passados a mim ao longo dos anos;

Aos meus pais, irmã, avó e dinda, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas, por todo o amor que me foi dado, e incentivo a ir atrás dos meus sonhos;

Aos amigos de graduação e dos projetos de extensão, pela amizade, pelos bons momentos que vivemos juntos e por todo o apoio;

Ao Alan Dos Santos Da Silva, por todas as conversas, orientações e auxílio, e por todas as análises realizadas para este trabalho;

Em especial: ao Angelo Angonezi, por todas as conversas no RU e voltas de ônibus, e amizade e apoio ao longo de toda a graduação; à Letícia Hipólito, por todo seu apoio, incentivo e amor que foram essenciais ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

RESUMO

As fissuras em matrizes cimentícias são meio de acesso de agentes deletérios causadores de degradação do concreto, por isso devem ser reparadas imediatamente, a fim de evitar danos estruturais e prolongar a vida útil estrutural de edificações. O concreto biológico de autocura é uma tecnologia alternativa recente de cicatrização de fissuras que envolve a reação bioquímica de precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (MICP). No processo de MICP, bactérias metabolizam uma fonte de carbonato (FCB), que ao entrar em contato com cálcio solúvel - proveniente de uma fonte de cálcio (FCA) - reagem formando carbonato de cálcio. Devido às suas características intrínsecas dos reagentes (FCA e FCB) atualmente empregados na bioautocicatrização estes ainda podem ser melhorados, portanto é desejável a procura por novos reagentes. Os mecanismos por trás da MICP em fissuras ainda não foram totalmente elucidados, porém já se sabe que altas concentrações de cálcio e carbonato em solução são condições que propiciam uma maior precipitação de carbonato de cálcio. Dessa forma, foram avaliadas a metodologia de exposição, a concentração de substrato e o comportamento de deposição de carbonato de cálcio nas fissuras, seguidas do teste de dois reagentes que se mostram promissores: nitrato de cálcio e amido. O nitrato de cálcio possui alta solubilidade em água, fornecendo altas concentrações de cálcio em solução. O amido é uma molécula de alto potencial energético, que após ser metabolizada gera altas quantidades de carbonato em solução. Para testar o potencial desses compostos, foi desenvolvida uma metodologia para avaliação do processo de MICP em cultivos líquidos sob agitação. O desempenho de *Bacillus subtilis* (SUB) e *Bacillus amyloliquefaciens* (AMY) para o processo foi testado e SUB foi escolhido por apresentar melhores resultados. Por fim, um planejamento de experimento fatorial de composto central foi realizado a fim de analisar o processo de MICP com SUB, amido e nitrato de cálcio. Os resultados indicam que amido e nitrato de cálcio desempenham uma boa MICP e podem ser empregados na confecção de bioconcretos.

Palavras-chave: Bioconcreto, autocicatrização, *Bacillus subtilis*, amido, nitrato de cálcio.

ABSTRACT

Cracks in cementitious matrices are the main way of access for deleterious agents that cause concrete degradation, so they must be repaired immediately, in order to avoid structural damage and prolong the structural integrity of buildings. Biological self-healing concrete is a recent crack healing technology alternative that involves the biochemical reaction of microbiologically induced calcium carbonate precipitation (MICP). In the MICP process, bacteria metabolize a source of carbonate (FCB), which when in contact with soluble calcium - from a source of calcium (FCA) - react to form calcium carbonate. Due to their intrinsic characteristics of the reagents (FCA and FCB) currently used in biological self-healing, they can still be improved, therefore, the search for new reagents is desirable. The mechanisms behind MICP in cracks have not yet been fully elucidated, however it is already known that high concentrations of calcium and carbonate in solution are conditions that provide greater precipitation of calcium carbonate. Thus, the exposure methodology, the substrate concentration and the behavior of calcium carbonate deposition in the cracks were evaluated, followed by the test of two promising reagents: calcium nitrate and starch. Calcium nitrate has high solubility in water, providing high concentrations of calcium in solution. Starch is a molecule of high energy potential, which after being metabolized generates high amounts of carbonate in solution. To test the potential of these molecules, a methodology was developed to evaluate the MICP process in liquid cultures under agitation. The performance of *Bacillus subtilis* (SUB) and *Bacillus amyloliquefaciens* (AMY) for the process was tested and SUB was chosen for its better results. Finally, a central compound factorial design was carried out in order to analyze the MICP process with SUB, starch and calcium nitrate. The results indicate that starch and calcium nitrate perform a good MICP and can be used in the manufacture of bioconcrete.

Keywords: Bioconcrete, self-healing, *Bacillus subtilis*, starch, calcium nitrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do processo de MICP encontrado na natureza e processo ocorrendo em fissuras.....	13
Figura 2: Solubilidade de carbonato de cálcio pelo pH.....	14
Figura 3: Amilose e amilopectina.....	16
Figura 4: Efeito do pH na atividade da amilase produzida por <i>Bacillus</i> spp.....	17
Figura 5: pH máximo de crescimento e osmotolerância de cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	18
Figura 6: Análise qualitativa do fechamento das fissuras expostas a diferentes condições.....	27
Figura 7: Análise qualitativa do fechamento das fissuras com diferentes concentrações de lactato de cálcio e uréia.....	28
Figura 8: Perfis da superfície de fissura das amostras do teste de concentração com ureia e lactato de cálcio.....	29
Figura 9: Microscopia dos cristais formados por <i>Sporosarcina pasteurii</i> na condição de ureia 2% e nitrato de cálcio.....	30
Figura 10: Placas de meio sólido LB amido após 48 horas de cultivo.....	31
Figura 11: Tubos eppendorf contendo soluções testadas para presença de nitrito.....	31
Figura 12: Base dos frascos erlenmeyer avaliados após 24 horas de cultivo.....	32
Figura 13: Base dos frascos erlenmeyer avaliados após 48 horas de cultivo.....	33
Figura 14: Base dos frascos erlenmeyer avaliados após 48 horas de cultivo.....	34
Figura 15: Curvas de perda de massa geradas por ensaio de termogravimetria.....	35
Figura 16: Esquema da posição dos pontos avaliados no CCDE.....	37
Figura 17: Correlação entre valores observados e estimados do CCDE.....	39
Figura 18: Resultados do CCDE no ponto central após 96 horas de cultivo.....	39
Figura 19: Superfície de resposta para precipitação de carbonato das interações entre nitrato de cálcio e concentração de bactérias, com valor de amido fixado para o ponto de máximo rendimento obtido a partir da equação.....	41
Figura 20: Superfície de resposta para precipitação de carbonato de cálcio das interações entre nitrato de cálcio e amido, com valor de bactérias fixado para o ponto de máximo rendimento obtido a partir da equação.....	42

Figura 21: Superfície de resposta para precipitação de carbonato de cálcio das interações entre concentração de bactérias e amido, com valor de nitrato de cálcio fixado para o ponto de máximo rendimento obtido a partir da equação.....42

Figura 22: Teste de pareto para avaliar o efeito de cada variável e interação no processo.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento por tipo de FCB.....	17
Tabela 2: Condições experimentais EPC em meio contendo amido.....	24
Tabela 3: Desenho experimental e resultados obtidos do FPC.....	36
Tabela 4: Análise estatística dos resultados obtidos com FPC.....	36
Tabela 5: Variáveis e intervalos escolhidos para o CCDE.....	37
Tabela 6: Planejamento completo decodificado do CCDE, resultados observados e estimados.....	38
Tabela 7: Análise de variância do modelo quadrático gerado a partir dos resultados obtidos no CCDE.....	40
Tabela 8: Análise estatística dos resultados obtidos com o CCDE e coeficientes calculados.....	40
Tabela 9: Coeficientes da equação (calculados).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMY: *Bacillus amyloliquefaciens*

BCM: Bactéria ciclos múltiplos

BCU: Bactéria ciclo único

BS: Bactéria submerso

CB: Carbonato de cálcio (CaCO_3)

CCDE: Planejamento Composto Central - Modelo Quadrático Esférico com 3 Variáveis

EPC: Experimento de precipitação de carbonato de cálcio

FCA: Fonte de cálcio

FCB: Fonte de carbonato

FPC: Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} resolução VI com ponto central

LB: Meio de cultivo Luria Bertani (LB broth)

MICP: Precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (Microbiologically induced calcium carbonate precipitation)

SUB: *Bacillus subtilis*

TGA: Termogravimetria

UA: Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 O concreto e as fissuras.....	12
1.2 Recuperação de fissuras.....	12
1.3 O Bioconcreto e a bioautocicatrização.....	13
1.3.1 O processo de MICP.....	14
1.3.2 Problemática.....	14
1.3.3 Otimização do processo.....	15
1.3.3.1 Amido como potencial FCB.....	15
1.3.3.2 Nitrato de cálcio como potencial FCA.....	17
1.3.3.3 Bactérias escolhidas.....	18
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Linhagens bacterianas.....	20
3.2 Meios de cultivo.....	20
3.3 Pré-inóculos.....	20
3.4 Ensaio de autocicatrização autônoma com agentes biológicos.....	21
3.4.1 Teste comparativo de metodologias de exposição de fissuras aos agentes cicatrizantes.....	21
3.4.2 Teste do efeito da concentração de nutriente no fechamento da fissura.....	22
3.5 Teste de degradação de amido.....	22
3.6 Teste de degradação de nitrato.....	23
3.7 Testes de precipitação de Carbonato de Cálcio (EPC).....	23
3.7.1 Teste de precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo ureia.....	24
3.7.2 Testes de precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo amido e nitrato de cálcio.....	24
3.8 Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} resolução VI com ponto central (FPC).....	25
3.9 Experimento composto central (CCDE).....	25

3.10 Termogravimetria.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Testes de metodologia de exposição.....	26
4.2 Teste de concentração com ureia e lactato de cálcio.....	27
4.3 Perfilometria.....	28
4.4 Teste precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo ureia e nitrato de cálcio.....	29
4.5 Teste degradação de amido.....	30
4.6 Teste degradação de nitrato.....	31
4.7 Testes precipitação de carbonato em meio contendo amido e nitrato de cálcio.....	32
4.8 Termogravimetria.....	34
4.9 Experimento fatorial fracionário ponto central.....	35
4.10 Experimento composto central quadrático esférico (CCDE).....	37
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	52
6. PERSPECTIVAS.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 O concreto e as fissuras

O concreto é um material de construção amplamente utilizado, pois possui alta resistência à compressão e boa durabilidade. No entanto, uma grande preocupação com o concreto é sua vulnerabilidade à formação de fissuras, sob a influência de flutuações de temperatura e carga externa, devido à sua baixa resistência à tração e à baixa capacidade de deformação. As fissuras são aberturas nas matrizes cimentícias, visíveis ou não a olho nu, e podem ser um meio de acesso de agentes deletérios causadores, por exemplo, da despassivação das armaduras e degradação do concreto. Por isso devem ser reparadas imediatamente, a fim de evitar danos estruturais e prolongar a vida útil estrutural de edificações (SCHLANGEN; JONKERS, 2008). As fissuras podem ter origem tanto no estado fresco como no endurecido das matrizes cimentícias. Quando fresco, o calor de hidratação e as condições de cura do concreto podem ser as causas das fissuras; quando endurecido, as movimentações produzidas pelas solicitações externas (ambientais ou humanas) caracterizam as principais causadoras do processo de fissuração (MONTEIRO; MEHTA, 2006).

1.2 Recuperação de fissuras

A correção dessas fissuras normalmente é um processo de manutenção com elevado valor financeiro agregado, seja pelos materiais utilizados, seja pela disponibilidade e capacidade da mão de obra executiva. Dessa forma, nos últimos anos uma alternativa à mitigação de fissuras vem sendo amplamente abordada na literatura, o fenômeno de autocicatrização (DE BELIE et al., 2018; ZIEGLER et al., 2020). A autocicatrização pode ocorrer de duas formas distintas: autógena, sendo aquela na qual a própria matriz cimentícia tem a capacidade de fechar fissuras; e autônoma que consiste na inserção de um agente à mistura, ainda no estado fresco, com a finalidade de desencadear um processo autocicatrizante na estrutura (DE ROOIJ et al., 2013). Há ainda um terceiro procedimento denominado como reparação, o qual consiste no

reparo da fissura externamente, ou seja, após constatada a fissura na matriz endurecida, um material é adicionado à mesma para produzir o seu fechamento.

1.3 O Bioconcreto e a bioautocicatrização

1.3.1 O processo de MICP

No processo de MICP, bactérias metabolizam uma fonte de carbonato (FCB), que ao entrar em contato com cálcio solúvel - proveniente de uma fonte de cálcio (FCA) - reagem formando carbonato de cálcio.

O concreto biológico de autocura é uma tecnologia alternativa recente de cicatrização de fissuras que envolve a reação bioquímica de precipitação de carbonato de cálcio induzida microbiologicamente (Microbially Induced Calcium Carbonate - MICP). MICP ocorre naturalmente na natureza com bactérias em água, e é reprodutível em fissuras cimentícias (CASTRO-ALONSO et al., 2019). No processo de MICP, bactérias metabolizam uma fonte de carbonato (FCB) - que fornece energia para seu crescimento - gerando dióxido de carbono como subproduto; este é convertido em ácido carbônico pela enzima anidrase carbônica e secretado; ao entrar em contato com cálcio solúvel - proveniente de uma fonte de cálcio (FCA) - os dois substratos reagem formando carbonato de cálcio, que por apresentar baixo valor de Kps, precipita na forma de cristal (Figura 1). Abaixo há a reação de formação de carbonato de cálcio:

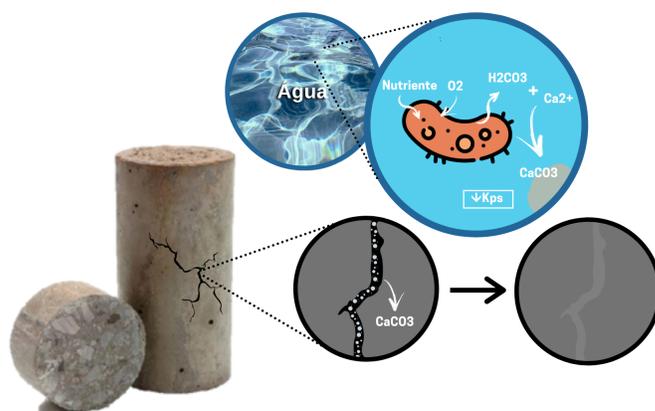
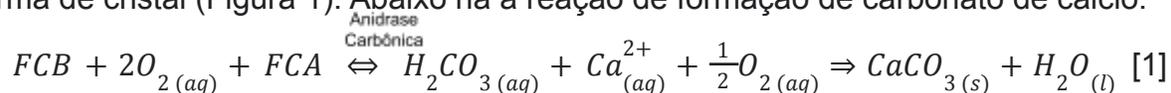


Figura 1: Esquema ilustrativo do processo de MICP encontrado na natureza e processo ocorrendo em fissuras.

Por ser alcalino, o pH da matriz cimentícia também contribui para a MICP, uma vez que a solubilidade de carbonato de cálcio diminui com o aumento do pH (Figura 2).

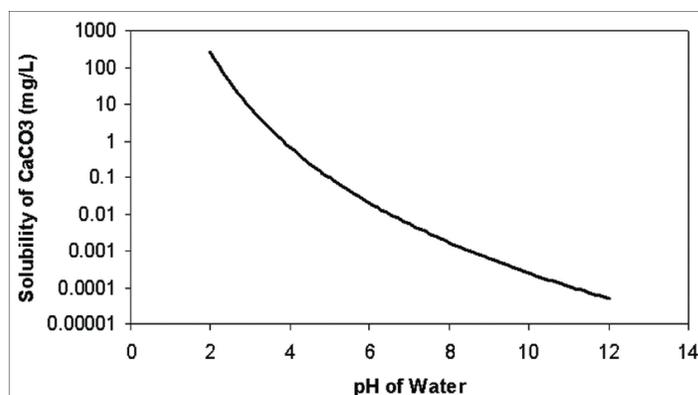


Figura 2: Solubilidade de carbonato de cálcio pelo pH. Adaptado de HART; COLSON; BURRIS, 2011.

1.3.2 Problemática

Os reagentes atualmente empregados se distanciam do ideal devido às suas características intrínsecas e seu alto custo (LEE; PARK, 2018). Inicialmente, eram incorporados meios de cultura como FCB, porém estes são constituídos por sais, proteínas e açúcares, que comprometem o processo de cura da matriz cimentícia pela diminuição da atividade de água (SCHLANGEN; JONKERS, 2008). Posteriormente, com o emprego de microrganismos ureolíticos utilizou-se ureia como FCB, porém a formação de amônia (subproduto da degradação de ureia) é nociva para a matriz cimentícia; devido a isso, a aplicação de espécies desnitrificantes que a convertem em moléculas menos nocivas vêm sendo usadas como alternativa (MA et al., 2020). O lactato de cálcio também vem sendo empregado, e apesar de possuir custo elevado contém na mesma molécula a FCA e FCB, além da rota de metabolização de lactato estar presente em diversos organismos (CHEN et al., 2019; JONKERS et al., 2010). Pensando em contornar todas as desvantagens presentes nos reagentes já empregadas até hoje, deve-se buscar compostos: (a) não reativos com a matriz cimentícia; (b) de rotas de metabolização presentes em diversos microrganismos; (c) de baixo custo.

1.3.3 Otimização do processo

Diferentes concentrações de FCB e de FCA influenciam no crescimento bacteriano e no rendimento do processo (OKWADHA; LI, 2010), havendo um ponto ideal para a combinação de bactéria, FCA e FCB. Porém, apesar desse ponto ideal ser o melhor para essa combinação, pode não ser o melhor para o processo, pois a mudança de uma ou mais variáveis (linhagem bacteriana, ou molécula fonte de cálcio ou de carbonato) altera completamente as características que regem o processo. Para encontrar bons compostos candidatos para MICP, deve-se pensar nas condições que mais propiciam a precipitação de carbonato de cálcio. Quanto maior a concentração de cálcio em solução, melhor (XU et al., 2015). Para atingir tais concentrações, um sal com alta solubilidade em água deve ser priorizado. Para a FCB, uma molécula ideal influencia o mínimo na osmolaridade, possui vias de degradação conservadas para diversos organismos e gera maiores quantidades de carbonato por massa de molécula. Outrossim, é vantajoso utilizar FCB que também sejam FCA, fazendo com que a produção de carbonato seja decorrente de mais de uma via metabólica. Já para as bactérias, uma linhagem osmotolerante, excelente metabolizadora dos compostos escolhidos, alcalifílica ou tolerante a pH alcalino é mais vantajosa.

1.3.3.1 Amido como potencial FCB

O amido é um polímero orgânico, produzido principalmente por plantas para fins de armazenamento de energia dentro das células. Por ser uma molécula de estocagem, apresenta características otimizadas quanto a volume ocupado ou compactação, tem baixa reatividade com outros compostos, baixa quantidade de moléculas de água para a solvatação e alta viscosidade (TESTER; KARKALAS; QI, 2004). Também apresenta baixa influência na osmolaridade, com valor 4 vezes menor que a molécula de glicose. Diversos organismos produzem amilase, e a metabolização do amido gera maiores quantidades de carbonato quando comparado a lactato e ureia (Tabela 1). Um contraponto a esse alto rendimento é a sua composição: cerca de um quarto é amilose e todo o restante amilopectina. Sua principal diferença é que a

amilopectina apresenta ligações α -1,4 e α -1,6-glicosídicas, enquanto a amilose só possui ligações α -1,4 (Figura 3). A amilase é capaz de hidrolisar somente ligações α -1,4-glicosídicas, não degradando o amido por completo. A isomaltase (α -1,6-glicosidase) é capaz de degradar a amilopectina, pois cliva a ligação alfa-1,6. As linhagens de *Bacillus subtilis* (SUB) e *Bacillus amyloliquefaciens* (AMY) usadas nesse estudo apresentam ambas as enzimas para a degradação do amido (“alpha-glucosidase [*Bacillus subtilis* ATCC 6633]”) (“alpha-glucosidase [*Bacillus amyloliquefaciens*]”). A atividade de amilase é influenciada pelo pH, apresentando atividade máxima próximo a faixa de pH 7 a 8 (Figura 4).

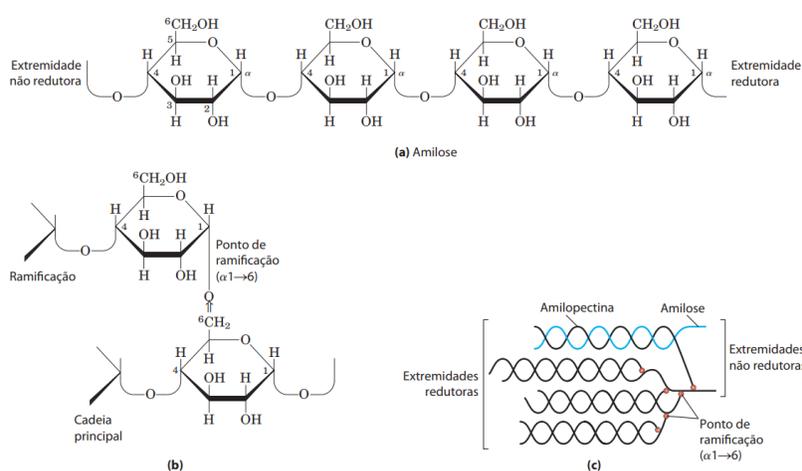


Figura 3: Amilose e amilopectina. (a) Segmento curto de amilose, polímero linear de resíduos de D-glicose em ligações (α -1,4). Uma única cadeia pode conter alguns milhares de resíduos de glicose. A amilopectina tem trechos de resíduos ligados de maneira similar, situados entre pontos de ramificação. O glicogênio tem a mesma estrutura básica, porém é mais ramificado do que a amilopectina. (b) Ponto de ramificação (α -1,6) no glicogênio ou na amilopectina. (c) Agrupamento de amilose e amilopectina como o que supostamente ocorre nos grânulos de amido. Fitas de amilopectina (em preto) formam estruturas em hélice dupla umas com as outras ou com fitas de amilose (em azul). A amilopectina tem pontos de ramificação (α -1,6) frequentes (em vermelho). Os resíduos de glicose nas extremidades não redutoras das ramificações mais externas são removidos enzimaticamente durante a mobilização do amido para produção de energia. O glicogênio tem estrutura similar; porém, é mais ramificado e mais compacto. Adaptado de LEHNINGER; NELSON; COX, 2014.

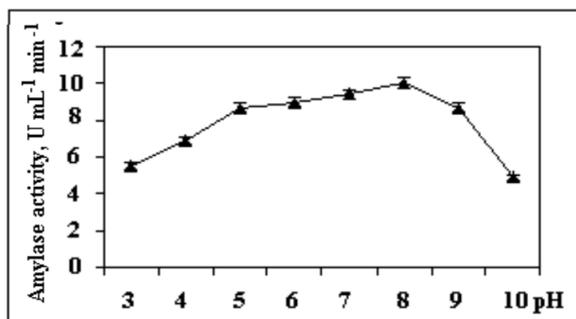


Figura 4: Efeito do pH na atividade da amilase produzida por *Bacillus* spp. Adaptado de SHAMALA; VIJAYENDRA; JOSHI, 2012.

Tabela 1: Rendimento por tipo de FCB. Fórmulas moleculares seguidas pelo peso molecular, rendimento de dióxido de carbono pela metabolização do composto, e número de mol de carbonato gerados a partir de 300g da FCB.

Lactato de cálcio	Ureia	Amido
$C_6H_{20}CaO_{11}$	CH_4N_2O	$(C_6H_{10}O_5)_n$
308 g/mol	60 g/mol	162 g/mol*
3 CO ₂ /mol	1 CO ₂ /mol	6 CO ₂ /mol*
Para 300g desta molécula, o número máximo de mols obtidos são:		
3 CO ₃ ²⁻	5 CO ₃ ²⁻	12 CO ₃ ²⁻

*Valores calculados para um monômero.

1.3.3.2 Nitrato de cálcio como potencial FCA

O nitrato de cálcio é um composto inorgânico de fórmula $Ca(NO_3)_2$ que possui alta solubilidade em água - de 1290 g/L a 20°C. Sua molécula apresenta, assim como o lactato de cálcio, FCA e FCB. A capacidade de redução de nitrato a nitrito ou gás nitrogênio está presente em diversas bactérias, principalmente bactérias de solo pertencentes ao ciclo do nitrogênio. *B. subtilis* ATCC 6633 é um isolado de solo, e tanto ele como *B. amyloliquefaciens* são descritos como redutores de nitrato. O nitrato já vem

sendo empregado combinado com ureia para MICP e se mostra promissor (ZHU et al., 2019).

1.3.3.3 Bactérias escolhidas

SUB foi escolhido por já ser amplamente utilizado em bioautocicatrização (FENG et al., 2021; JENA et al., 2020; LUHAR; LUHAR; SHAIKH, 2022; NAIN et al., 2019) pois é osmotolerante e apresenta bom crescimento em pH alcalino (Figura 5). AMY é filogeneticamente muito próximo a SUB, e são metabolizadores de amido e nitrato.

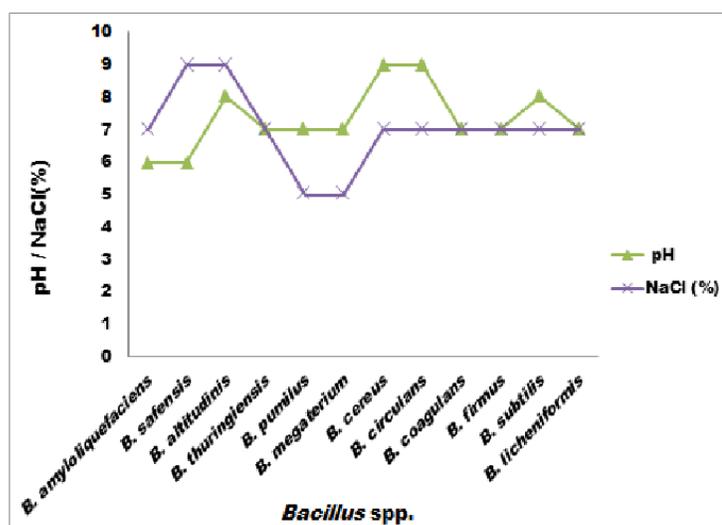


Figura 5: pH máximo de crescimento e osmotolerância de cepas de *Bacillus* spp.
Adaptado de GLOVER; MADILO; TERLABIE, 2018.

Levando essas características em conta, foram escolhidos amido como fonte de carbono, nitrato de cálcio como fonte de carbono e de cálcio, e as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* para o desenvolvimento deste projeto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar os parâmetros que regem o MICP, e avaliar o potencial do uso de amido e nitrato de cálcio nesse processo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se cálcio da matriz é suficiente para MICP;
- Avaliar o processo de fechamento das fissuras a partir do relevo da amostra ;
- Comprovar que *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* são amilolíticos;
- Comprovar que *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* reduzem nitrato;
- Testar se é possível precipitar carbonato a partir de amido e nitrato de cálcio;
- Encontrar variáveis relevantes para MICP com amido e nitrato de cálcio;
- Encontrar valores de concentração ideais para MICP com amido e nitrato de cálcio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas

A linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* MO13 foi isolada e caracterizada pelo grupo (MORO et al., 2018). *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Sporosarcina pasteurii* (ATCC 11859) foram adquiridos da ATCC.

3.2 Meios de cultivo

Foi utilizado Meio Luria Bertani (LB) contendo triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%. O meio *Tryptic Soy Broth* com ureia 0,5% (TSB+ureia) composto por peptona de caseína 1,7%, hidrogenofosfato dipotássico 0,25%, glicose 0,25%, cloreto de sódio 0,5%, peptona de soja 0,3%. LB amido ágar composto por triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, Cloreto de Sódio 0,5%, amido 1%, ágar 0,8%. Meio de nitrato contendo peptona 0,5%, extrato de carne 0,5%, KNO₃ 0,1%.

3.3 Pré-inóculos

Para a produção dos inóculos das bactérias foram preparados pré-inóculos em meio LB para SUB e AMY, e em meio TSB ureia para *S. pasteurii*. Os meios foram incubados a 200 rpm, durante 24 horas a 25°C. A partir dos pré-inóculos, concentrados de células foram obtidos por centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 20°C, lavados e novamente centrifugados duas vezes com solução salina 0,85%. Todos os inóculos foram preparados a partir de solução concentrada de células, adicionada a uma OD₆₀₀ final de 0,2, estimada e ajustada de acordo com valores de absorbância obtidos por leituras em espectrofotômetro.

3.4 Ensaios de autocicatrização autônoma com agentes biológicos

Estes experimentos foram realizados e analisados previamente por mim e pelo grupo de bioautocicatrização (dados ainda não publicados) e seus dados foram utilizados para delimitar algumas metodologias adotadas neste estudo. De comum acordo com o grupo, trago aqui os dados necessários para compreender a sequência experimental adotada e os resultados obtidos nos experimentos aqui apresentados e discutidos.

3.4.1 Teste comparativo de metodologias de exposição de fissuras aos agentes cicatrizantes

Para este experimento foram produzidos cilindros de argamassa (CAPPELLESSO et al., 2019), fissurados radialmente de ponta a ponta, tendo as fissuras uma largura média de 1 mm. Foram testadas três condições distintas: ciclos únicos de molhagem e secagem, ciclos múltiplos e submersão contínua - cada condição com triplicatas de amostras com bactérias e controle (sem bactérias). Para as amostras contendo bactérias, foi feito inóculo de SUB em meio de cultivo LB, incubado a 130 rpm, por 24 horas a 30°C. O concentrado de células foi obtido por centrifugação a 7000 rpm por 7 minutos a 20°C, lavado e centrifugado duas vezes com solução salina NaCl 0,85%. As células foram inoculadas em solução salina 0,85% contendo 0,5% de lactato de cálcio (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001; OKWADHA; LI, 2010). Foram consideradas controle as amostras expostas somente à água destilada, ausente de microrganismos e nutrientes, divididas em permanentemente submersas durante todo o ciclo de análise (CS), e sujeitas a ciclos de molhagem e secagem (CC), ambas com renovação de água a cada ciclo (ciclos com duração de sete dias). O agente biológico em solução aquosa nutritiva caracterizou as amostras fissuradas com bactérias (FB), sendo separadas em três grupos: amostras permanentemente submersas neste meio durante todo o período de análise (BS); BCU, sujeitas a ciclos de molhagem e secagem em água destilada, nas quais houve uma aspersão da solução citada no tempo inicial; e, por fim, BCM caracterizando as amostras sujeitas a

ciclos de molhagem e secagem com água destilada, nas quais é aspergida a solução após cada ciclo. Foram efetuados três ciclos, totalizando 21 dias. A análise do processo de cicatrização foi feita com metodologia desenvolvida pelo grupo (GARAY et al., 2021).

3.4.2 Teste do efeito da concentração de nutriente no fechamento da fissura

Para este experimento foram produzidos cilindros de argamassa fissurados. Foram testadas seis condições distintas: SUB com lactato de cálcio nas concentrações 0,5%, 1% e 1,5%, *S. pasteurii* com ureia nas concentrações de 1%, 2% e 4%. SUB foi inoculado nas soluções de lactato de cálcio; e *S. pasteurii* nas soluções de ureia. No experimento foram utilizadas 19 amostras: uma amostra em água destilada isenta de microrganismos (controle água), uma amostra contendo solução salina 0,85% e lactato para cada concentração de lactato de cálcio (controle lactato), uma amostra contendo solução salina 0,85% e ureia para cada concentração de ureia (controle ureia), duas amostras contendo solução salina 0,85%, SUB e lactato para cada concentração de lactato de cálcio, duas amostras contendo solução salina 0,85%, *S. pasteurii* e ureia para cada concentração de ureia. As amostras foram expostas a ciclos de uma semana, onde durante as primeiras 24 horas do ciclo as amostras foram submersas nas soluções de estudo (descritas acima). Em seguida, foram submersas em água destilada por quatro dias consecutivos, sendo seguido de dois dias expostas ao ar (sem submersão em soluções) para secagem (nesta etapa eram feitas as imagens de microscopia). Foi efetuado um total de quatro ciclos, totalizando 28 dias. A análise do processo de cicatrização foi realizada por microscopia óptica, utilizando metodologia de quantificação desenvolvida pelo grupo (GARAY et al., 2021). O perfil da superfície ao final do experimento foi obtido por perfilometria.

3.5 Teste de degradação de amido

A degradação de amido foi analisada pela presença de halos de degradação em placas seguindo o modelo utilizado por (Urbanek et al. 2017). O experimento foi realizado em meio LB amido ágar. Poços foram feitos no centro das placas, onde 100 μ L de pré-inóculo foram aplicados, sendo usada solução NaCl 0,85% estéril como controle. Após 48 horas de incubação, foi adicionada solução de lugol (Iodo 5% e iodeto de potássio 10%) às placas, que em seguida foram escaneadas e avaliadas qualitativamente para a presença de halos de degradação.

3.6 Teste redução de nitrato

As linhagens de *Bacillus* spp foram inoculadas em meio nitrato e incubadas por 72 horas. Após incubação, os inóculos foram testados para a presença de nitrito com a adição de 4 gotas de solução de ácido sulfanílico (0,8% de ácido acético glacial) e 4 gotas de solução de dimetil-alfa-naftilamina (0,6% de ácido acético glacial). Em seguida foram digitalizadas e avaliadas qualitativamente para a presença de coloração avermelhada, indicando redução de nitrato a nitrito.

3.7 Testes de precipitação de Carbonato de Cálcio (EPC)

Essa metodologia foi utilizada para avaliar MICP a partir de ureia como FCB e amido como FCB, ambas com o emprego de nitrato de cálcio como FCA. As soluções foram incubadas em plataforma rotatória durante 24 horas a 200 rpm e 30°C. Para separar as células do sal precipitado, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 20°C em tubos do tipo Falcon de 50ml, lavadas e centrifugadas duas vezes com água destilada. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco em estufa a 37°C. Para análise da composição do material precipitado, após secagem em estufa, o sedimento foi macerado com auxílio de cadinho e pistilo até formar um pó fino e homogêneo. O pó resultante foi analisado por termogravimetria (TGA) para confirmar a composição dos cristais precipitados. Para quantificar o rendimento de cada amostra

foram testadas duas metodologias: queima de matéria orgânica em mufla a 500°C, e pesagem de peso seco antes e após tratamento com solução ácida. Nenhuma das duas metodologias apresentou resultados satisfatórios. Alternativas são apresentadas em perspectivas. A quantificação foi realizada de maneira visual arbitrária, atribuindo valores entre 0 e 10 à quantidade de precipitado presente em cada amostra.

3.7.1 Teste precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo ureia

Para o teste de precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo ureia células de *S. pasteurii* foram adicionadas às soluções: cloreto de sódio 0,85% e ureia 2%; e cloreto de sódio 0,85%, ureia 2% e nitrato de cálcio 2,2%. Após 48 horas foi avaliada a presença de precipitado.

3.7.2 Testes precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo amido e nitrato de cálcio

Para teste de precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo amido, células de SUB e AMY foram cultivadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Condições experimentais EPC em meio contendo amido.

Experimento 1		
Amostra	Composição	Osmolaridade (mOsm/L)
1	Amido 0,5% + NaCl 0,9%	315
2	LB + Ca(NO ₃) ₂ 5%	914
3	Amido 0,5% + Ca(NO ₃) ₂ 5% + NaCl 0.1%	933
4	Amido 0,5% + Ca(NO ₃) ₂ 5% + NaCl 0.9%	1229
5	Lactato 0,5% + NaCl 0,9%	377
Experimento 2		
Amostra	Composição	pH observado
1	Amido 0,5% + NaCl 0,9% + Ca(NO ₃) ₂ 5%	7,3
2	Amido 0,5% + NaCl 0,9% + CaCl ₂ 3%	7,4
3	Lactato 0,5% + NaCl 0,9%	8,4
Experimento 3		
Amostra	Composição	pH fixado
1	Amido 2% + NaCl 0,9% + Ca(NO ₃) ₂ 5%	7,4
2	Amido 2% + NaCl 0,9% + Ca(NO ₃) ₂ 5%	8,4
3	Amido 1% + NaCl 0,9% + Ca(NO ₃) ₂ 5%	
4	Amido 2% + NaCl 0,9% + CaCl ₂ 3%	
5	Lactato de cálcio 0,5% + NaCl 0,9%	

3.8 Planejamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ resolução VI com ponto central (FPC)

O Planejamento Fatorial Fracionário 2⁴⁻¹ com ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006) foi utilizado para esse experimento. Foram consideradas as variáveis pH, e concentrações de amido, nitrato de cálcio, e bactérias. As faixas de teste foram realizadas de acordo com a Tabela 1. A quantificação foi realizada após 48 horas de incubação, de maneira visual arbitrária, atribuindo valores entre 0 e 10 à quantidade de precipitado presente em cada amostra.

3.9 Experimento composto central (CCDE)

O Planejamento Fatorial de Composto Central - Modelo Quadrático Esférico com 3 Variáveis (TEÓFILO; FERREIRA, 2006) e os resultados obtidos no FPC foram utilizados para esse experimento. Foram consideradas as concentrações de amido,

nitrate de cálcio e bactérias, com uso de 100 mM de Tris ajustado para pH 8,5. As faixas de teste foram de acordo com a Tabela 3, todos os pontos foram feitos em triplicatas, exceto o ponto central que foi feito em quintuplicata. A quantificação foi realizada após 96 horas de incubação, de maneira visual arbitrária, atribuindo valores entre 0 e 10 à quantidade de precipitado presente em cada amostra.

3.10 Termogravimetria

Realizada no instrumento TGA Q50 V6.7 Build 203, com módulo TGA, plataforma de platina, gas1: nitrogênio, gas2: ar, gás de balanço: nitrogênio 40.0 ml/min, gás de amostra: nitrogênio 60.0 ml/min, rampa de aquecimento 40.00 °C/min to 1000.00 °C.

4. RESULTADOS

4.1 Testes de metodologia de exposição

A forma e o tempo de exposição de fissuras aos agentes cicatrizantes e à água influencia diretamente no processo de cicatrização (DE ROOIJ et al., 2013). Em trabalhos prévios, nosso grupo avaliou diferentes formas de exposição de fissuras, a fim de delimitar os parâmetros ideais para os testes seguintes. Além disso, com maior contato com a água, cimento não hidratado presente na matriz cimentícia hidrata-se e contribui para o fechamento de fissuras e aumento da resistência nas idades iniciais da estrutura (WANG et al., 2019), o que é chamado de cicatrização autógena - sem auxílio de nenhum agente externo (ZIEGLER et al., 2020). Esse fenômeno pode confundir-se na avaliação do processo de cicatrização autônoma (emprego de agentes cicatrizantes externos), pois os processos autônomo e autógeno podem ocorrer simultaneamente. Para discriminar os dois processos foram utilizadas amostras controle para cada condição de exposição - com adição de agentes cicatrizantes, exceto bactérias. Observou-se que o fechamento das fissuras é mais acentuado naquelas amostras que foram expostas à ação de microrganismos (BS, BCU e BCM), no entanto, também ocorreu o processo de cicatrização das fissuras nos tratamentos CS e CC de forma autógena (Figura 6). A condição em que se obteve os melhores resultados foi BS, onde houve o fechamento da fissura por completo. As comparações apresentadas para cada um dos tratamentos na Figura 6 referem-se às amostras imediatamente fissuradas (inicial) e após vinte e um dias (final).

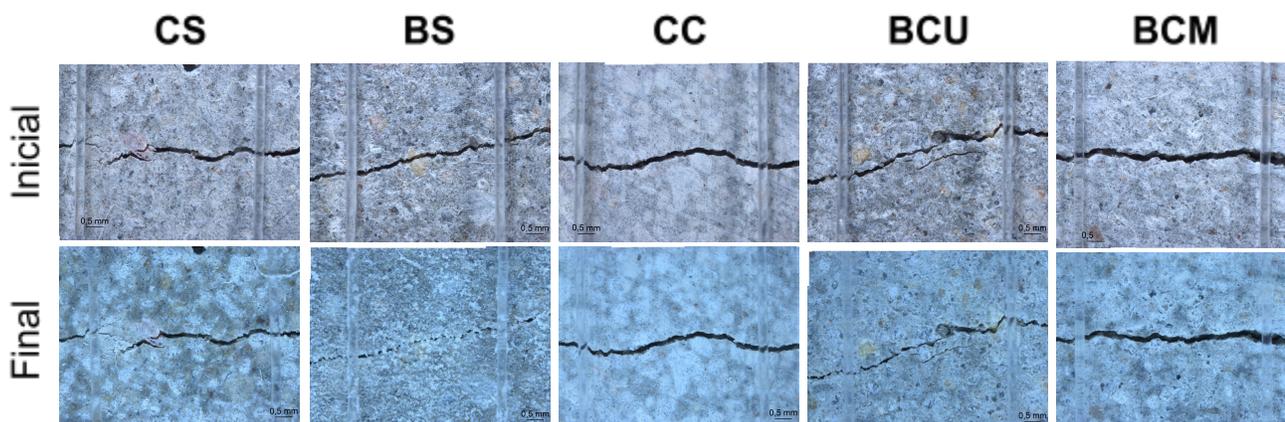


Figura 6: Análise qualitativa do fechamento das fissuras expostas a diferentes condições. CS: controle submerso; BS: bactérias submerso; CC: controle ciclos; BCU: bactéria ciclo único; BCM: bactéria ciclos múltiplos. A análise aprofundada dos dados não foi disponibilizada pelo grupo.

4.2 Teste de concentração com ureia e lactato de cálcio

O grupo de pesquisa também realizou testes de concentração com ureia e lactato de cálcio, continuando o processo de delimitação dos parâmetros ideais para os testes seguintes. Diferentes tipos de componentes são utilizados como agentes cicatrizantes, dentre estes os mais utilizados são lactato de cálcio e ureia (DE BELIE; WANG, 2016; JOSHI et al., 2017; MA et al., 2020; SON et al., 2018; ZHU et al., 2019). A concentração dos agentes é um fator principal para o processo, uma vez que estes serão metabolizados pelas bactérias e o rendimento é totalmente dependente da disponibilidade de substrato e boas condições de crescimento bacteriano, como a osmolaridade da solução. Além disso, os componentes podem ser separados em FCA e FCB. Lactato de cálcio apresenta a FCA e FCB na mesma molécula, já a uréia é somente FCB. Para avaliar se há contribuição, as amostras contendo ureia e *Sporosarcina pasteurii* não foram suplementadas com cálcio, contendo apenas o cálcio proveniente da matriz.

Para avaliar as faixas ideais para o processo, três concentrações de lactato de cálcio e uréia foram testadas, com valores abrangendo o que já é descrito na literatura. Após o ensaio todas as amostras contendo SUB apresentaram valores de cicatrização

superiores ao controle (nutrientes sem bactérias) e controle água (somente água destilada) (Figura 7). Os melhores resultados de SUB foram obtidos na concentração de lactato de cálcio igual a 0,5% (Figuras 7). As amostras de *Sporosarcina pasteurii* não apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que os valores obtidos na presença de bactérias não apresentam fechamento da fissura (resultados obtidos demonstram que as bactérias estariam aumentando a fissura) e não foi constatada a deposição de precipitados tanto nas fissuras como na superfície dos CPs (Figura 7). As imagens de microscopia apresentadas referem-se somente à porção denominada número 4 (parte central do corpo de prova) em cada uma das fissuras analisadas. A análise foi realizada neste ponto pois é aquele no qual a espessura é média entre toda sua extensão (o ensaio para abertura da fissura confere espessura maior em uma das extremidades e menor em outra).

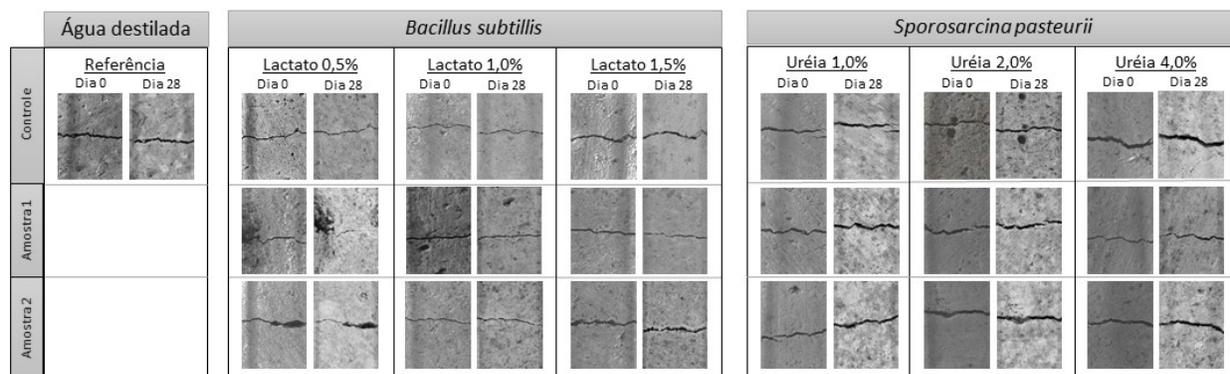


Figura 7: Análise qualitativa do fechamento das fissuras com diferentes concentrações de lactato de cálcio e uréia. Figura cedida pelo grupo de bioautocicatrização. A análise aprofundada dos dados não foi disponibilizada pelo grupo.

4.3 Perfilometria

As fissuras e o processo de bioautocicatrização são comumente avaliados em escala macro (microscopia, quantificações de área fissurada, por exemplo) e a nível molecular (difração de raio x, termogravimetria, entre outros). Entretanto, dados sobre o formato e relevo da fissura cicatrizada e seu processo de formação são raros, e podem

trazer novas perspectivas sobre esse fenômeno. Realizou-se o ensaio de perfilometria, que permite analisar a nível micrométrico os relevos de uma superfície, com as amostras que apresentaram os melhores valores de bioautocicatrização no teste de concentração de lactato de cálcio e de ureia. Com as imagens de perfilometria é possível observar a presença de um mesmo perfil de comportamento em todas as amostras de lactato 0,5%, que se caracteriza pela presença de picos no local onde antes havia a fissura. Em estágios iniciais da cicatrização se formam picos nas paredes da fissura, que com o passar do tempo se tornam um pico único da superfície dos corpos de prova (Figura 8; A, B e C). No controle é possível observar deposição de CaCO_3 propiciada pela autocicatrização autógena (Figura 8D), que se estende por toda a superfície de maneira não ordenada ou focalizada, não sendo suficiente para fechar a fissura por completo. Todavia nas amostras contendo uréia não é possível constatar a deposição de CaCO_3 , com todas as amostras com fissuras ainda abertas (Figura 8; E e F), comprovando que nas condições testadas para *Sporosarcina pasteurii* a mesma não demonstrou potencial bioautocicatrizante.

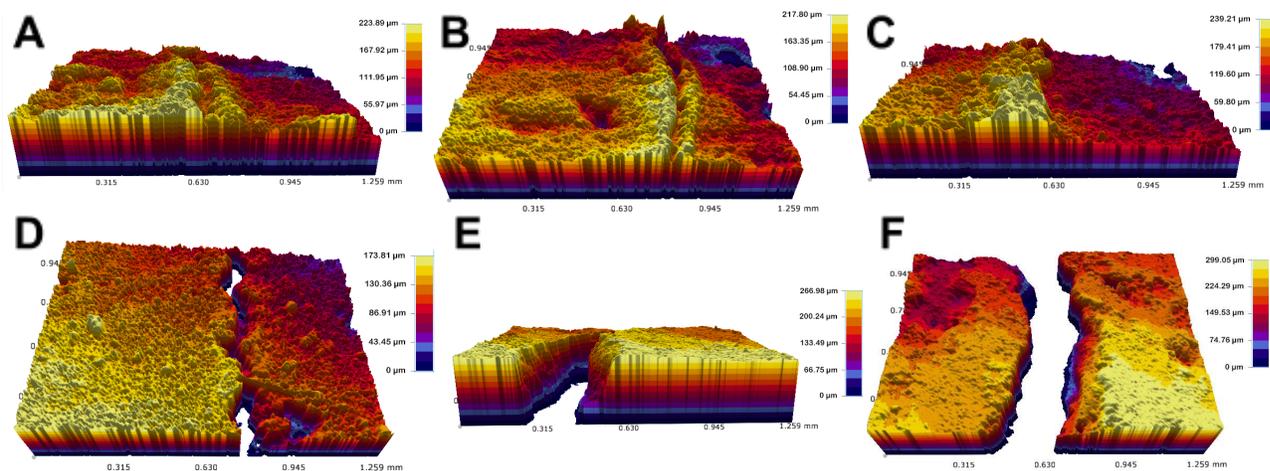


Figura 8: Perfis da superfície de fissura das amostras do teste de concentração com ureia e lactato de cálcio. A e B: estágios intermediários de seu fechamento em duas amostras distintas de lactato 0,5%; C: estágio final do fechamento de amostra com lactato 0,5%; D: controle lactato 0,5%; E e F: fissuras de amostras com ureia 2%. Todas as imagens são após o final do período de tratamento.

4.4 Teste precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo ureia e nitrato de cálcio

Uma vez que os resultados obtidos para *S. pasteurii* no teste de concentração de lactato de cálcio e de ureia mostram que somente o cálcio da matriz não é suficiente, foi testada a capacidade de precipitação de carbonato de cálcio em meios de cultivo líquido contendo somente uréia, uréia e nitrato de cálcio, e comparando com cultivo contendo lactato de cálcio. Como esperado, amostras somente com ureia não formaram precipitado pois não havia cálcio em solução. No cultivo de ureia e nitrato de cálcio obteve-se precipitado em quantidades superiores às obtidas com lactato de cálcio. Os cristais formados são apresentados na Figura 9.

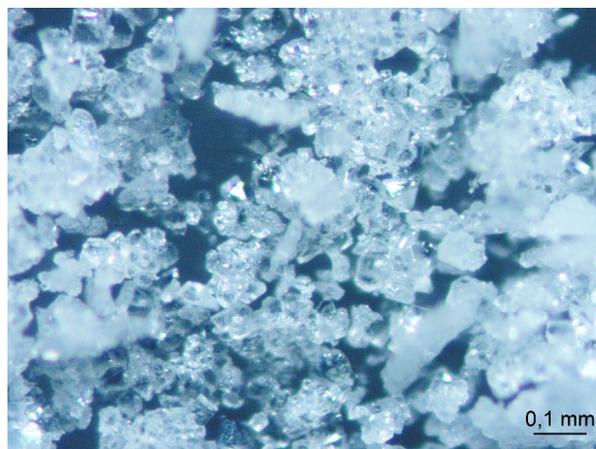


Figura 9: Microscopia dos cristais formados por *Sporosarcina pasteurii* na condição de ureia 2% e nitrato de cálcio.

4.5 Teste degradação de amido

Para comprovar que as cepas de *Bacillus* spp utilizadas têm potencial amilolítico, foi realizado teste de degradação de amido em meio sólido. As placas de ambas bactérias têm presença de halos claros (halos de degradação), indicando seu potencial de degradação de amido (Figura 10).

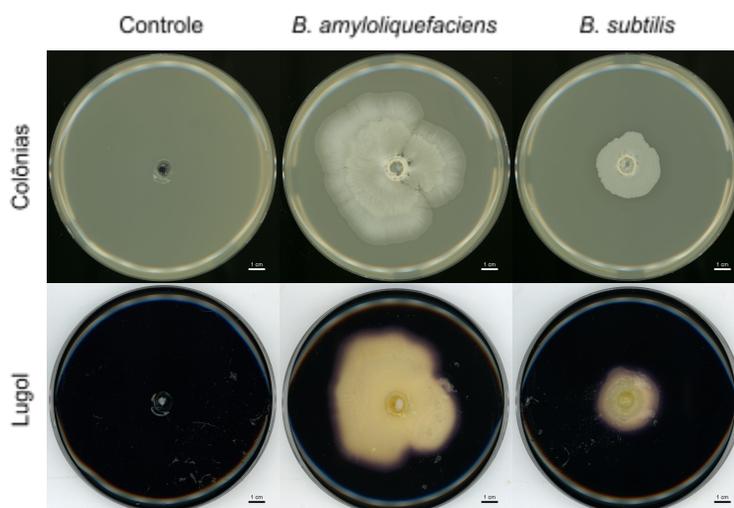


Figura 10: Placas de meio sólido LB amido após 48 horas de cultivo. A presença de halos nas imagens com lugol é indicativo de degradação de amido.

4.6 Teste redução de nitrato

Para comprovar que as cepas de *Bacillus* spp utilizadas têm potencial de conversão de nitrato a nitrito, foi realizado teste de degradação de nitrato em meio líquido. Na ausência de nitrito a solução se mantém incolor ou amarelada. Há mudança de cor para vermelho na presença de nitrito, indicando conversão de nitrato a nitrito. Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Figura 11.

	Controle	<i>B. amyloliquefaciens</i>		<i>B. subtilis</i>	
Água destilada	+	-	-	-	-
Cultivo Bacteriano	-	+	+	+	+
Nitrato de cálcio	+	-	-	-	-
Reagentes	+	-	+	-	+



Figura 11: Tubos eppendorf contendo soluções testadas para presença de nitrito. Coloração avermelhada indica conversão de nitrato a nitrito.

4.7 Testes precipitação de carbonato em meio contendo amido e nitrato de cálcio

Após confirmar a capacidade de degradação de amido e nitrato de cálcio de AMY e SUB, foi testada sua capacidade de precipitação de carbonato de cálcio. No primeiro ensaio, avaliado após 24 horas de incubação, a osmotolerância de AMY e SUB foi testada (Tabela 2 e Figura 12). Soluções contendo LB com nitrato de cálcio 5% (Figura 12, coluna 2) e lactato 0,5% (Figura 12, coluna 5) serviram como controle positivo para o crescimento das bactérias e MICP, respectivamente. Solução de amido 0,5% e NaCl 0,9% (Figura 12, coluna 1) foi o controle negativo para MICP. Altas osmolaridades foram testadas com amido 0,5%, nitrato de cálcio 5% e NaCl 0,1% e 0,9% (Figura 12, colunas 3 e 4, respectivamente). Após incubação, houve precipitação somente nas soluções contendo meio LB com nitrato de cálcio 5% para ambos os microrganismos, assim como nos meios contendo amido e nitrato de cálcio, e lactato de cálcio, porém AMY apresenta maiores quantidades de precipitação se comparado ao SUB. Os controles negativos não apresentaram precipitado, porém o controle positivo de lactato de cálcio formou pouco ou quase nenhum precipitado. Isso é indicativo de que não houve tempo o suficiente para que MICP ocorresse.

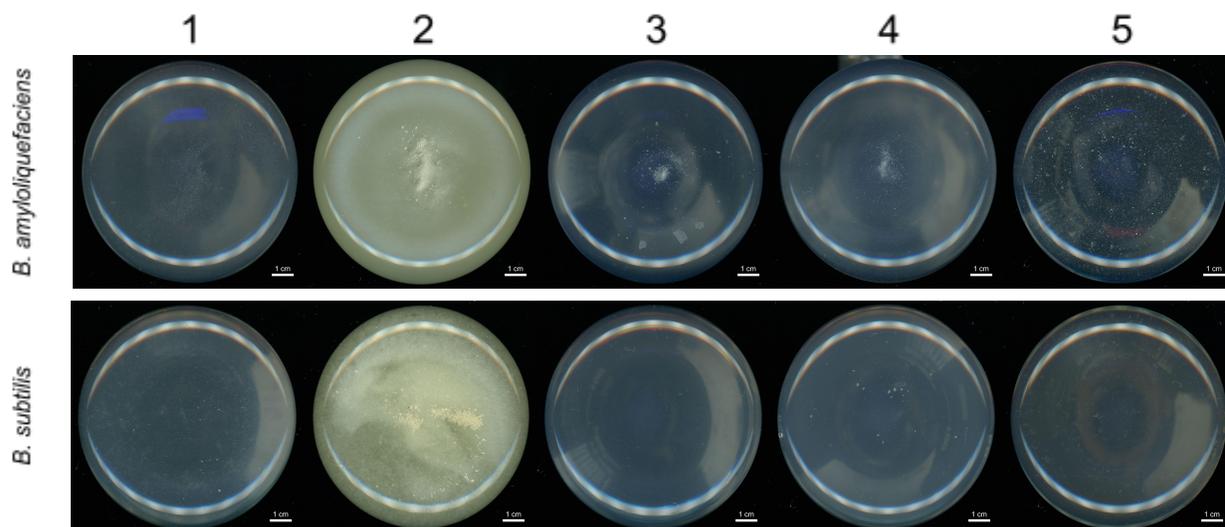


Figura 12: Base dos frascos erlenmeyer avaliados após 24 horas de cultivo. As colunas são: 1 - controle negativo; 2 e 5 - controles positivos; 3 e 4 - soluções teste. Consulte a Tabela 2 para descrição completa da composição das soluções.

No segundo ensaio, avaliado após 48 horas de incubação, foram comparados os potenciais de MICP de cloreto de cálcio e nitrato de cálcio (Tabela 2 e Figura 13). As soluções de controle negativo, sem adição de bactérias (Figura 13, linha 1) não apresentaram precipitação. No controle positivo com lactato de cálcio 0,5% houve precipitação em quantidades superiores a mesma condição avaliada em 24 horas (Figura 12, coluna 5). Para as soluções teste (Figura 13, colunas 1 e 2) houve degradação de amido para ambas as condições, indicando que as bactérias se desenvolveram. Todavia, houve precipitação somente na presença de nitrato de cálcio, e não na presença de cloreto de cálcio. O pH das soluções foi avaliado após o período de incubação e são apresentados na Tabela 2.

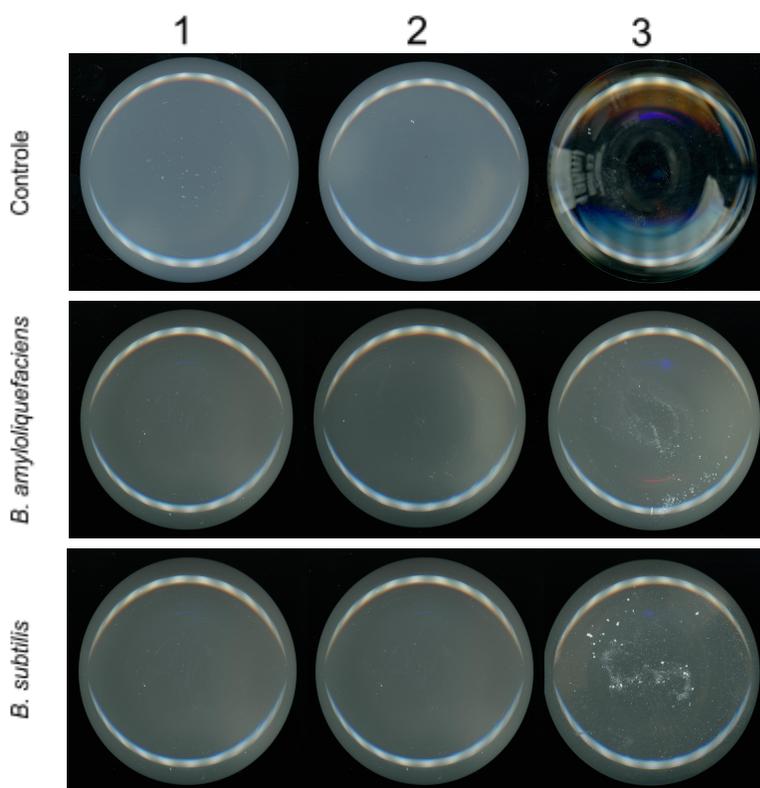


Figura 13: Base dos frascos erlenmeyer avaliados após 48 horas de cultivo. As colunas são: 1 e 2 - soluções teste; 3 - controles positivos. Consulte a Tabela 2 para descrição completa da composição das soluções.

No terceiro experimento, avaliado após 48 horas e com controle de pH, foram testadas duas concentrações de amido (1% e 2%), com pH de 7,4 e 8,4. As maiores precipitações ocorreram para as amostras contendo SUB, com amido 1% em pH 8,4 como a máxima (Figura 14, coluna 3 - *B. subtilis*). Não houve precipitação de carbonato de cálcio nem degradação de amido para amostras contendo cloreto de cálcio, e nas amostras de AMY em pH 8,4 (Figura 14, coluna 4 e 2-4, respectivamente).

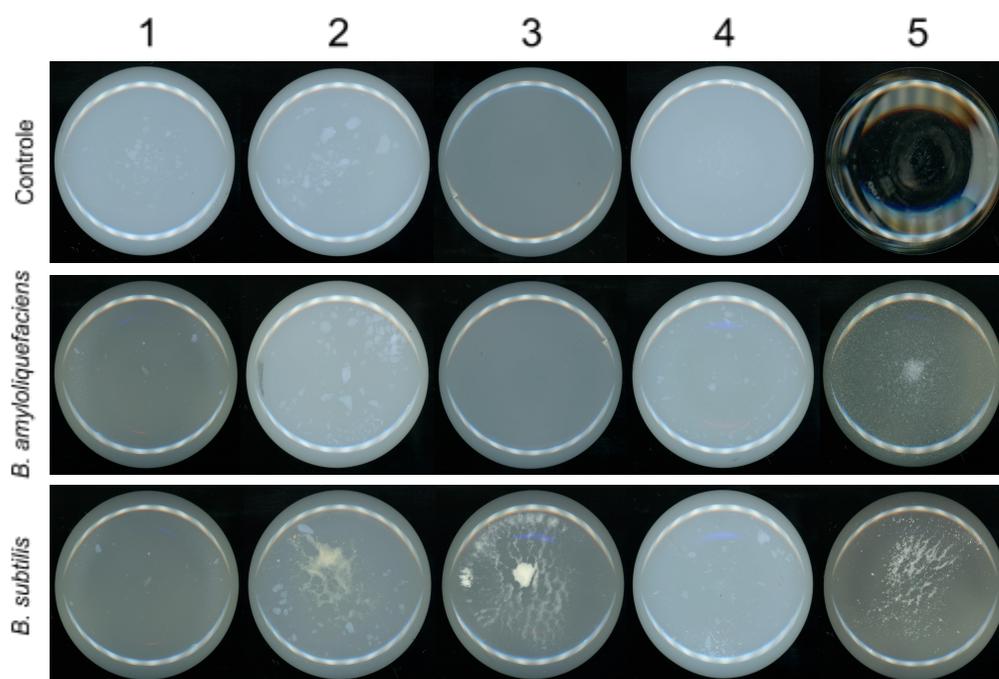


Figura 14: Base dos frascos erlenmeyer avaliados após 48 horas de cultivo. As colunas são: 1 a 4 - soluções teste; 5 - controles positivos. Consulte a Tabela 2 para descrição completa da composição das soluções.

4.8 Termogravimetria

Para confirmar se o precipitado observado em todos os testes de precipitação é composto por carbonato de cálcio, foi realizada termogravimetria do precipitado (Figura 15). O resultado de termogravimetria apresenta perfil de perda de massa usualmente atribuído a CaCO_3 , com início de perda de massa próximo aos 700°C , indo até 900°C , devido à decomposição térmica do sal a CaO , liberando CO_2 . A relação de massa de

carbonato presente na amostra é de cerca de 99%, mostrando que o precipitado formado com o processo é somente de carbonato de cálcio.

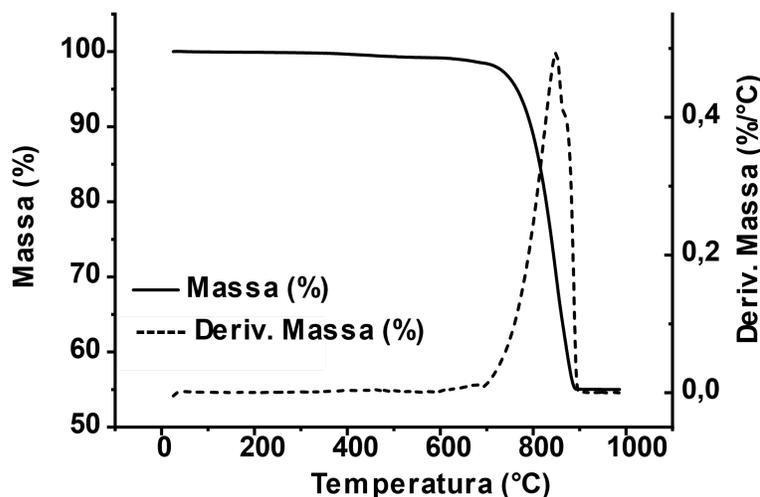


Figura 15: Curvas de perda de massa geradas por ensaio de termogravimetria

4.9 Experimento fatorial fracionário ponto central

O experimento fatorial fracionário é essencial para definir os parâmetros que serão utilizados no experimento composto central completo, uma vez que indica todas as variáveis relevantes para o processo e suas influências. O planejamento realizado e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

De acordo com os resultados, expostos na Tabela 4, todas as variáveis analisadas são significativas ($\alpha < 0,05$). Apresentam efeitos positivos - o aumento dos seus valores tem efeito positivo no processo - as variáveis pH e concentração de bactérias. Com efeitos negativos, as variáveis amido e nitrato de cálcio, e também as interações entre pH e amido, pH e nitrato de cálcio, pH e bactérias.

Tabela 3: Desenho experimental e resultados obtidos do FPC

Ensaio	pH	Amido (%)	Ca(NO ₃) ₂ (%)	Bactérias (log CFU/ml)	Resultados (AU)
1	8	0,5	8	6	3
2	9	0,5	8	8	10
3	8	1,5	8	8	7
4	9	1,5	8	6	6
5	8	0,5	12	8	6
6	9	0,5	12	6	5
7	8	1,5	12	6	0
8	9	1,5	12	8	1
<i>pc1</i>	8,5	1	10	7	10
<i>pc2</i>	8,5	1	10	7	9,5
<i>pc3</i>	8,5	1	10	7	10
Média - <i>pc</i>					9,8333
Variância - <i>pc</i>					0,0833
Desvio padrão - <i>pc</i>					0,2887

Tabela 4: Análise estatística dos resultados obtidos com FPC. SG indica as variáveis significativas a partir de Teste t; Efeitos são os efeitos obtidos para cada variável ou interação entre variáveis; Erros são os erros dos efeitos calculados; t são os valores de t calculados no Teste t; números dos confundidos de 1-4 equivalem respectivamente às variáveis pH, Amido, Ca(NO₃)₂, e Bactérias; a cor azul indica os confundidos significativos.

	Efeitos	Erros	t (2)	p	Confundidos	
SG	<i>Média</i>	6.136 ± 0.087	70.501	0.000		
SG	<i>pH</i>	1.500 ± 0.204	7.348	0.018	1	234
SG	<i>Amido</i>	-2.500 ± 0.204	12.247	0.007	2	134
SG	<i>Ca(NO₃)₂</i>	-3.500 ± 0.204	17.146	0.003	3	124
SG	<i>Bactérias</i>	2.500 ± 0.204	12.247	0.007	4	123
SG	<i>pH*Amido</i>	-1.500 ± 0.204	7.348	0.018	12	34
SG	<i>pH*Ca(NO₃)₂</i>	-1.500 ± 0.204	7.348	0.018	13	24
SG	<i>pH*Bactérias</i>	-2.500 ± 0.204	12.247	0.007	14	23

Nível de significância α : 0.050

4.10 Experimento composto central quadrático esférico (CCDE)

Com base nos resultados obtidos com o planejamento fatorial fracionário foram definidas as variáveis e intervalos a serem testados no Planejamento Composto Central - Modelo Quadrático Esférico com 3 Variáveis (Tabela 5). A cobertura e a resolução do CCDE são muito superiores ao FPC, pela presença de mais pontos e sua disposição (Figura 16).

Tabela 5: Variáveis e intervalos escolhidos para o CCDE Níveis de -1,68 a 1,68 são os valores codificados dos pontos avaliados para cada variável, sendo 0 o ponto central. Os valores não codificados de cada variável são equivalentes aos pontos codificados.

Variáveis	Níveis				
	-1,68179	-1	0	1	1,68179
Amido	0,16	0,5	1	1,5	1,84
Ca(NO ₃) ₂	6,64	8	10	12	13,36
[Bactérias]	5,32	6	7	8	8,68

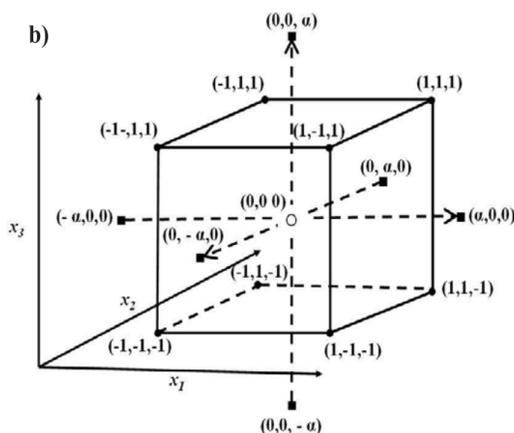


Figura 16: Esquema da posição dos pontos avaliados no CCDE $\alpha=1.682$. (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (□) ponto central. Adaptado de (TEÓFILO; FERREIRA, 2006)

As quantidades de carbonato de cálcio formadas nas amostras classificadas como rendimento máximo observado (10 UA) foram muito superiores em comparação aos resultados dos testes anteriores (Figura 18, A e B), além dos cristais serem muito maiores que os formados anteriormente (Figuras 5 e 18C). A partir dos resultados observados foi gerada a equação que descreve o comportamento do processo, com base nos efeitos calculados. Os valores estimados por essa equação são apresentados na Tabela 6. Todos os valores estimados se aproximam muito dos observados.

Tabela 6: Planejamento completo decodificado do CCDE, resultados observados e estimados

Ensaio	Planejamento			Observado	Estimado
	Amido	Ca(NO ₃) ₂	[Bactérias]	y	\hat{y}
1	0,5	8	6	5,5	6,17012
2	1,5	8	6	6,8333	6,51291
3	0,5	12	6	9	9,13683
4	1,5	12	6	7,8333	8,31311
5	0,5	8	8	4,1666	4,1739
6	1,5	8	8	5,1666	5,51689
7	0,5	12	8	7,333	8,14051
8	1,5	12	8	8,5	8,31699
9	0,16	10	7	9,5	8,77053
10	1,84	10	7	9,1666	9,20718
11	1	6,64	7	3,8333	3,64756
12	1	13,36	7	9	8,49685
13	1	10	5,32	7,666	7,32623
14	1	10	8,68	6	5,65088
15	1	10	7	9,5	9,62364
16	1	10	7	9,5	9,62364
17	1	10	7	9,5	9,62364
18	1	10	7	9,5	9,62364
19	1	10	7	10	9,62364

A correlação entre os valores observados e estimados (Figura 17) apresenta R^2 de 0,959, indicando que a equação do processo é adequada para descrever seu comportamento.

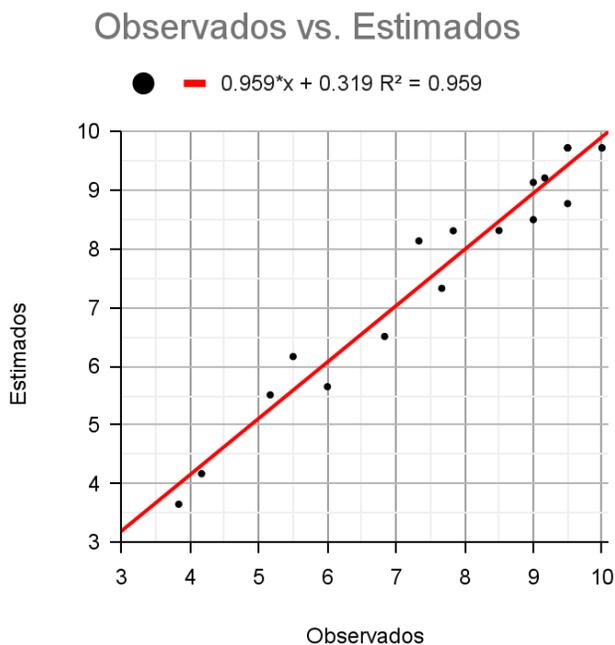


Figura 17: Correlação entre valores observados e estimados do CCDE.

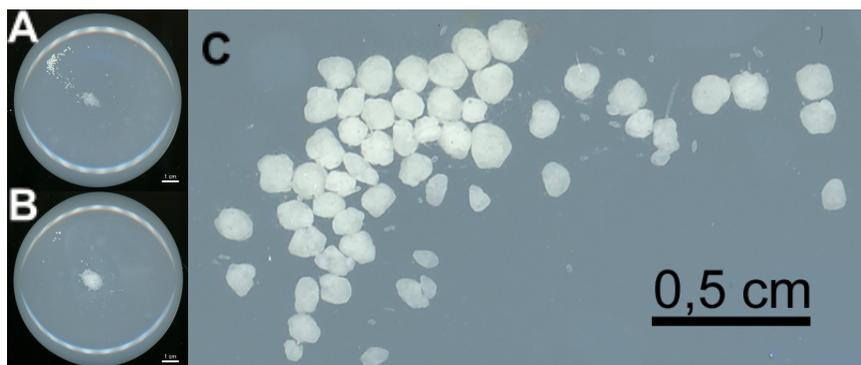


Figura 18: Resultados do CCDE no ponto central após 96 horas de cultivo. A e B: amostras classificadas como rendimento máximo observado; C: zoom dos cristais produzidos pela amostra em A.

A equação foi elaborada a partir do modelo quadrático, e validada pela análise da regressão e fórmula de ajuste (ambas com $p < 0,05$), com os resultados completos da análise dispostos na Tabela 7.

Tabela 7: Análise de variância do modelo quadrático gerado a partir dos resultados obtidos no CCDE FV: fatores de variância; SQ: soma quadrática; SQ: somas dos quadrados; NGL: número de graus de liberdade; MQ: médias dos quadrados; SG: significativo; p : valor de p .

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	67,2039	9	7,4671	23,4116 SG	3,35E-05
Resíduos	2,87054	9	0,3189		
F. Ajuste	2,67054	5	0,5341	10,6821 SG	0,01978
Erro Puro	0,2	4	0,05		
Total	70,0745	18			
% variação explicada				95,90	
% máx. de variação explicável				99,71	

A análise estatística dos coeficientes mostrou que todas as variáveis escolhidas são significativas, exceto a concentração de amido.

Tabela 8: Análise estatística dos resultados obtidos com o CCDE e coeficientes calculados

	Coeficientes			Erro	t (4)	p
SG	b_0	9,6236	±	0,100	96,350	0,0000
	b_1	0,1298	±	0,061	2,145	0,0985
SG	b_2	1,4417	±	0,061	23,827	0,0000
SG	b_3	-0,498	±	0,061	8,232	0,0012
SG	b_{11}	-0,224	±	0,061	3,708	0,0207
SG	b_{22}	-1,256	±	0,061	20,746	0,0000
SG	b_{33}	-1,108	±	0,061	18,314	0,0001
SG	b_{12}	-0,292	±	0,079	3,689	0,0210
SG	b_{13}	0,2501	±	0,079	3,163	0,0341
SG	b_{23}	0,25	±	0,079	3,162	0,0341
Nível de significância (α)					0,05	

Os coeficientes utilizados na equação são diferentes dos coeficientes analisados na tabela 8, e são utilizados para descrever a superfície de resposta com o cálculo de valores estimados para a interação de cada variável. Esses coeficientes são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Coeficientes da equação (calculados).

Coeficientes									
b_0	b_1	b_2	b_3	b_{11}	b_{22}	b_{33}	b_{12}	b_{13}	b_{23}
-71,63	1,47	6,42	13,27	-0,9	-0,31	-1,11	-0,29	0,5	0,12

Com a equação do processo, foram gerados três gráficos (Figuras 19-21), onde cada um permite a análise da interação entre duas das três variáveis avaliadas (amido, nitrato de cálcio e bactérias).

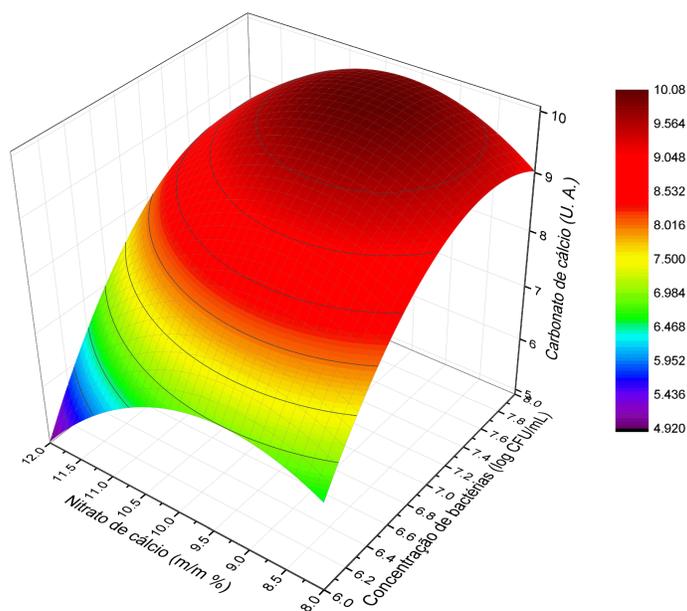


Figura 19: Superfície de resposta para precipitação de carbonato das interações entre nitrato de cálcio e concentração de bactérias, com valor de amido fixado para o ponto de máximo rendimento obtido a partir da equação.

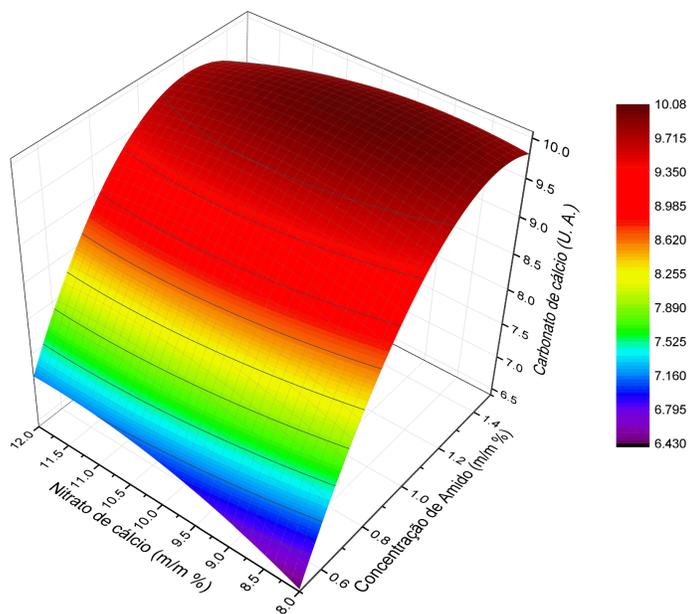


Figura 20: Superfície de resposta para precipitação de carbonato de cálcio das interações entre nitrato de cálcio e amido, com valor de bactérias fixado para o ponto de máximo rendimento obtido a partir da equação.

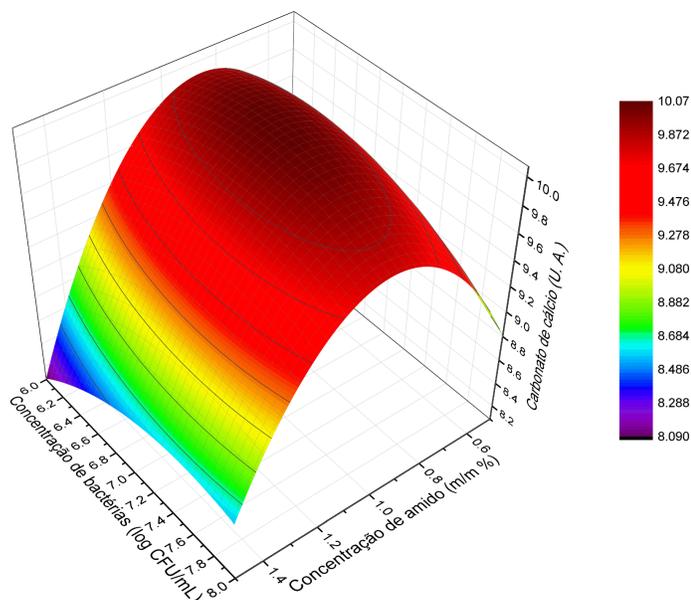


Figura 21: Superfície de resposta para precipitação de carbonato de cálcio das interações entre concentração de bactérias e amido, com valor de nitrato de cálcio fixado para o ponto de máximo rendimento obtido a partir da equação.

Em análise de Pareto avaliando os efeitos de cada variável e suas interações no processo (Figura 18), as mais significativas foram bactérias, nitrato de cálcio, interação entre nitrato de cálcio e bactérias, e amido (listadas em ordem decrescente de acordo com seus valores de efeito padronizado). As interações entre as três variáveis, amido e nitrato de cálcio e amido e concentração de bactérias não são significativas para o processo.

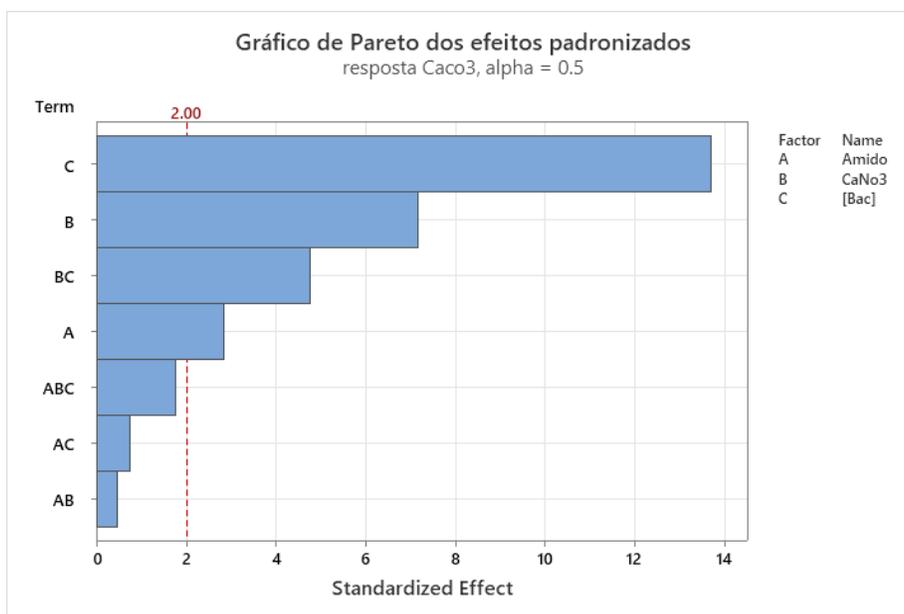


Figura 22: Teste de pareto para avaliar o efeito de cada variável e interação no processo

5. DISCUSSÃO

No processo de cicatrização de fissuras em matriz cimentícia, diversos fatores influenciam seu rendimento, sendo eles o tempo de contato com água, a concentração de substratos, o tamanho da fissura, e o tempo de cicatrização avaliado.

O tempo de contato com a água é relevante pois no fenômeno de cicatrização, e principalmente na bioautocicatrização, a água é essencial para o processo de formação dos produtos de cicatrização, pois é meio para que as bactérias se desenvolvam, metabolizando os substratos e gerando os produtos necessários para a precipitação de carbonato de cálcio. No teste comparativo de metodologias de exposição das fissuras aos agentes cicatrizantes essa influência se evidencia ao compararmos as amostras tratadas dos ciclos com a condição submersa (Figura 6). Os melhores resultados são observados para as amostras que tiveram o maior tempo de contato com a água - e, por conseguinte, também com os agentes cicatrizantes. A metodologia de submersão é amplamente adotada em outros estudos de bioautocicatrização (HIZAMI ABDULLAH; HARMIZA ABDULLAH; TOMPANG, 2018; MA et al., 2020), com resultados que vão de acordo com os encontrados neste estudo. A partir desses resultados, a condição de submersão foi adotada para os experimentos subsequentes.

A concentração de substratos influencia o processo por dois motivos: é fator limitante da quantidade de precipitado que pode ser formado; e a osmolaridade da solução pode dificultar o crescimento bacteriano. Quanto maior a concentração de substrato para que ocorra a reação, mais produto pode ser formado (XU et al., 2015). Entretanto, quanto mais solutos há em uma solução maior será sua osmolaridade, quanto maior a osmolaridade mais difícil se torna o crescimento bacteriano, e quanto menos bactérias menor o rendimento do processo de cicatrização. Tendo em vista o comportamento inversamente proporcional dessas variáveis, é imprescindível encontrar o valor (ou intervalo de valores) em que a concentração de substrato e osmolaridade sejam ideais, gerando os maiores valores de precipitação possíveis. Outro fator importante são as concentrações relativas dos reagentes da reação, classificados como FCA e FCB. As quantidades desses reagentes devem se aproximar em número de mol, pois a reação só ocorre até o consumo completo do reagente limitante. A

avaliação da concentração mais adequada para a cicatrização utilizando lactato de cálcio e ureia foi feita com intervalos escolhidos a partir de valores já descritos na literatura (DE BELIE; WANG, 2016; SCHLANGEN; JONKERS, 2008; ZHU et al., 2019).

Para lactato, a concentração de 0,5% foi a melhor. Para ureia, a concentração foi de 2% (Figura 7). Entretanto, ao contrário de lactato em que os tratados apresentam valores visivelmente diferentes dos controles, ureia tem valores muito próximos aos controles e até inferiores, evidenciando que a condição de exposição utilizada não é capaz de cicatrizar fissuras. Isso se explica com base em dois pontos: o primeiro é de que o cálcio disponível para o processo provinha somente da matriz cimentícia, e esse não é suficiente para que ocorra a deposição de carbonato de cálcio; o segundo é que a metabolização de ureia gera amônia e ácido carbônico como subprodutos, que são nocivos e degradam a matriz. Porém, amostras controle sem agentes cicatrizantes apresentam autocicatrização autógena, mesmo que em pequenas quantidades. Então os resultados obtidos para amostras contendo ureia se explicam pelo fato da concentração de ácido carbônico ser muito superior à concentração de cálcio solúvel disponibilizado pela matriz, que apesar de ser um composto essencial para MICP, acaba acidificando o meio, o que não só impede a precipitação como corrói a matriz. Essa corrosão se torna ainda mais evidente ao se analisar as imagens de perfilometria da amostra de ureia 2%, que apesar de apresentar os melhores resultados dentre as concentrações testadas, ficou muito aquém do esperado, com fissuras largas e sem apresentar nenhum indicativo de deposição de carbonato de cálcio na superfície da amostra.

Nas perfilometrias de lactato 0,5% (Figura 8, A-D) é possível observar a deposição de carbonato de cálcio tanto no controle como nos tratados, na superfície e região fissurada. Também é observado um comportamento que se repete para diferentes porções da fissura em todas as amostras de lactato: a deposição de lactato de cálcio é muito mais acentuada nas bordas da fissura e sua região interna do que na superfície da amostra. Essa deposição segue um padrão particular, que se caracteriza pelo surgimento de pequenos picos na região de borda da fissura nos estágios iniciais de fechamento, que seguem aumentando em direção a borda oposta até se unirem, após a união dos dois picos há um vale que acompanha o desenho de onde antes jazia

a fissura - no qual seus pontos mais baixos são mais altos que a superfície da amostra, mostrando que a fissura já está completamente cicatrizada - (Figura 8, A e B), e por fim o vale é preenchido, unindo os picos que se tornam um só (Figura 8C). Esse comportamento é explicado pelas características do processo de cristalização de um sal. Esse processo, na indústria, é separado em várias etapas, mas as duas etapas iniciais (nucleação e crescimento) são as etapas que fazem parte da MICP em fissuras em matriz cimentícia. Para a nucleação é necessário criar condições para que as moléculas se aproximem e deem origem ao cristal. A supersaturação do sal na mistura líquida o torna instável, pela existência de uma concentração superior ao limite de solubilidade, fazendo com que se aproximem e iniciem a precipitação. A precipitação é facilitada quando na presença de agentes de nucleação, que podem ser superfícies e também pequenos cristais já formados em solução ou em superfície, chamada de nucleação primária. Uma vez formados os primeiros cristais, seus fragmentos podem se tornar novos núcleos, gerando nucleação secundária (JANČIĆ; GROOTSCHOLTEN, 1984). A fissura é um *hotspot* para a nucleação, possuindo muita área de superfície em suas faces internas e tendo pequenos volumes de água em seu interior. Mudanças de concentração dos produtos formados a partir da metabolização das FCA e FCB pelas bactérias são muito mais acentuadas no interior da fissura do que no restante da solução, uma vez que a água livre neste espaço é limitada, a solução está em repouso e a difusão dos sais é lenta, sendo um núcleo de supersaturação. Essa característica é evidenciada pela deposição acentuada nas bordas e interior das fissuras, observados na perfilometria. Uma vez formado o núcleo, o cristal começa a crescer, iniciando a etapa de crescimento do cristal. A velocidade de crescimento dos cristais depende diretamente do nível de supersaturação, que quanto mais elevado for, maior a velocidade de nucleação. Quando a velocidade de nucleação é alta, muitos núcleos são formados simultaneamente (JANČIĆ; GROOTSCHOLTEN, 1984). Dentro da fissura o nível de supersaturação é elevado, levando a formação de diversos núcleos ao longo de toda sua extensão (Figura 8, A e B). Conforme os cristais crescem, se unem com os cristais vizinhos, formando os picos observados. As paredes internas se aproximam fazendo com que a quantidade de água diminua cada vez mais, acelerando o processo. O processo de crescimento segue somente até o fechamento do vale, pois

a partir do momento que não há mais uma fenda, as características do interior da fissura deixam de existir, e o processo se torna muito mais lento.

Com base nos resultados obtidos nos experimentos de metodologia de exposição e de concentração, foi desenvolvido o teste de precipitação de carbonato de cálcio - protocolo para avaliar a precipitação de carbonato de cálcio a partir de diferentes FCA e FCB em cultivo líquido. A metodologia foi validada com análise de termogravimetria, que indicou que os cristais formados de fato eram compostos por carbonato de cálcio (Figura 15). Para confirmar que o comportamento observado na condição de ureia no teste de concentração é decorrente da concentração insuficiente de cálcio disponibilizada pela matriz cimentícia, foi testada a precipitação de carbonato de cálcio em meio contendo ureia 2%, com e sem adição de nitrato de cálcio como fonte de cálcio. Como esperado, houve formação de cristais somente na condição contendo nitrato de cálcio, apresentados na Figura 9, confirmando que o processo ocorre somente na presença de cálcio suficiente e de acordo com (XU et al., 2015).

Antes de realizar o teste de precipitação de carbonato de cálcio com amido e nitrato de cálcio, o potencial de metabolização destes compostos por SUB e AMY foi avaliado. No teste de degradação amido, ambas as bactérias produziram halos de degradação, confirmando seu potencial amilolítico. No teste de redução de nitrato, os dois microrganismos apresentaram coloração avermelhada na solução teste, confirmando que nitrato foi convertido a nitrito.

Para iniciar os testes de precipitação de carbonato de cálcio com amido e nitrato de cálcio, a osmotolerância de AMY e SUB foi testada (Tabela 2, Figura 9). Houve precipitação nos controles positivos (LB, coluna 2; Lactato de cálcio, coluna 5), confirmando que assim como SUB, AMY também é capaz de realizar MICP. As soluções contendo a FCA e FCB (colunas 3 e 4) também apresentaram MICP, indicando potencial para serem usados na bioautocicatrização. A precipitação de lactato de cálcio foi muito baixa, sendo indicativo de que 24 horas não são suficientes para que MICP ocorresse por completo.

No segundo experimento, foram comparados os potenciais de MICP de cloreto de cálcio e nitrato de cálcio após 48 horas (Tabela 2 e Figura 9). A precipitação de carbonato de cálcio ocorreu somente na condição com nitrato de cálcio, demonstrando

que seu potencial para MICP é maior que o do cloreto de cálcio. Isso se explica pelo nitrato de cálcio ser uma FCA e FCB, enquanto o cloreto de cálcio é somente FCA. O pH final das soluções teste (Figura 9, colunas 1 e 2) eram neutros (Tabela 2), enquanto a solução de lactato de cálcio era alcalina. A maior precipitação na solução contendo lactato, comparada às soluções teste, se explica pelo seu pH, no qual a solubilidade do carbonato de cálcio é menor (Figura 2).

No terceiro experimento de precipitação de carbonato de cálcio, foram testadas duas concentrações de amido (1% e 2%), com pH de 7,4 e 8,4. A partir dos resultados obtidos nos testes com amido 0,5% a 2%, foi constatado que altas concentrações de amido são prejudiciais para MICP, sendo uma concentração próxima a 1% a mais adequada. O pH de 8,4 foi o que apresentou a maior MICP, porém somente SUB conseguiu se desenvolver nesse pH, indicando que AMY não tem tolerância a pH alcalino, confirmando o comportamento observado por (GLOVER; MADILO; TERLABIE, 2018) (Figura 4). Esses resultados se aproximam dos comportamentos apresentados nas figuras 2 e 3. Com base nos resultados obtidos nos três experimentos de precipitação de carbonato de cálcio, SUB na condição de amido 1%, pH 8,5 e nitrato de cálcio 7% foi escolhida como ponto central no FPC.

O FPC foi essencial para a correta delimitação experimental do CCDE, uma vez que indicou todas as variáveis relevantes para o processo e suas influências. Nele foram avaliadas as variáveis pH, e concentrações de amido, nitrato de cálcio e bactérias. A partir da análise estatística dos resultados foi constatado que todas as variáveis escolhidas são significativas para MICP com amido e nitrato de cálcio, corroborando com o observado nos EPC (Tabela 4). O aumento do pH tem efeito negativo para as bactérias, não havendo um bom crescimento em pH 9. Por outro lado, pH 7,5 também não é bom para o processo, pois a MICP é dificultada. Portanto, o pH 8,5 utilizado como ponto central é o mais adequado para que o processo ocorra. O FPC possui pontos escolhidos de maneira a cobrir de maneira homogênea todo o processo, porém seu número é reduzido e por isso não apresenta alta resolução dos efeitos e suas interações, havendo efeitos confundidos. Quanto aos efeitos confundidos, eles demonstram quais interações seriam equivalentes ao efeito avaliado, por exemplo, as interações entre as variáveis 234 se confundem com variável 1, e o

valor calculado para o efeito de 1 é equivalente para o efeito da interação entre as variáveis 234. Neste experimento todos os confundidos se mostram significativos.

O CCDE foi executado em pH 8,5 com as variáveis concentrações de amido, nitrato de cálcio e bactérias (Tabela 5). As quantidades de carbonato de cálcio formadas foram muito superiores em comparação aos resultados dos testes anteriores (Figura 18, A e B), além dos cristais serem muito maiores que os formados anteriormente (Figuras 5 e 18C). O aumento da quantidade e do tamanho dos cristais se deve a dois fatores: (a) condição de alta metabolização bacteriana, aumentando rapidamente a quantidade de carbonato em solução, propiciando a formação de múltiplos pontos de nucleação; (b) avaliação por um período mais longo (96 horas), dando mais tempo para que o processo de crescimento ocorra. A partir dos resultados observados foi gerada a equação que descreve o comportamento do processo, com base nos efeitos calculados. A correlação entre os valores observados e estimados (Figura 17) apresenta R^2 de 0,959, indicando que a equação do processo é adequada para descrever seu comportamento. A equação é elaborada a partir de um modelo quadrático, que também foi validado (com $p < 0,05$ para a regressão e fórmula de ajuste), explicando 95,9% de variação de 99,7% explicável.

A partir da análise estatística dos coeficientes calculados foi constatado que todas as variáveis escolhidas são significativas, exceto a concentração de amido. Isso pode ser explicado pelo fato de que apenas uma parcela do amido presente em solução foi degradado, podendo ainda gerar mais MICP. A degradação incompleta do amido pode ter duas causas: uma delas seria a perda de viabilidade das bactérias; a segunda, o processo de degradação ser lento e a avaliação estar sendo feita antes do tempo adequado.

Foram encontrados os coeficientes de cada variável e interação (Tabela 9), os quais compõem a equação do processo de MICP com amido e nitrato de cálcio, apresentada abaixo:

$$MICP_{Ca(NO_3)_2}^{Amido} = -71,63 + 1,47A + 13,27B + 6,42C - 0,9A^2 - 1,11B^2 - 0,31C^2 + 0,5AB - 0,29AC + 0,12BC \quad [2]$$

Na equação, as letras representam os valores de: A - Amido (m/v); B - Bactérias (log CFU/ml); C - Nitrato de cálcio (m/v).

Foi feita análise de Pareto avaliando os efeitos de cada variável e suas interações no processo (Figura 18), onde as mais significativas ($\alpha = 0,5$) foram bactérias, nitrato de cálcio, interação entre nitrato de cálcio e bactérias, e amido (listadas em ordem decrescente de acordo com seus valores de efeito padronizado). A concentração de bactérias é a variável com maior peso para o processo visto que estas são as catalisadoras da reação, e sua presença e quantidade afeta diretamente e drasticamente o processo. A concentração de nitrato de cálcio, assim como a concentração de amido quando altas são tóxicas para as células bacterianas, impedindo o processo de MICP; e concentrações baixas diminuem o rendimento do processo. Como as concentrações escolhidas para testar e gerar a equação beiram os valores máximos suportados pelas bactérias, o peso de cada uma destas variáveis é proveniente de sua toxicidade, sendo o peso de nitrato de cálcio maior por este apresentar maior toxicidade. Além disso, como observado em todos os experimentos contendo amido a turbidez e coloração esbranquiçada do meio se mantém alta nos tempos finais avaliados, indicando que boa parte do amido não foi degradado. A degradação parcial do amido adicionado explica sua baixa influência no processo evidenciada pelo gráfico de pareto.

Fazendo uso da equação, foram gerados gráficos de superfície de resposta. Nos gráficos, a superfície é o rendimento da MICP pela combinação das concentrações de amido, nitrato de cálcio e bactérias. Cada gráfico apresenta a interação entre duas variáveis, com a terceira fixada no valor do ponto calculado como rendimento máximo (amido 0,9%, nitrato de cálcio 11,2%, bactérias 6,8 log CFU/ml, gerando 10,08 UA de carbonato de cálcio). Todos os três gráficos de superfície de resposta apresentam as

regiões de máximo rendimento/máxima resposta, demonstrando que os intervalos escolhidos foram adequados para o estudo do processo.

Nos gráficos, a disposição dos picos de máximo rendimento é explicada pelos valores dos coeficientes dessas duas variáveis presentes na equação do processo. A razão entre o efeito individual e o efeito da variável sobre ela mesma determinará o quão rápido os valores de resposta se alterarão com a variação da variável, onde quanto menor for essa razão, mais rápido os valores de resposta mudarão. A interação entre uma variável de razão alta e uma de razão baixa faz com que o gráfico fique achatado no eixo com maior razão, como na interação entre nitrato e amido, e bactérias e amido (Figuras 16 e 17). A posição do pico depende principalmente dos intervalos escolhidos para cada variável - quanto mais ao centro, melhor foi a escolha dos intervalos na avaliação da interação entre as duas variáveis.

No primeiro gráfico (Figura 15), a interação entre nitrato de cálcio e concentração de bactérias formou o pico de resposta nos valores centrais mais baixos de nitrato (9% a 11%), porém deslocado para os maiores valores de bactérias (7,2 a 8 log CFU/ml) - se comparados aos valores de máxima calculados a partir da equação, nitrato de cálcio 11,2%, bactérias 6,8 log CFU/ml. Isso indica que concentrações de nitrato menores e de bactérias maiores são necessárias para se ter melhor rendimento, indo de acordo com o observado nos resultados do FPC e tabelas do CCDE, onde concentrações altas de nitrato de cálcio são prejudiciais às bactérias (devido a sua toxicidade), diminuindo o rendimento, e indo de acordo com o gráfico de pareto, onde concentração de bactérias e de nitrato de cálcio e sua interação são respectivamente as mais influentes para o processo.

No segundo gráfico (Figura 16), a interação entre nitrato de cálcio e amido formou o pico de resposta nos valores centrais mais baixos de nitrato (9% a 11%), porém deslocado para os maiores valores de amido (1,2% a 1,5%) - se comparados aos valores de máxima calculados a partir da equação, nitrato de cálcio 11,2%, amido 0,9%. Isso indica que concentrações mais altas de amido são necessárias para se ter melhor rendimento, indo de acordo com o observado nos resultados do FPC e tabelas do CCDE, onde quanto maior a concentração de amido e nitrato de cálcio, maiores os rendimentos. Todavia esses resultados certamente estão sendo influenciados pela

degradação incompleta do amido, o que traria uma falsa necessidade de maiores concentrações do mesmo para melhorar o rendimento do processo.

No terceiro gráfico (Figura 17), a interação entre amido e concentração de bactérias formou o pico de resposta nos valores centrais de amido (0,7% a 1,1%), e também deslocado para os valores centrais de bactérias (6,4 a 7 log CFU/ml) - se comparados aos valores de máxima calculados a partir da equação, amido 0,9% e bactérias 6,8 log CFU/ml. Isso indica que concentrações de amido baixas ou altas são prejudiciais para o processo, indo de acordo com o observado nos resultados do FPC e tabelas do CCDE, onde baixas concentrações são insuficientes para gerar carbonato suficiente para o MICP, e altas são prejudiciais para as bactérias.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve por objetivo a elucidação das características que regem o MICP, além da avaliação do potencial uso de amido e nitrato de cálcio nesse processo. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o cálcio presente na matriz cimentícia não é suficiente para promover bioautocicatrização, mas age como agente de nucleação para a precipitação de carbonato de cálcio produzido pelas bactérias. O fechamento das fissuras segue um padrão de comportamento, separado em três estágios: formação dos primeiros cristais nas bordas internas da fissura, formação de picos na região de borda e crescimento dos cristais até o encontro das faces internas da fissura, união dos picos. Esse comportamento é explicado principalmente pelo processo de cristalização de sais em condições de supersaturação. O processo de precipitação é reprodutível em cultivo líquido agitado, tornando possível realizar estudos piloto sem amostras de cimento, reduzindo o custo e tempo de análise. A metodologia desenvolvida para avaliação da MICP a partir de amido e nitrato de cálcio pode ser utilizada para testar diferentes FCA e FCB, permitindo o teste e otimização de novas combinações de bactérias, FCA e FCB aplicadas à bioautocicatrização. *Bacillus subtilis* é capaz de realizar MICP a partir da metabolização de amido e nitrato de cálcio em pH alcalino. Os resultados do CCDE indicam que amido e nitrato de cálcio desempenham uma boa MICP e podem ser empregados na confecção de bioconcretos.

7. PERSPECTIVAS

- Quantificação do precipitado formado na presença de amido e nitrato de cálcio;
- Avaliação da causa da degradação incompleta do amido no processo de MICP;
- Utilização de outras bactérias;
- Produção de carreadores de hidrogel de amido com esporos imobilizados;
- Incorporação na matriz cimentícia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANG, S. S.; GALINAT, J. K.; RAMAKRISHNAN, V. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. **Enzyme and microbial technology**, v. 28, n. 4–5, p. 404–409, 8 Mar. 2001.

CAPPELLESSO, V. et al. Self-healing approach on early age cracked concretes with smart admixture. 11 Sep. 2019.

CASTRO-ALONSO, M. J. et al. Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: microbiological and molecular concepts. **Frontiers in Materials**, v. 6, 10 Jun. 2019.

CHEN, H.-J. et al. Self-Healing Concrete by Biological Substrate. **Materials**, v. 12, n. 24, 8 Dec. 2019.

DE BELIE, N.; WANG, J. Bacteria-based repair and self-healing of concrete. **Journal of Sustainable Cement-Based Materials**, v. 5, n. 1–2, p. 35–56, 8 Mar. 2016.

DE BELIE, N. et al. A Review of Self-Healing Concrete for Damage Management of Structures. **Advanced materials interfaces**, v. 5, n. 17, p. 1800074, Sep. 2018.

DE ROOIJ, M. et al. (EDS.). **Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013a. v. 11

DE ROOIJ, M. et al. (EDS.). **Self-Healing Phenomena in Cement-Based Materials**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013b. v. 11

EO946_RS15605 alpha-glucosidase [*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 = JCM 2499] - Gene - NCBI. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64304875>>. Acesso em: 19 apr. 2022.

FENG, J. et al. Microbial induced calcium carbonate precipitation study using *Bacillus subtilis* with application to self-healing concrete preparation and characterization. **Construction and Building Materials**, v. 280, p. 122460, Apr. 2021.

GARAY, T. M. et al. **Self-healing evaluation by optical microscope: An Approach to image acquisition, processing and analysis** Congresso Internacional sobre Patologia e Reabilitação das Construções. **Anais...** In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE PATOLOGIA E REABILITAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES. Universidade Federal do Ceará, 2021

GLOVER, R. L. K.; MADILO, F. K.; TERLABIE, J. L. Some technological properties of selected strains of *Bacillus* spp. associated with kantong production in Ghana. **International Food ...**, 2018.

HART, P. W.; COLSON, G. W.; BURRIS, J. Application of carbon dioxide to reduce

- water-side lime scale in heat exchangers. **J. Sci. Technol. For. Prod. Process**, 2011.
- HIZAMI ABDULLAH, M. A.; HARMIZA ABDULLAH, N. A.; TOMPANG, M. F. Development and Performance of Bacterial Self-healing Concrete - A Review. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 431, p. 062003, 8 Nov. 2018.
- JANČIĆ, S. J.; GROOTSCHOLTEN, P. A. M. (EDS.). **Industrial crystallization**. [s.l.] Delft University Press ;;Reidel Pub. Co. ;;Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic Publishers, 1984.
- JENA, S. et al. Impact of *Bacillus subtilis* bacterium on the properties of concrete. **Materials Today: Proceedings**, v. 32, p. 651–656, 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, Feb. 2010.
- JOSHI, S. et al. Microbial healing of cracks in concrete: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 11, p. 1511–1525, Nov. 2017.
- KSO_RS17620 alpha-glucosidase [*Bacillus amyloliquefaciens* IT-45] - Gene - NCBI**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/66327696>>. Acesso em: 19 apr. 2022.
- 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, Apr. 2018.
- LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. FIGURA 7-13. In: **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição Ed. Artmed. [s.l: s.n.]. p. 256.
- LUHAR, S.; LUHAR, I.; SHAIKH, F. U. A. A Review on the Performance Evaluation of Autonomous Self-Healing Bacterial Concrete: Mechanisms, Strength, Durability, and Microstructural Properties. **Journal of Composites Science**, v. 6, n. 1, p. 23, 11 Jan. 2022.
- MA, L. et al. Beneficial factors for biomineralization by ureolytic bacterium *Sporosarcina pasteurii*. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 12, 23 Jan. 2020.
- MONTEIRO, P. J. M.; MEHTA, P. K. **Concrete: Microstructure, Properties and Materials | Request PDF**. [s.l: s.n.].
- MORO, G. V. et al. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. **Microbial biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 759–769, Jul. 2018.
- NAIN, N. et al. Enhancement in strength parameters of concrete by application of *Bacillus* bacteria. **Construction and Building Materials**, v. 202, p. 904–908, Mar.

2019.

OKWADHA, G. D. O.; LI, J. Optimum conditions for microbial carbonate precipitation. **Chemosphere**, v. 81, n. 9, p. 1143–1148, Nov. 2010.

SCHLANGEN, E.; JONKERS, H. A two component bacteria-based self-healing concrete. In: ALEXANDER, M. et al. (Eds.). . **Concrete repair, rehabilitation and retrofitting II**. [s.l.] CRC Press, 2008. p. 119–120.

SHAMALA, T. R.; VIJAYENDRA, S. V. N.; JOSHI, G. J. Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and α -amylase by *Bacillus* sp. CFR-67. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1094–1102, Sep. 2012.

SON, H. M. et al. Ureolytic/Non-Ureolytic Bacteria Co-Cultured Self-Healing Agent for Cementitious Materials Crack Repair. **Materials**, v. 11, n. 5, 11 May 2018.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, Apr. 2006.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of cereal science**, v. 39, n. 2, p. 151–165, Mar. 2004.

URBANEK, A. K. et al. Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 148, Dec. 2017.

WANG, X. F. et al. Evaluation of the mechanical performance recovery of self-healing cementitious materials – its methods and future development: A review. **Construction and Building Materials**, v. 212, p. 400–421, Jul. 2019.

XU, J. et al. Effects of calcium source on biochemical properties of microbial CaCO_3 precipitation. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1366, 2 Dec. 2015.

ZHU, X. et al. Complementing urea hydrolysis and nitrate reduction for improved microbially induced calcium carbonate precipitation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p. 8825–8838, Nov. 2019.

ZIEGLER, F. et al. Evaluation of Internal and Superficial Self-Healing of Cracks in Concrete with Crystalline Admixtures. **Materials**, v. 13, n. 21, 4 Nov. 2020.